Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Santiago de Compostela

"ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO Y NEUROQUÍMICO DEL EFECTO DE LA ESLICARBAZEPINA ACETATO, UN NUEVO FÁRMACO ANTIEPILÉPTICO, SOBRE LAS CRISIS INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A"

Memoria presentada por la licenciada
Mª Teresa Oreiro García,
para optar al grado de Doctor
Santiago de Compostela, Marzo del 2006

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Santiago de Compostela

D. Germán Sierra Paredes y Dña. Mª Dolores Vázquez Illanes, Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informan,

que la presente memoria titulada *"ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO Y NEUROQUÍMICO DEL EFECTO DE LA ESLICARBAZEPINA ACETATO, UN NUEVO FÁRMACO ANTIEPILÉPTICO, SOBRE LAS CRISIS INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A"*, presentada por la licenciada en Farmacia **Dña. Mª Teresa Oreiro García** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, y autorizamos a su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Fdo. Germán Sierra Paredes

Fdo. Mª Dolores Vázquez Illanes

FINANCIACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La memoria aquí presentada ha sido financiada por el Proyecto XUGA PGIDIT03PXIB20803PR de la Xunta de Galicia y por Laboratorios BIAL (San Mamede do Coronado, Portugal).

Durante la realización del trabajo de investigación María Teresa Oreiro García, ha disfrutado de una BII de la Universidad de Santiago de Compostela, sufragada por BIAL.

La presente memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones (ver Anexos):

Oreiro-García M.T., Vázquez-Illanes M.D., Sierra-Paredes G. y Sierra-Marcuño G. Analysis of neuroactive amino acids from microdialysate samples by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate method. *Biomedical Chomatography* 2005; 19: 720-724.

Germán Sierra-Paredes, Teresa Oreiro-García, Alejandra Núñez-Rodríguez, Araceli Vázquez-López, y Germán Sierra-Marcuño. Seizures Induced by *in Vivo* Latrunculin A and Jasplakinolide Microperfusion in the Rat Hippocampus. *Journal of Molecular Neuroscience* 2006; 28 (2): 151-160.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 19

1. EPILEPSIA Y EPILEPTOGÉNESIS 21
2. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y EPILEPSIA 24
    2.1. Síntesis y transporte del glutamato 24
    2.2. Receptores del glutamato 25
        2.2.1. Receptor NMDA 26
        2.2.2. Receptor AMPA 27
        2.2.3. Receptor KA 28
        2.2.4. Receptores metabotrópicos 28
    2.3. Origen y acción del glutamato extracelular 29
        2.3.1. El papel de la glía 30
        2.3.2. Transmisión no sináptica 32
    2.4. Origen y acción de la glicina extracelular 34
    2.5. Origen y acción del aspartato extracelular 35
    2.6. Aminoácidos extracelulares y sistema glutamatérgico 36
    2.7. Crisis epilépticas inducidas mediante la latrunculina A 39
3. ANÁLISIS DEL ASPARTATO, GLUTAMATO Y GLICINA
EN EL LÍQUIDO INTERNEURONAL 44
    3.1. Antecedentes 44
    3.2. RP-HPLC acoplada a la detección por fluorescencia 44
        3.2.1. Reactivos derivatizantes relevantes 45
        3.2.2. El AQC, características y avances destacables 47
4. ESLICARBAZEPINA ACETATO O BIA 2-093 (ECA) 51

OBJETIVOS 57

MATERIAL Y MÉTODOS 61

1. PARTE EXPERIMENTAL 63
    1.1. Instrumentación general 63
    1.2. Reactivos y disolventes de RP-HPLC 63
    1.3. Sustancias utilizadas en los experimentos de microdiálisis 64
    1.4. Animales 64
    1.5. Preparación quirúrgica de los animales 65

1.6. La sonda de microdiálisis 67
1.7. Realización de los experimentos de microdiálisis 69
1.7.1. Controles 72
1.7.2. Perfusión de la latrunculina A 72
1.7.3. Administración de la ECA 73
1.8. Preparación de los patrones y del reactivo derivatizante 73
1.9. Proceso de derivatización 73
1.10. Instrumentación cromatográfica 74
1.11. Condiciones cromatográficas 75
2. METODOLOGÍA DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE RP-HPLC 77
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS 78

RESULTADOS 79

1. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE RP-HPLC 81
1.1. Estabilidad 81
1.2. Selectividad 83
1.3. Linealidad y límites de detección 84
1.4. Precisión y Exactitud 86
2. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS 91
2.1. Recuperación de la sonda de microdiálisis 91
2.2. Recta de calibrado 92
2.3. Ajuste de la temperatura de la columna 93
3. CROMATOGRAMAS DE LOS AA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN
DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS 98
4. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A 102
5. EFECTO DE LA LATRUNCULINA A SOBRE LA CONCENTRACIÓN
DE LOS AMINOÁCIDOS 106
5.1. Efecto agudo 106
5.2. Efecto crónico 108
6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ECA SOBRE LAS MODIFICACIONES
EN LAS CONCENTRACIONES DE AA PRODUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A ... 109
6.1. Aspartato 109
6.2. Glutamato 110
6.3. Glicina 111

DISCUSIÓN 113

1. ANÁLISIS DEL ASPARTATO, GLUTAMATO Y GLICINA
EN EL LÍQUIDO INTERNEURONAL 115
2. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A 118
3. EFECTO DE LA LATRUNCULINA A SOBRE LAS
CONCENTRACIONES EXTRACELULARES DE LOS AA 120
4. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS MODIFICACIONES DE LOS AA
EXTRACELULARES INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A 127

CONCLUSIONES 129

BIBLIOGRAFÍA 133

ANEXOS 156

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	aminoácidos.
AMPA	ácido *α*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
AMQ	6-aminoquinolina.
Asp	ácido aspártico/aspartato.
AQC	6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato.
CBZ	carbamazepina.
ECA	BIA 2-093 o eslicarbazepina acetato.
FMOC-Cl	9-fluorenilmetil cloroformato.
GABA	ácido γ-amino butírico.
Glu	ácido glutámico/glutamato.
Gly	glicina.
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución).
LAT	latrunculina A.
LOD	limit of detection (límite de detección).
LTD	long term depression (depresión a largo plazo).
LTP	long term potentation (potenciación a largo plazo).
MES	maximal electroshock seizures (crisis por electroshock máximo).
NHS	*N*-hidroxisuccinimida.
NMDA	*N*-metil-*D*-aspartato.
OPA	*orto*-ftalaldehido.
OXC	oxicarbazepina.
PDS	paroxysmal depolarization shifts (despolarizaciones paroxísticas).
PICT	fenilisotiocianato.
POSTLAT	post-latrunculina A.
RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography. (cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa).


ASPARTATO
INTRODUCCIÓN

1. EPILEPSIA Y EPILEPTOGÉNESIS

La epilepsia es un conjunto de síndromes caracterizados por la aparición de crisis recurrentes, que consisten en una convulsión o breve alteración en la conducta, causada por la descarga sincronizada, brusca y excesiva de un grupo de neuronas del sistema nervioso central. Los síndromes epilépticos han sido clasificados en más de 40 tipos diferentes de acuerdo a sus diversas manifestaciones clínicas, orígenes, edad de aparición, y manifestaciones electroencefalográficas, afectando entre el 1% y el 2% de la población mundial (Engel y Pedley, 1998).

La gran diversidad de síndromes epilépticos, cuya única característica común es el aumento en la excitabilidad neuronal ocasional e impredeciblemente manifestada en una crisis epiléptica, hace necesario recurrir a una terapéutica compleja y variada. Las terapias disponibles en la actualidad no son completamente satisfactorias, ya que no son efectivas en todos los pacientes. Existe un porcentaje de epilepsias refractarias a los tratamientos farmacológicos alrededor del 25-30% (Remy y Beck, 2006). Además, los fármacos antiepilépticos actuales producen a menudo efectos secundarios indeseables, por lo que se dedican numerosos recursos al estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la epileptogénesis, con la esperanza de conseguir nuevas terapias o nuevos mecanismos de prevención (Engel y Pedley, 1998; McNamara, 1999; Jacobs *et al*., 2001).

La investigación de las bases fisiopatológicas de la epilepsia ha seguido dos grandes líneas: el estudio de los mecanismos que convierten a las neuronas normales en neuronas hiperexcitables, y el estudio de los mecanismos por los cuales las neuronas hiperexcitables desencadenan, y detienen la crisis epiléptica (Delgado-Escueta *et al*., 1999).

La epileptogénesis puede definirse como el proceso por el que el tejido nervioso normal se vuelve hiperexcitable hasta el punto de producir espontáneamente crisis epilépticas. En sentido amplio pueden incluirse en el término epileptogénesis todos los mecanismos de origen genético, o adquirido, que pueden desencadenar síndromes epilépticos, el proceso por el que una estimulación repetida o intensa provoca un foco epiléptico, la formación de un foco secundario a partir de un foco primario, y los

mecanismos por los que un foco moviliza neuronas normales en un proceso de sincronización y propagación de la descarga que provoca la crisis (Engel y Pedley, 1998).

La mayor parte de los datos sobre las alteraciones estructurales y funcionales de la epileptogénesis se han obtenido en modelos experimentales en animales (Sarkisian, 2001) y, aunque algunos datos procedentes de seres humanos parecen confirmarlos, no se sabe en qué medida son extrapolables al hombre (Delgado-Escueta *et al*., 1999). Sin embargo, se trata de un conocimiento fundamental para diseñar nuevos tratamientos y mecanismos de prevención de la epilepsia.

Las epilepsias se caracterizan por la capacidad de ciertas neuronas de producir despolarizaciones paroxísticas (PDS). Las PDS (fig. 1) se inician con una despolarización de la neurona, que responde con una serie de potenciales de acción de alta frecuencia acompañados de una despolarización mantenida, que suelen ir seguidos de una hiperpolarización de la neurona para volver finalmente a su potencial de reposo (Dudek *et al*., 1986).

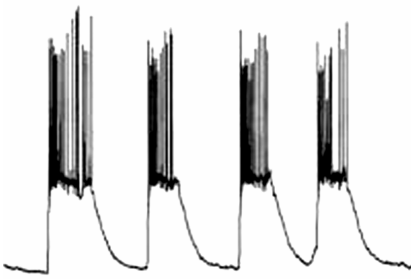


Figura 1. Registro intracelular de una serie de despolarizaciones paroxísticas (PDS), en una neurona del hipocampo.

El inicio de la descarga se atribuye a la activación de receptores AMPA (ácido *α*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores kainato del glutamato, que permiten una rápida entrada de sodio que despolariza la membrana de la neurona. La despolarización mantenida y la descarga de frecuencia rápida se atribuyen a la estimulación de receptores glutamatérgicos NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), que

provocan una lenta entrada de calcio, así como a corrientes de calcio voltaje-dependientes (Rogawski, 1995).

La hiperpolarización que sigue a la despolarización sostenida tiene un componente rápido por activación de canales de cloro de receptores $GABA_A$, y un componente lento que se debe a activación de canales de potasio voltaje-dependientes y asociados a receptores $GABA_A$ que, en condiciones normales, limita la extensión de la descarga (Meldrum, 1995).

Los componentes de las PDS varían en función de la proximidad al origen de las descargas, ya que junto al foco predomina la despolarización sostenida y falta la hiperpolarización, mientras que lejos del foco se observa una despolarización de menor intensidad y duración, y una hiperpolarización más prolongada. Las PDS de una neurona o grupo de neuronas desincronizadas no son capaces de producir por sí solos alteraciones en el electroencefalograma. Para producir una punta interictal, se necesita incorporar un elevado número de neuronas normales del foco y de sus alrededores, que tengan PDS de forma sincronizada, y la descarga debe amplificarse mucho para que se produzca una actividad ictal, que pueda desembocar en una crisis epiléptica. Con frecuencia se propaga a estructuras subcorticales como el tálamo, y directamente o a través de él, al resto de la corteza del mismo hemisferio o del hemisferio contralateral generalizando la crisis (Wasterlain y Shirasaka, 1994).

Una buena parte de las investigaciones acerca de los mecanismos de la epileptogénesis se han centrado en buscar alteraciones en la transmisión sináptica que den lugar a un aumento persistente de la excitabilidad neuronal. Numerosos estudios actuales están encaminados a detectar la aparición de nuevos circuitos excitatorios recurrentes, o a la pérdida de circuitos inhibitorios en los que parece probable que las propiedades intrínsecas de las neuronas que forman parte del circuito, jueguen un papel importante en su aparición o desaparición, y en el mantenimiento a largo plazo de la excitabilidad excesiva (McNamara, 1999; Blumenfeld, 2005).

2. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y EPILEPSIA

De entre los mecanismos celulares capaces de modificar la excitabilidad de las neuronas y producir una modificación en las conexiones sinápticas que pudieran dar lugar a nuevos circuitos, destacan los sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos. El glutamato es el neurotransmisor más estudiado en relación con los fenómenos de hiperexcitabilidad, y los cambios rápidos relacionados con la plasticidad sináptica en el hipocampo y la corteza cerebral (Rogawski, 1995).

Las investigaciones sobre el papel del glutamato en el sistema nervioso pueden resumirse en la descripción de sus tres acciones más conocidas. En primer lugar, el glutamato es el neurotransmisor excitador más utilizado por las neuronas del sistema nervioso central (Dingledine y McBain, 1994); en segundo lugar se ha propuesto que posee un efecto neurotóxico, capaz de inducir lesiones neuronales cuando es liberado en altas concentraciones (Olney *et al*., 1986); y en tercer lugar está implicado en los fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD) (Nicoll *et al*., 1988). La primera de éstas acciones podría estar relacionada con el desencadenamiento de las crisis epilépticas, mientras que las dos últimas podrían relacionarse con la epileptogénesis.

2.1. Síntesis y transporte del glutamato

El ácido glutámico neuronal es sintetizado a partir de la glucosa, que a través de la glicólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es convertida en α-cetoglutarato, que recibe un grupo amino de otro aminoácido por transaminaciones y se convierte en glutamato. El glutamato está en equilibrio y continuamente convertido en α-cetoglutarato y metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El metabolismo de la glucosa en el cerebro humano es de 0,4 μmoles/minuto/gramo de tejido, el del glutamato es de 0,8 μmoles/minuto/gramo de tejido, lo que significa que virtualmente toda la glucosa que entra en el cerebro es metabolizada a través del glutamato. En el cerebro de la rata, el *turnover* del glutamato es aproximadamente de dos veces el humano. El ácido glutámico se acumula en forma de anión glutamato en vesículas sinápticas de las que se libera mediante un proceso calcio-dependiente (Siegel *et al*., 2006).

Los estudios realizados acerca de la neurotransmisión mediante glutamato demuestran que una vez ejercida su acción se elimina por recaptación activa en la presinapsis y en las células gliales por medio de transportadores (Schousboe, 1981). La recaptación a la neurona se realiza mediante el transportador de aminoácidos excitadores (EAAC), y a la glía mediante el transportador de ácido glutámico (GLT1) y de ácido glutámico/ácido aspártico (GLAST). El proceso de recaptación es importante tanto para reponer el ácido glutámico de la terminación como para evitar niveles excesivos en el espacio sináptico. Al ser necesario un gradiente de potasio para el transporte del ácido glutámico, dicho transporte puede invertirse cuando aumenta el potasio extracelular (Diamond *et al*., 1998).

La mayoría del glutamato liberado por la presinapsis es recaptado por los astrocitos que rodean la sinapsis. En los astrocitos el glutamato reacciona con el amoníaco para formar glutamina, reacción catalizada por la glutamina sintetasa, una enzima citosólica que se expresa en los astrocitos y oligodendrocitos, pero no en las neuronas. Ésta reacción es importante para controlar el efecto tóxico del amoníaco libre que podría interferir en la función sináptica. La glutamina sintetizada por los astrocitos, que no posee propiedades de neurotransmisor, es transportada a las neuronas, donde la glutamina es metabolizada a glutamato por una enzima mitocondrial, la glutaminasa, que probablemente sea una enzima específica de la neurona. El tráfico de glutamato y glutamina entre neuronas y astrocitos se conoce como “el ciclo de la glutamina”. Algunos autores han sugerido que el glutamato no captado por los transportadores podría difundir al líquido extracelular interneuronal, e incluso ejercer una acción excitadora en sinapsis muy próximas (Deutch y Roth, 1999).

2.2. Receptores del glutamato

La neurotransmisión glutamatérgica es un fenómeno complejo, ya que el neurotransmisor se une a diversos tipos de receptores, tanto ionotrópicos (AMPA/kainato y NMDA), como metabotrópicos (clases I, II y III) en la membrana postsináptica (fig. 2).

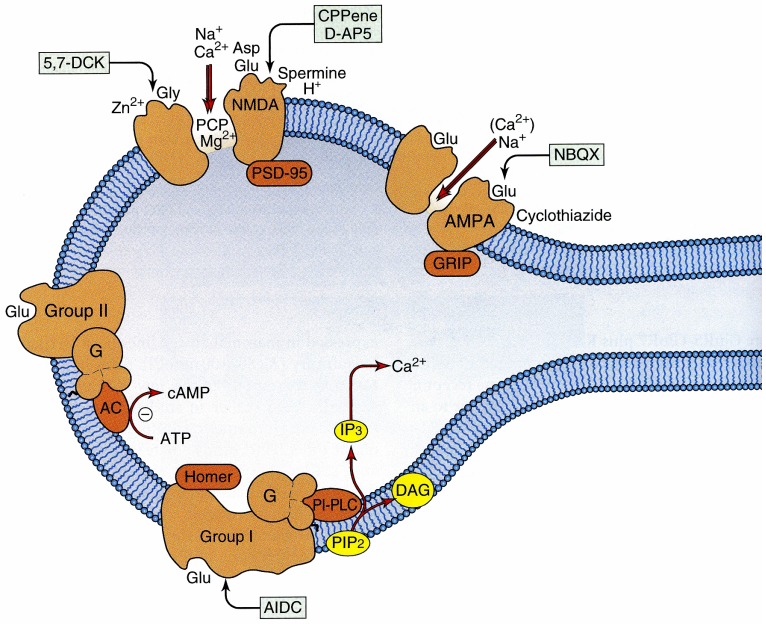


Figura 2. Esquema de algunos de los receptores del glutamato. (Siegel *et al*., 2006).

2.2.1. Receptor NMDA

El receptor NMDA está formado por cinco subunidades que forman un canal sodio/calcio que tiene un sitio glicina, un sitio fenciclidina, y un sitio poliamina. Cada subunidad tiene cuatro segmentos de los que tres son transmembrana, y el segundo es intramembrana. Los segundos segmentos de las cinco subunidades forman el poro del canal. El canal de calcio del receptor NMDA no se activa en la transmisión sináptica normal ya que está bloqueado por iones magnesio. El glutamato sólo activa el canal de calcio del receptor NMDA cuando la neurona se ha despolarizado parcialmente, desplazando a los iones de magnesio (Collingridge y Watkins, 1994).

Los receptores NMDA desempeñan un papel relevante en la génesis de PDS, en la epileptogénesis, y en la sincronización y propagación de la descarga (Rogawski, 1995). En cortes de hipocampo procedente de pacientes con epilepsia temporal, se ha observado un aumento de la respuesta NMDA de las células granulares del hipocampo, incluso sin variación en el número de receptores que se ha atribuido a la activación de receptores “dormidos” (Hosford *et al*., 1991; De Lanerolle *et al*., 1998).

También puede haber otros cambios de los receptores NMDA que los hagan menos sensibles al bloqueo por magnesio. La entrada de calcio a través del receptor NMDA, además de intervenir en la despolarización sostenida de la membrana, interviene en los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) (Collingridge y Watkins, 1994). La reducción del tono glutamatérgico en el receptor NMDA puede conseguirse antagonizando competitivamente la acción del ácido glutámico sobre el receptor (DCPPene, CGS 19755, AP5), sitio glicina (5,7 DKA, felbamato) y, de forma no competitiva, la apertura del canal (fenciclidina, MK 801), mostrando muchas de éstas sustancias efecto anticonvulsivante en modelos experimentales de epilepsia (Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño 1996b; Sierra-Paredes *et al*., 1999, 2000b). Sin embargo, algunas de éstas estrategias no han tenido efecto anticonvulsivante en humanos, o lo han tenido pero con un índice terapéutico inaceptable.

2.2.2. Receptor AMPA

El canal de sodio del receptor AMPA participa en la transmisión normal del estímulo excitador. El descubrimiento de que las alteraciones en alguna de sus subunidades permite incorporar calcio, ha aumentado el interés por el canal, tanto desde el punto de vista de la epileptogénesis como de la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos.

El receptor AMPA está formado por las unidades peptídicas GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Las unidades GluR1, 3 y 4 permiten la entrada de sodio y calcio. GluR2 sólo deja pasar sodio, haciendo que el canal sea selectivo. Una mutación que haga que los receptores AMPA de las células piramidales carezcan de ésta unidad, permitirá la entrada de calcio aumentando la excitabilidad. Los ratones transgénicos con una mutación del gen GRIA2, que cambia la glutamina por arginina en el segundo dominio transmembrana del poro, provocan que las subunidades GluR2 pierdan su capacidad de bloquear la entrada de calcio, presentando convulsiones y degeneración neuronal en CA3. En el *kindling* amigdalar hay una disminución de la expresión de la subunidad GluR2 del receptor AMPA (Trussell y Otis, 1996).

Los barbitúricos modulan negativamente la unidad GluR3 del receptor AMPA a las mismas concentraciones que producen su efecto gabaérgico. Los antagonistas del

receptor AMPA competitivos (NBQX) y no competitivos (GYKI 52466), también poseen efecto anticonvulsivante en modelos experimentales de epilepsia (Vizi *et al*., 1996; Sierra-Paredes *et al*., 2000b).

2.2.3. Receptor KA

El canal de sodio del receptor KA es muy similar al del AMPA, diferenciándose principalmente en su distribución cerebral. Hay subtipos de receptores de baja afinidad (GluR5, GluR6 y Glur7) y de alta afinidad (KA1 y KA2). Los más importantes en el sistema nervioso central son GluR5 y GluR6, ya que están genéticamente controlados para dejar pasar o no calcio, influyendo de forma importante en la excitabilidad de las neuronas. Igual que en el caso del receptor AMPA, el descubrimiento del papel del receptor KA en la epilepsia, ha abierto la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos antiepilépticos que antagonicen éste receptor.

2.2.4. Receptores metabotrópicos

El receptor metabotrópico del glutamato está formado por siete segmentos transmembrana. Hay tres subfamilias de receptores metabotrópicos, el mGluRI (que incluye el mGluR1 y 5), el mGluRII (que incluye el mGluR2, 3 y 8) y el mGluRIII (que incluye el mGluR4, 6 y 7). El mGluRI postsináptico, abundante en CA2 y CA3 del hipocampo actúa a través de la proteína G y de la fosfolipasa C, aumentando el inositoltrifosfato y diacilglicerol. Los receptores mGluRI participan en procesos de plasticidad neuronal como la LTP y pueden explicar cambios de excitabilidad duraderos implicados en la epilepsia, como los observados en la amígdala y en el hipocampo de ratas con *kindling* (Burke y Hablitz, 1995). También se ha sugerido que éstos receptores postsinápticos están implicados en el paso de la actividad interictal a la ictal en la amígdala, y en el mantenimiento de la actividad interictal en el hipocampo (Neugebauer *et al*., 1997).

El mGluRII pre y postsináptico presente en hipocampo y corteza, actúa a través de la proteína G y de la adenilatociclasa, reduciendo la entrada de calcio, disminuyendo el AMPc e influyendo sobre la síntesis de proteínas, de ARN y de ADN. Los mGluIII se encuentran en todas las neuronas del cerebro, y actúan como

autorreceptores presinápticos que reducen la liberación del ácido glutámico. La activación de los receptores mGluRII y III reduce la liberación del ácido glutámico, con un efecto antiexcitatorio que reduce la actividad interictal. Los antagonistas del receptor mGluRI, como el 4C3HPG, tienen efectos anticonvulsivantes y se ha sugerido que los agonistas del receptor mGluRIII podrían tenerla también (Merlin y Wong, 1997; Neugebauer *et al*., 1997).

2.3. Origen y acción del glutamato extracelular

Pese a los datos experimentales que apoyan la hipótesis de la excitabilidad del glutamato por difusión al líquido extracelular interneuronal, si se tiene en cuenta datos experimentales de investigaciones en distintos campos de las neurociencias, se puede afirmar:

1º. Las concentraciones extracelulares de glutamato en el hipocampo, que es el área cerebral más estudiada, se mantienen constantes en estado de reposo y pueden no modificarse por la inducción de crisis epilépticas (Lehman y Hansson, 1988; Millan *et al*., 1991). Analizando los niveles de glutamato extracelular en animales crónicos, las concentraciones de éste neurotransmisor se mantienen sin variación a lo largo de un período de seis meses, tanto en vigilia como en estado de sueño (Sierra-Paredes *et al*., 1998).

2º. La existencia de barreras anatómicas y fisiológicas que impiden la difusión de los neurotransmisores en el líquido extracelular interneuronal (Curtis y Eccles, 1958; De Robertis, 1965).

3º. La presencia en las sinapsis de astrocitos con características específicas, (Wilkin *et al*., 1990) que responden a la liberación sináptica de glutamato activando los transportadores de glutamato, que generan una corriente directamente proporcional a la cantidad de glutamato liberado en la sinapsis (Diamond *et al*., 1998).

4º. La existencia de transportadores de glutamato a nivel de la barrera hematoencefálica (O'Kane *et al*., 1999), que transportan glutamato del líquido

intercelular al sistema sanguíneo. Parece ser un mecanismo bastante frecuente para la regulación de la concentración de diversas sustancias en el líquido extracelular.

5º. Los modernos estudios sobre la neuroglía (Kettenmann y Ransom, 1995), demuestran que los astrocitos pueden sintetizar diversos neurotransmisores tales como glutamato, aspartato, glicina y taurina (Hertz, 1982), y que pueden liberarlos al líquido extracelular (Martin, 1992). Los astrocitos poseen también canales iónicos y receptores para la mayoría de los neurotransmisores (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Todos los datos anteriores sugieren que los neurotransmisores, en este caso el glutamato que se encuentran en el líquido extracelular interneuronal, no parecen proceder de la liberación sináptica. Parece más probable que su origen esté en los astrocitos, y que la regulación de los niveles de glutamato extracelular sea por su síntesis y recaptación por los astrocitos, y por el transporte del glutamato a través de la barrera hematoencefálica.

2.3.1. El papel de la glía

Las células gliales -los astrocitos- encapsulan las sinapsis, y los transportadores de glutamato presentes en los astrocitos poseen capacidad suficiente para retirar todo el glutamato liberado en las sinapsis por el elemento postsináptico (Hertz, 1979). Las células gliales responden al glutamato liberado en las sinapsis activando los transportadores de glutamato, que generan una corriente que es directamente proporcional a la cantidad de glutamato liberado (Diamond *et al*., 1998). La alta capacidad y la afinidad para la captación de glutamato por los astrocitos de la región sináptica permiten la transmisión de la información a través de la sinapsis durante largo tiempo y con una alta relación señal/ruido (Rönnback y Hansson, 1997).

La necesidad de la actividad de las células gliales en la región sináptica, realizando una eliminación tan eficaz del glutamato liberado por las vesículas, se puede explicar si se recuerda el papel del ciclo metabólico glutamato/glutamina, que tiene lugar en la glía y en la neurona presináptica (Schousboe, 1981) (fig. 3). Una vez liberado en la hendidura sináptica, el glutamato difunde, y sus transportadores, tanto los situados en la membrana del elemento presináptico, como los que se encuentran

en la membrana de las células gliales, internalizan el neurotransmisor. En el citoplasma de los astrocitos el glutamato es metabolizado a glutamina, y como tal es transportado desde las células gliales a la terminal presináptica, donde es metabolizada para ser transformada de nuevo en glutamato. Dado que la glutamina no actúa sobre los receptores de glutamato, la liberación y transporte de glutamina no interfiere en la función de los receptores de glutamato (Schousboe *et al*., 1977; Conti y Weinberg, 1999).

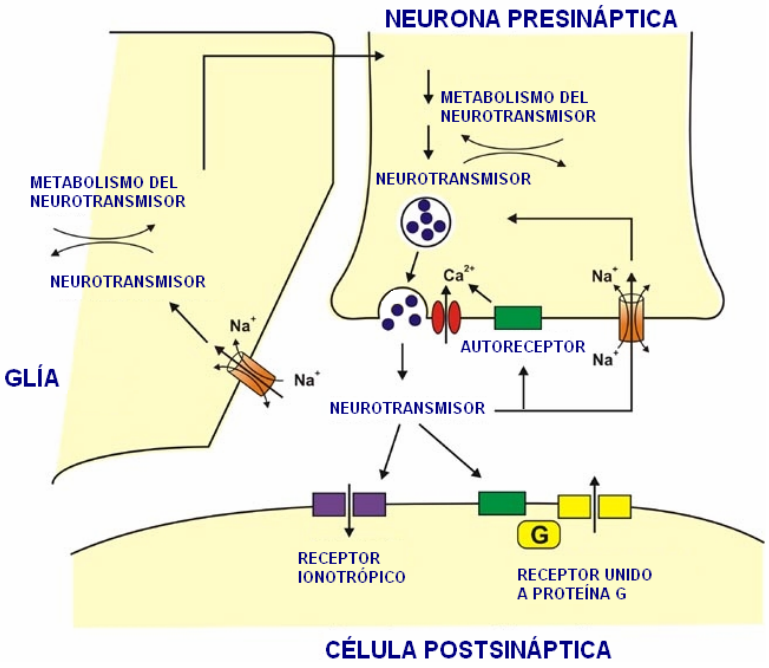


Figura 3. Esquema de la sinapsis-glía.

Parece claro que no sería necesaria la creación de toda la estructura bioquímica, incluida la síntesis de los enzimas, el ciclo glutamato/glutamina en los astrocitos, y el glutamina/glutamato en la neurona con el gasto energético que suponen, si fuese posible la eliminación del glutamato por difusión desde el espacio sináptico directamente al espacio extracelular, tal y como es aceptado por algunos autores (Deutch y Roth, 1999).

Los datos experimentales aportados por Rothstein *et al*. (1996) en sus investigaciones sobre los transportadores de glutamato en neuronas y glía, refuerzan el papel de los receptores de glutamato de los astrocitos. Utilizando animales *knock-*

out, en los que se ha inactivado el gen de los transportadores neuronales de glutamato, se demuestra que los niveles de glutamato en el líquido extracelular no suponen modificaciones significativas; en cambio, aquellos animales *knock-out* que no disponen de transportadores gliales de glutamato, presentan un notable incremento en la concentración de glutamato en líquido interneuronal, demostrándose así que la recaptación de éste aminoácido por los transportadores de la membrana de los astrocitos es el mecanismo preferente para la eliminación del glutamato.

El papel que juegan los astrocitos que encapsulan la región sináptica puede explicarse por la heterogeneidad funcional de los astrocitos (Wilkin *et al*., 1990). Además, se debe tener en cuenta la existencia de barreras sinápticas que han sido descritas tanto desde el punto de vista morfológico (De Robertis, 1965), como desde el punto de vista farmacológico (Curtis y Eccles, 1958). Si se consideran en conjunto todos éstos datos, se tendrá que aceptar la información disponible en la actualidad: que los potenciales epilépticos son generados por el glutamato liberado en las sinapsis por las vesículas del elemento presináptico y sin participación del glutamato presente en el líquido intercelular extrasináptico.

2.3.2. Transmisión no sináptica

Una serie de investigaciones sugieren que el medio ambiente extracelular del cerebro parece ser una entidad homeodinámica que mantiene un medio intercelular constante en lo que se refiere a los iones y pequeñas moléculas, que son críticas para las funciones neuronales, y que la constancia de éste medio intercelular está bajo el control de las neuronas y la glía (Nicholson, 1995). También, recientemente se ha descrito la existencia de transportadores de glutamato sodio-dependientes situados en la barrera hematoencefálica, que ayudan a mantener una adecuada concentración de glutamato en el líquido extracelular interneuronal (O'Kane *et al*., 1999). Explicar el efecto del incremento en las concentraciones de glutamato y de glicina en el proceso de facilitación de la excitabilidad neuronal, considerando, como se ha visto anteriormente, que ésta acción no puede realizarse a nivel de las sinapsis, requiere tener en cuenta nuevos conceptos sobre el funcionamiento del sistema nervioso.

Es necesario considerar el concepto de transmisión no sináptica (Bach-y-Rita, 1991; Fuxe y Agnati, 1991; Bach-y-Rita 1993; Vizi y Kiss, 1998), que ha sido perfilado actualmente como un mecanismo complementario a la acción del glutamato en la transmisión sináptica (Sierra-Paredes *et al*., 2000a). Fagni *et al*. (1983) han sugerido que el *L*-glutamato añadido al baño de las preparaciones de cortes de hipocampo, estimulaba receptores distintos de aquellos activados por el glutamato endógeno, y, como consecuencia de ello, propusieron la existencia de receptores extrasinápticos, cuya presencia y actividad permitieron postular el concepto de transmisión no sináptica.

La existencia de los receptores extrasinápticos ha sido verificada (Aoki *et al*., 1994; Kullman *et al*., 1996), y también se han publicado estudios comparativos entre las propiedades de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos (Clark *et al*., 1997). Actualmente se ha demostrado que los receptores NMDA pueden desplazarse desde la sinapsis a posiciones extrasinápticas (Tovar y Westbrook, 2002). Por otra parte, diversos trabajos experimentales sugieren que el glutamato y el aspartato extracelulares actúan sobre los receptores extrasinápticos (Seifert y Steinhäuser, 1995; Farb *et al*., 1995; Sattler *et al*., 2000; Sierra-Paredes *et al*., 2000a) generando un posible mecanismo de sincronización neuronal (Sierra-Paredes *et al*., 1999, 2000a).

Los estudios realizados en el hipocampo de pacientes epilépticos han demostrado un incremento de la capacidad y tiempo de unión en los receptores AMPA (Hosford *et al*., 1991). Otra serie de trabajos experimentales han señalado que la activación de los receptores NMDA (Liao *et al*., 1995; Shi *et al*., 1999) da lugar a un incremento de la actividad de los receptores AMPA. El glutamato y la glicina perfundidos en el espacio intercelular neuronal pudieran unirse a los receptores NMDA extrasinápticos, incrementando la concentración de calcio intracelular, y facilitando la expresión de nuevas subunidades GluR1 y otras proteínas sin que, en principio, afecten a los receptores en la membrana sináptica.

Pero en los casos de una intensa estimulación (Shi *et al*., 1999), debida a la alteración de la función inhibidora del GABA por la picrotoxina, es posible que estas nuevas subunidades GluR1, o receptores AMPA no integrados en la membrana sináptica, sean rápidamente transportados a una localización postsináptica en las

espinas dendríticas, incrementando así la excitabilidad de las neuronas. De acuerdo con éstos datos, los receptores NMDA extrasinápticos pueden servir como una primera señal para incrementar la densidad de los receptores AMPA sinápticos, y, en consecuencia, incrementar la excitabilidad neuronal.

Hardingham *et al*. (2002) han demostrado que los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos poseen efectos opuestos sobre la función de la proteína CREB, la regulación de la expresión génica y la supervivencia de las neuronas. La entrada de calcio a través de los receptores NMDA sinápticos induce actividad CREB y expresión del factor neurotrófico cerebral (BDNF). En cambio, la entrada de calcio a través de los receptores NMDA extrasinápticos, producida por la administración de glutamato a un cultivo de neuronas o por condiciones de isquemia/hipoxia, activa un mecanismo de bloqueo de CREB que a su vez impide la expresión de BDNF. Los receptores NMDA sinápticos parecen poseer una actividad antiapoptótica, mientras que la estimulación de los receptores NMDA extrasinápticos produce pérdida del potencial de membrana mitocondrial y muerte celular.

2.4. Origen y acción de la glicina extracelular

La glicina ha sido considerada tradicionalmente como un neurotransmisor inhibidor en la médula espinal y algunos núcleos basales del cerebro (Danysz y Parsons, 1998). Sin embargo, durante los últimos 15 años, se ha reconocido su función como coagonista del glutamato en los receptores NMDA en el hipocampo y la corteza cerebral (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; Danysz y Parsons, 1998). La liberación de glicina al espacio intercelular en el hipocampo y la corteza no es calcio-dependiente (Danysz y Parsons, 1998), y no parece proceder de liberación neuronal, sino de la acción de transportadores astrocíticos (Danysz y Parsons, 1998).

El aumento de la concentración de glutamato y glicina extracelulares no produce daño neuronal, actividad neuronal paroxística, ni crisis epilépticas, (Sierra-Paredes *et al*., 2001b). No obstante, el incremento extracelular de ambos neurotransmisores, asociado con otras alteraciones tales como la pérdida de neuronas inhibitorias, podría potenciar la epileptogénesis (Sierra-Paredes *et al*., 2001b; Vázquez-López *et al*.,

2005). En muchas agresiones cerebrales parece que ambos factores ocurren simultáneamente, potenciándose para provocar lesiones o reorganización de los circuitos (*sprouting*) que darían lugar a las crisis epilépticas. Los resultados de éstos experimentos sugieren también que los mecanismos por los que el glutamato y la glicina facilitan las crisis epilépticas en un animal vivo son distintos de los mecanismos de excitotoxicidad, probablemente mucho más importantes en los accidentes vasculares con anoxia o isquemia (Choi, 1988), o en procesos de autoinmunidad (Twyman *et al*., 1995).

2.5. Origen y acción del aspartato extracelular

A diferencia del glutamato y la glicina, el papel fisiológico del aspartato extracelular no está completamente claro. La única acción no metabólica del aspartato en el cerebro de los mamíferos es la activación selectiva de los receptores NMDA (Patneau y Mayer, 1990; Curras y Dingledine, 1992), apenas tiene afinidad por los receptores AMPA, ni se han encontrado otros receptores específicos para el aspartato en el cerebro. El aspartato no se acumula en vesículas sinápticas, y se piensa que la liberación neuronal calcio-dependiente de éste aminoácido no refleja su exocitosis, sino el intercambio de aspartato intracelular por glutamato extracelular a través de transportadores de membrana (Nicholls y Attwell, 1990).

Sin embargo, numerosas investigaciones sugieren que el aspartato pudiera jugar un papel neurotransmisor, particularmente en el hipocampo, donde el aspartato parece ser acumulado en un reservorio diferente al del glutamato para su liberación independiente, que parece poder realizarse tanto en las terminales sinápticas como en cualquier otra zona de la membrana neuronal (Bradford y Nadler, 2004). Autores que proponen como uno de los papeles esenciales del aspartato extracelular, la activación de los receptores NMDA extrasinápticos, participando así en proceso como la regulación del crecimiento de los axones (Baird *et al*., 1996), las dendritas (Rocha y Sur, 1995), la proliferación de progenitores neuronales (Nacher *et al*., 2001) y la sincronización epiléptica (Sierra-Paredes *et al*., 2000a, 2005, 2006).

2.6. Aminoácidos extracelulares y sistema glutamatérgico

El desarrollo de la técnica de microdiálisis permitió realizar el análisis *in vivo* de los componentes bioquímicos del líquido extracelular interneuronal, y comprobar la existencia de múltiples neurotransmisores, entre los que se encuentran el glutamato, el aspartato y la glicina. Datos que parecían justificar la hipótesis de que la liberación de grandes cantidades de aminoácidos, en los casos de estimulación intensa excedía la capacidad de los transportadores y, en consecuencia, una parte de podría difundir al líquido interneuronal, desde donde podría volver a actuar sobre otras sinapsis, participando así en la génesis de síndromes epilépticos y otras alteraciones del sistema nerviosos central (Meldrum, 1995).

La posibilidad de monitorizar los niveles de aminoácidos en el líquido extracelular, unida a la facilidad de inducir crisis epilépticas utilizando técnicas neurofisiológicas o neuroquímicas (Sierra-Paredes *et al*., 1989; Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 1996a); y de realizar, por medio de la técnica electroencefalográfica, el registro de las crisis epilépticas, motivó que el primer tipo de investigaciones en las que se trató de confirmar la relación entre el incremento de aminoácidos en el líquido extracelular interneuronal y la aparición de patologías neuronales, fuese el estudio de las modificaciones en las concentraciones de glutamato durante las crisis epilépticas. Las primeras investigaciones señalaron un incremento en los niveles de glutamato en el líquido extracelular interneuronal (Walker *et al*., 1995), si bien otros autores no encontraron modificaciones en los niveles extracelulares de glutamato durante las crisis epilépticas experimentales (Lehman y Hansson, 1988; Millan *et al*., 1991).

En el Laboratorio de Neurociencias del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, se diseñó una nueva metodología utilizando ratas con libertad de movimiento para experimentos crónicos (Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 1996a). Comprobándose si los datos expuestos anteriormente, que habían sido obtenidos en modelos experimentales de animales muy diferentes y reflejaban el funcionamiento coordinado del cerebro de un animal vivo, configuran una teoría más coherente que la de la excitotoxicidad del glutamato.

Los animales llevan implantada de forma permanente una guía de microsonda, situada en el hipocampo ventral que permite la introducción de sondas de microdiálisis en dicha estructura, y además electrodos corticales permanentes para registro electroencefalográfico. El método permite provocar crisis epilépticas con estimulación umbral, perfectamente controladas, por microperfusión de quimioconvulsivantes en el hipocampo. Con éste modelo experimental se diseñó una nueva metodología que ha permitido establecer la relación entre crisis epilépticas, y niveles de neurotransmisores en líquido extracelular (Sierra-Paredes *et al*., 1998, 2000a, 2001b), el papel de los receptores ionotrópicos del glutamato en la génesis de las crisis epilépticas, y en la modificación de los neurotransmisores extracelulares (Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 1996b; Sierra-Paredes *et al*., 2000a), la relación entre las crisis epilépticas y las modificaciones bioquímicas en el metabolismo de las neuronas postsinápticas (Sierra-Paredes *et al*., 1999), así como la relación entre niveles de neurotransmisores extracelulares y la actividad del metabolismo en las células gliales (Sierra-Paredes *et al*., 2000a). Éstos trabajos de investigación demostraron que durante los fenómenos de despolarización neuronal paroxística inducidos por picrotoxina, que generan descargas de punta-onda en el electroencefalograma, no se producen modificaciones en las concentraciones extracelulares de glutamato, pero durante las crisis se observaron disminuciones en los niveles de glutamato y aspartato extracelulares (Sierra-Paredes *et al*., 1998). Datos neuroquímicos que coinciden con las diferencias neurofisiológicas entre la actividad no ictal (descargas de punta-onda sin crisis convulsivas) y la ictal (crisis epilépticas) establecidas por Matsumoto y Ajmone-Marsan (1964a, 1964b).

Los estudios en animales crónicos demostraron que, ni en los síndromes de estimulación neuronal intensa que pueden provocar despolarización neuronal paroxística con descargas de punta-onda en el electroencefalograma, ni durante las convulsiones, se produce un incremento en los niveles de glutamato extracelular en el hipocampo.

El conjunto de datos expuestos convierte en muy poco probable la hipótesis de la excitotoxicidad del glutamato, así como la supuesta difusión del glutamato desde el espacio sináptico hasta el líquido extracelular interneuronal, dado que los cambios en la concentración del glutamato en las sinapsis no se reflejan en las modificaciones de

la concentración extracelular. No excluyen, sin embargo, que si por cualquier causa distinta del mecanismo de la excitotoxicidad, pudiese producirse un incremento en la concentración de glutamato en el líquido extracelular interneuronal, incremento que pudiera dar lugar a alteraciones neuronales. Investigaciones anteriores indican que la aplicación directa de glutamato sobre las neuronas (Obrenovitch *et al*., 1997a; Sierra-Paredes *et al*., 2001b), de moduladores alostéricos de los receptores de NMDA como la glicina (Obrenovitch *et al*., 1997b; Sierra-Paredes *et al*., 2001b), o el incremento de la concentración de glutamato y aspartato mediante el bloqueo farmacológico de los transportadores en las neuronas y las células gliales (Sierra-Paredes *et al*., 2000a), no producen descargas paroxísticas ni convulsiones.

A pesar del hecho de que el incremento de glutamato extracelular no provoque epilepsia, no se excluye la posibilidad de que produzca otro tipo de alteraciones neuronales que podrían estar en relación con la epileptogénesis. Las investigaciones realizadas en pacientes epilépticos mediante microdiálisis previa a intervenciones neuroquirúrgicas muestran un aumento en la concentración de glutamato y otros aminoácidos en el área del foco epiléptico (During y Spencer, 1993; Chapman, 1997). Aunque los datos procedentes de estudios humanos están restringidos a pacientes con epilepsias refractarias a los tratamientos farmacológicos y son, por lo tanto, de difícil interpretación.

El hecho de que el glutamato, aspartato y glicina extracelulares puedan actuar sobre los receptores de glutamato extrasinápticos (Sierra-Paredes *et al*., 2000a; Sattler *et al*., 2000; Sierra-Paredes *et al*., 2001b; Li *et al*., 2002; Bradford y Nadler, 2004), y participar en la sincronización de las asambleas neuronales del hipocampo, sugiere que pueda jugar un papel en la dinámica de la excitabilidad neuronal (Sierra-Paredes *et al*., 2000a; Fellin *et al*., 2004; Tian *et al*., 2005).

La excitotoxicidad de las altas concentraciones de glutamato en el líquido extracelular ha sido relacionada con el proceso fisiopatológico de la epilepsia (Olney *et al*., 1986), sin embargo, recientes investigaciones sugieren que el fenómeno excitotóxico se manifiesta principalmente cuando se produce isquemia o anoxia cerebral (Choi, 1988), o en los procesos de autoinmunidad (Twyman *et al*., 1995).

Los resultados aquí detallados coinciden con otras observaciones publicadas, en las cuales se demuestra que incrementando las concentraciones de glutamato extracelular, bien por microperfusión (Obrenovitch *et al*., 1997a; Sierra-Paredes *et al*., 2001b), o bien por inhibición sostenida de los transportadores de glutamato (Massieu *et al*., 1995; Obrenovitch *et al*., 1996; Cebers *et al*., 1999; Sierra-Paredes *et al*., 2000a), no se provocan lesiones neuronales. En el caso de la glicina, la perfusión de concentraciones hasta 10 mM a través de sondas de microdiálisis, implantadas en el estriado de ratas anestesiadas con halotano, no provoca efectos tóxicos (Obrenovitch *et al*., 1997b).

A diferencia de los trabajos citados anteriormente, Sierra-Paredes *et al*. (2001b) han comprobado que, pese a no producir lesiones neuronales, descargas paroxísticas o crisis epilépticas, el incremento de las concentraciones extracelulares de glutamato y glicina en el hipocampo aumenta la excitabilidad neuronal. El glutamato y la glicina, por sí mismos, no dan lugar a crisis epilépticas, pero su acción continua sobre las neuronas facilita la aparición de crisis cuando la inhibición GABAérgica se altera por la perfusión de picrotoxina. El hecho de que el glutamato y la glicina produzcan casi el mismo efecto apunta a que su acción está probablemente ligada a la activación de receptores NMDA, ya que son los únicos receptores de glutamato que dependen de la presencia de glicina para su activación. También confirmado por el hallazgo de que el 5,7 DKA, un inhibidor competitivo del sitio de unión de la glicina en el receptor NMDA, bloquea el efecto de ambos aminoácidos (Sierra-Paredes *et al*., 2001b).

Los potenciales sinápticos epileptógenos son claramente dependientes del glutamato liberado por las vesículas sinápticas (Wheal *et al*., 1991; Rogawski, 1995). No obstante, es difícil comprender el papel de las altas concentraciones de glutamato, glicina y aspartato basándonos exclusivamente en su efecto sobre las sinapsis.

2.7. Crisis epilépticas inducidas mediante la latrunculina A

La mediación de la F-actina parece ser necesaria para la movilización de receptores NMDA y AMPA en aquellos casos en los que la neurona necesita modificar su capacidad sináptica y, como consecuencia de ello, su excitabilidad, pero también es

imprescindible para mantener o modificar la estructura morfológica de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales (Smart y Halpain, 2000).

La integridad de las espinas dendríticas parece importante para la excitabilidad neuronal, ya que los distintos tipos de receptores de glutamato se hallan preferentemente localizados y aglutinados en las espinas dendríticas (Craig *et al*., 1994; Kornau *et al*., 1997; O'Brien *et al*., 1998), que sirven como unidades de integración en el circuito sináptico y participan en gran medida en la plasticidad de las sinapsis (Harris y Kater, 1994; Yuste y Denk, 1995; Matus, 2000).

La acumulación de clusters de receptores del glutamato en las espinas depende de la actividad sináptica excitatoria (Rao y Craig, 1997; O'Brien *et al*., 1998), y de la F-actina, una proteína del citoesqueleto que aparece muy concentrada en las espinas dendríticas (Matus *et al*., 1982; Kaech *et al*., 1997), es la que proporciona la principal base estructural para su organización citoesquelética (Halpain, 2000; Matus *et al*., 2000). La localización de los receptores NMDA en las terminales sinápticas se consigue mediante la interacción de sus dominios intracelulares, elementos del citoesqueleto (Zhang *et al*., 1998; Allison *et al*., 2000; Sattler *et al*., 2000), y otras proteínas citoplasmáticas situadas en la cara interna de la membrana celular que forman parte de la denominada densidad postsináptica (Ponting *et al*., 1997) (fig. 4).

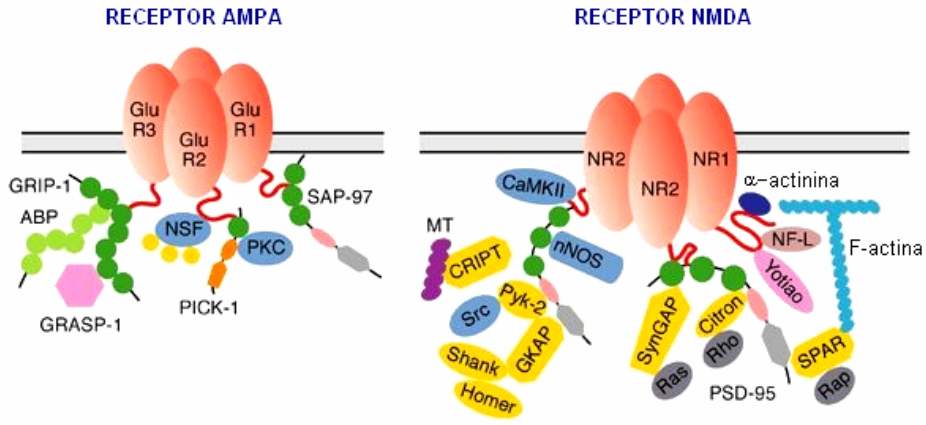


Figura 4. Detalle de proteínas de la densidad postsináptica.

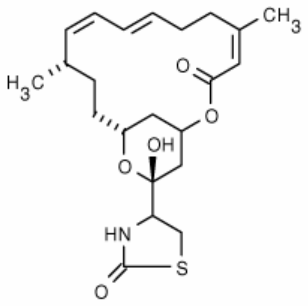
La F-actina parece ser responsable de la situación de los receptores NMDA en la posición sináptica adecuada, ya que el tratamiento con agentes despolimerizadores de la actina reduce de forma selectiva el número de agregados sinápticos de receptores NMDA, aumentando los agregados extrasinápticos (Allison *et al*., 1998; Allison *et al*., 2000; Sattler *et al*., 2000). Además, la exposición de neuronas a NMDA, *L*-glutamato, AMPA e ionomicina produce una pérdida rápida y extensa de espinas dendríticas (Halpain *et al*., 1998).

Cuando se examinan la corteza cerebral y el hipocampo de pacientes con epilepsia focal crónica, a menudo se encuentran disminuciones en la ramificación dendrítica y redistribución de los receptores de glutamato y de las subunidades que los componen (De Lanerolle *et al*., 1998). Sin embargo, es muy difícil saber si dichas alteraciones son una causa o una consecuencia de las crisis epilépticas. El orden de los eventos bioquímicos que dan lugar a un incremento en la excitabilidad neuronal es todavía desconocido. Existen numerosos mecanismos moleculares por los que el calcio puede entrar en la neurona o incrementar su concentración intracelular, y el calcio puede activar numerosos sistemas enzimáticos específicos o poner en marcha diversas vías de transducción calcio-dependientes (Bading *et al*., 1993; Ghosh y Greenberg, 1995).

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, han demostrado que la despolimerización de la actina mediante la administración de latrunculina A (fig. 5) en animales vivos, induce crisis epilépticas y alteraciones permanentes que dan lugar a un incremento crónico de la excitabilidad y a la aparición de crisis esporádicas en los animales a lo largo de seis meses (Sierra-Paredes *et al*., 2000b, 2001a; Vázquez-López *et al*., 2005; Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006).



Negombata magnifica



Latrunculina A

Figura 5. Fotografía de la esponja *Negombata magnifica* y estructura química de la latrunculina A.

La latrunculina A, una sustancia aislada de una esponja del Mar Rojo denominada *Negombata magnifica* (fig. 5), fue inicialmente identificada como un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina en células cultivadas no musculares. Basándose en los efectos de la latrunculina A al nivel de la F-actina *in vitro*, sus efectos se especularon que consistían en el secuestro de la actina monomérica formando un complejo 1:1 molar (Yarmola *et al*., 2000).

Posteriormente la latrunculina A demostró ejercer su acción en distintos tipos de células, incluidos los neuroblastomas de ratón. El tratamiento de neuronas cultivadas del hipocampo con la latrunculina A por encima de 48 horas, daba mejores resultados que el tratamiento con la citocalasina D, otra sustancia despolimerizadora de las fibras de actina. Se probaron distintos tiempos de exposición de células cultivadas, donde se verificó que a las 24 horas del tratamiento con la latrunculina A, se perdían los filamentos de F-actina de las espinas dendríticas. Incluso llegan a ser los filamentos de F-actina completamente indetectables, pero éste efecto es reversible y no causa ningún daño irreparable en las células, mientras la exposición sea de 24 horas (Allison *et al*., 1998). La latunculina A (Spector *et al*., 1983), afecta a la polimerización de la actina mediante la formación de un complejo 1:1 molar, secuestrando la G-actina y por ello causando una despolimerización neta de la actina (fig. 6) (Spector *et al*., 1989).

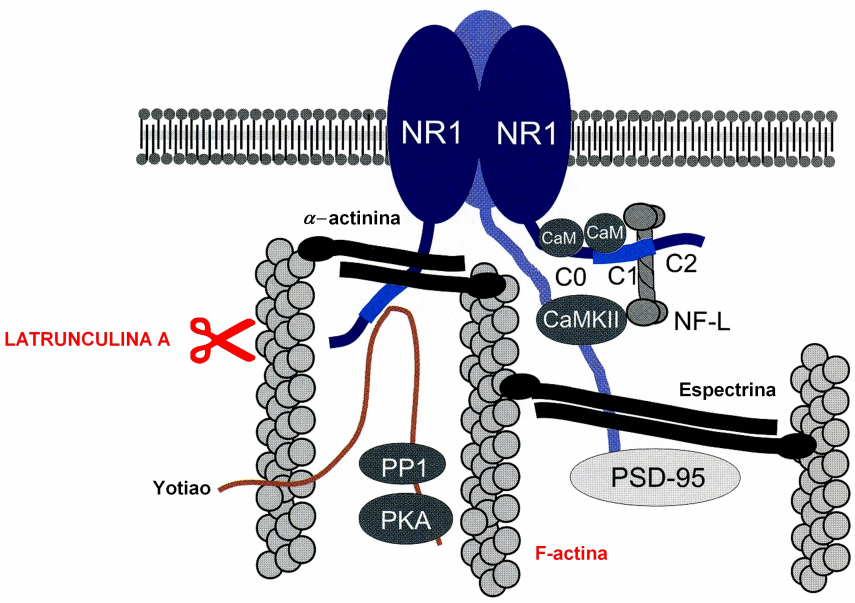


Figura 6. Esquema de la acción de la latrunculina A sobre los filamentos de actina en la membrana postsináptica (Modificado de Cowan *et al*., 2001).

La latrunculina A ha sido utilizada recientemente (Allison *et al*., 1998; Halpain *et al*., 1998; Sattler *et al*., 2000) para estudiar el papel de la F-actina en el anclaje en los lugares sinápticos de los receptores de NMDA.

Por lo tanto, además de la entrada de calcio a través de receptores NMDA, o de los mecanismos de excitotoxicidad, parecen existir mecanismos adicionales que puedan producir alteraciones en las espinas dendríticas en relación con las crisis epilépticas. Puesto que uno de los efectos de la latrunculina A *in vitro* es el desplazamiento de los receptores de glutamato a posiciones no sinápticas, es posible que su acción epileptogénica esté relacionada con el incremento de receptores NMDA y AMPA extrasinápticos. (Vázquez-López *et al*, 2005).

3. ANÁLISIS DEL ASPARTATO, GLUTAMATO Y GLICINA EN EL LÍQUIDO INTERNEURONAL

La correlación electrofisiológica y bioquímica necesaria para el estudio de modelos experimentales de epilepsia en animal vivo, requiere el análisis de los componentes del sistema glutamatérgico en el líquido intercelular recogidos a través de microdiálisis.

3.1. Antecedentes

El método tradicional de análisis de aminoácidos libres en fluidos biológicos, y base del denominado en la actualidad analizador automático de aminoácidos, fue descrito por Moore y Stein hace más de cincuenta años (Moore y Stein, 1948; Moore *et al.*, 1958; Spackman *et al.*, 1958). Consta de una columna de intercambio iónico y derivatización postcolumna con ninhidrina (Liu *et al.*, 1998). La base de la separación es un sistema de intercambio iónico basado en litio o en sodio, que se escoge según sean las muestras más o menos complejas. Para la separación se suele utilizar la combinación de distintos pHs, una fuerza iónica y un gradiente de temperaturas. Una vez que los aminoácidos reaccionan a la salida de la columna con la ninhidrina, se produce un efluente de color amarillo con una absorción máxima a 440 nm (aminoácidos secundarios), o púrpura con una absorción máxima a 570 nm (aminoácidos primarios). Éste es un método sencillo y específico para aminoácidos y algunas aminas, consiguiendo resolver en un único análisis todos los aminoácidos de interés clínico con una mínima preparación de la muestra y una buena precisión (Schwarz *et al.*, 2005). Aunque requiere un costoso equipo analizador, altos volúmenes de muestra inyectados (mucho mayores que en el caso de la cromatografía líquida), tiene una baja sensibilidad (rango de picomoles) y los análisis son muy largos, aproximadamente de dos horas (Badiou *et al.*, 2004, Schwarz *et al.*, 2005).

3.2. RP-HPLC acoplada a la detección por fluorescencia

Para la investigación en el área de las neurociencias, es muy importante conseguir una separación y una detección de los analitos selectiva y sensible (Fukushima *et al.*, 2003). Hasta el momento la cromatografía líquida de alta resolución

en fase reversa (RP-HPLC) y la electroforesis capilar, han demostrado ser las metodologías analíticas con mejor selectividad, ya que se mejora la eficacia en la separación de los analitos de interés de las sustancias que puedan interferir. Al mismo tiempo, si el analito de interés está presente en una concentración submicromolar o picomolar, es fundamental una detección muy sensible para una determinación precisa y exacta. El sistema de cromatografía líquida de alta resolución unida a fase reversa se ha utilizado desde los años 70, gracias a él se pueden separar analitos en pequeños volúmenes de muestra y lograrlo con unos tiempos de análisis relativamente cortos. Mediante la RP-HPLC y utilizando una separación en gradiente se consigue la determinación de un gran número de analitos en un único análisis, unas ventajas importantes teniendo en cuenta que las muestras biológicas son matrices muy complejas.

Para lograr que la detección sea selectiva y sensible se recurre a la capacidad de algunas sustancias para emitir una fuerte luz al ser excitadas (fluorescencia). Con los detectores de fluorescencia se consiguen unos cromatogramas más “limpios” y una menor variabilidad en la intensidad de la lámpara, en comparación con la tradicional detección por ultravioleta (Strydom y Cohen, 1994). Mediante el proceso de derivatización, se transforman las sustancias que no tienen la capacidad de ser fluorescentes por sí mismas, en sustancias fluorescentes. El reactivo derivatizante ideal sería aquel con el poder de reaccionar rápida y cuantitativamente con los analitos, dando como resultado compuestos con alta capacidad fluorescente y con una amplia diferencia de longitud de onda de excitación y emisión, evitando así la posible interferencia de sustancias no deseables presentes en la muestra y que también podrían ser fluorescentes (Fukushima *et al*., 2003). Existen gran cantidad de reactivos derivatizantes que cumplen éstos requisitos, la mayoría de ellos reaccionan selectivamente con diferentes grupos funcionales presentes en el analito, como grupos amino, tiol, carboxilo, etc.

3.2.1. Reactivos derivatizantes relevantes

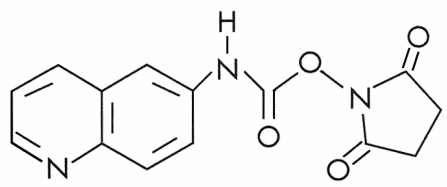
Se han utilizado distintos reactivos derivatizantes para la determinación de aminoácidos en fluidos biológicos. Uno de los más empleados como método precolumna es el FMOC-Cl (9-fluorenilmetil cloroformato), que reacciona en tan sólo

treinta segundos a temperatura ambiente con aminoácidos primarios y secundarios, creando compuestos estables altamente fluorescentes. El mayor problema es que el exceso de derivatizante tiene que eliminarse mediante extracción con un disolvente orgánico (como el pentano), ya que tiene las mismas características fluorescentes que los productos de derivatización y, después de reaccionar con el agua, provoca un gran pico cromatográfico que interfiere con la determinación de los aminoácidos derivatizados. Ésta etapa es engorrosa y además los aminoácidos presentes en la muestra también se extraen con el disolvente orgánico (Reverter *et al*., 1997), lo que disminuye su cantidad final. Para intentar eliminar el paso de la extracción se propusieron algunas soluciones, como añadir después de la derivatización sustancias que reaccionen con el exceso de reactivo, formando un complejo que eluye al final del análisis, y no obstaculiza en el estudio de los aminoácidos. Se logra mejorar así la cantidad de reactivo que interfiere, pero no se consigue eliminarlo del todo (Molnár-Perl, 2003; Josefsson, 2005). La eficacia del método general se ve limitada por la presencia de sales o detergentes (Cohen y Michaud, 1993). Se utiliza tanto detección ultravioleta como por fluorescencia, con ésta última el límite de detección se sitúa en el rango de fentomoles.

El método precolumna (también empleado como postcolumna) más generalizado para el análisis de aminoácidos procedentes de muestras de cerebro tanto de microdiálisis como de tejido, es la derivatización con *orto*-ftalaldehido (OPA) en presencia de un reactivo tiol: *β*-mercaptoetanol, *tert*-butiltiol, ácido 3-mercaptopropiónico o *N*-acetil-*L*-Cisteína (Gamache *et al*., 1993; Soto-Otero *et al*., 1994; Kehr, 1998; Liu *et al*., 1998; Yang *et al*., 1999; Bianchi *et al*., 1999; Piepponen y Skujins, 2001; Parent *et al*., 2001; Parada y Soares-da-Silva, 2002; Bianchi *et al*., 2003; Rabouan *et al*., 2003; Van Hemelrijck *et al*., 2005; Molnár-Perl, 2005). Una modificación del método descrito por Soto-Otero *et al.* (1994) ha sido utilizada para el análisis de aminoácidos obtenidos por microdiálisis (Sierra-Paredes *et al*., 2000a). Éstos reactivos presentan como ventaja destacable que al no ser fluorescentes no interfieren en el análisis posterior de los aminoácidos derivatizados. Como inconveniente señalar su poca estabilidad, lo que hace que deban ser preparados diariamente. Los límites de detección de éstas técnicas están en el rango de picomoles.

3.2.2. El AQC, características y avances destacables

Los primeros autores en desarrollar el 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (fig. 7) como derivatizante precolumna fueron Cohen y Michaud en 1993. El AQC es un carbamato heterocíclico *N*-hidroxisuccinimidil activado, una nueva clase de reactivos derivatizantes de aminas.



AQC

Figura 7. Estructura química del 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC).

La característica fluorescente única de los compuestos relacionados con el AQC permite el análisis de aminoácidos, sin apenas interferencias ni por parte de los productos formados, ni por el exceso de derivatizante. En comparación con otras técnicas precolumna, la reacción se lleva a cabo incluso en presencia de la mayoría de los tampones, de sales y de detergentes (Cohen y Michaud, 1993).

Durante la reacción de derivatización (fig. 8) los aminoácidos primarios y secundarios reaccionan en segundos (a pH 8,8 la reacción se completa en 15 segundos) con el reactivo AQC, dando como resultado productos estables altamente fluorescentes del tipo urea. La reacción tiene que llevarse cabo en un rango de pH de entre 8,0 y 10,5, ya que por encima de 10,5 la hidrólisis del reactivo es muy rápida impidiendo una buena mezcla de éste con la muestra. Por debajo de 8,0 hay una incompleta derivatización de algunos aminoácidos, como el aspartato, glutamato, valina o alanina (Cohen, 2005).

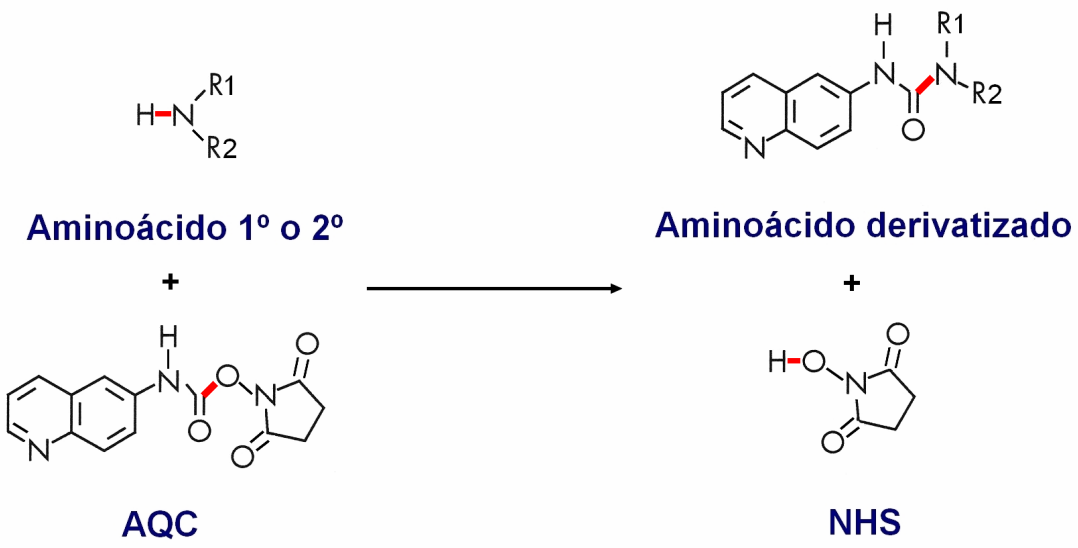


Figura 8. Reacción de derivatización de los aminoácidos con el AQC.

El exceso de AQC se hidroliza espontáneamente produciendo 6-aminoquinolina (AMQ), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y dióxido de carbono (fig. 9), después de apenas un minuto se completa el proceso de derivatización e hidrólisis. Los compuestos derivatizados resultantes son estables a temperatura ambiente durante más de una semana, Díaz *et al.* (1996) afirman que después de tres semanas la señal no disminuye, lo que permite automatizar la técnica para análisis en continuo durante largos períodos de tiempo. Incluso los compuestos derivatizados pueden mantenerse refrigerados durante más de un mes sin problemas (Cohen, 2005).

Los compuestos derivatizados resultantes pueden detectarse por fluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 250 nm y de emisión de 395 nm, o por absorbancia a 248 nm. El AMQ, a ésta longitud de onda de excitación, presenta una capacidad máxima fluorescente de emisión a 520 nm y para absorbancia es de 257 nm (Liu, 1994), por ello el pico cromatográfico del AMQ no interfiere en ningún caso en el análisis de los aminoácidos. Tampoco interfieren el NHS, ya que no es fluorescente (Díaz *et al.*, 1996), ni el dióxido de carbono (Cohen y Michaud, 1993; Cohen, 2000).

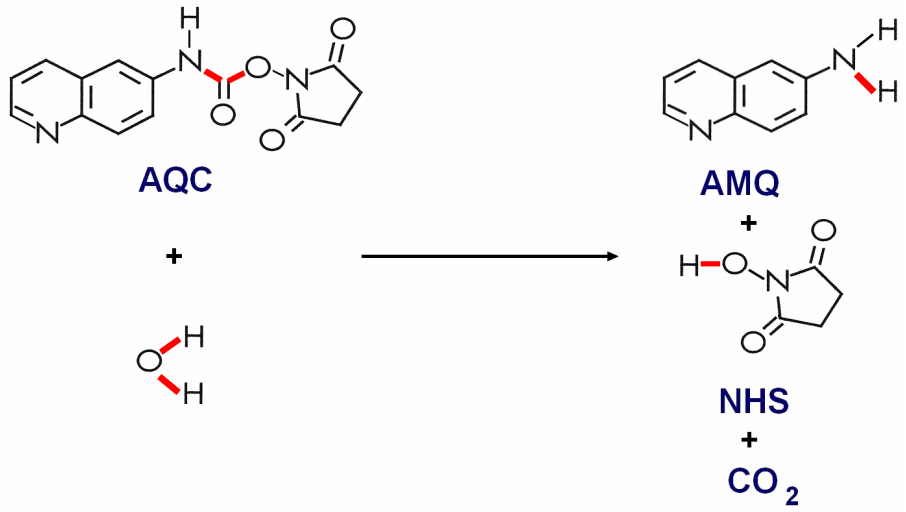


Figura 9. Reacción de hidrólisis espontánea del AQC.

Cuando el amoníaco está presente originalmente en las muestras (blanco/patrones/microdiálisis), por ejemplo como sales de amonio, se elimina durante la derivatización con PICT (fenilisotiocianato), pero permanece cuando se utiliza AQC. El amoníaco no proviene de la reacción de derivatización como producto secundario de la misma, sino que aparece inevitablemente por varias causas: por una degradación natural de los aminoácidos, tanto para las muestras como para los patrones, y en el ambiente, aunque sea en proporciones muy bajas suele haber amoníaco que también puede contaminar la muestra y aparecer en el cromatograma (blanco). Cuando está presente en gran cantidad, puede provocar una derivatización incompleta o provocar un pico cromatográfico que puede llegar a interferir en la medida de diferentes aminoácidos (Strydom y Cohen, 1994).

Las ventajas de éste método incluyen una derivatización muy sencilla y rápida, compuestos derivatizados muy estables, con una buena respuesta lineal y muy reproducible (incluso en presencia de sales y detergentes) (Cohen y De Antonis, 1994; Van Wandelen y Cohen, 1997), una separación excelente y la posibilidad de utilizar reactivos comercializados. Al mismo tiempo, la detección por fluorescencia permite análisis con una alta sensibilidad, y límites de detección entre 50 y 300 fentomoles (Cohen, 2000). Las desventajas son pocas en comparación con las ventajas: unos

tiempos de análisis cromatográficos relativamente largos, y un alto consumo de disolventes.

La técnica originalmente se utilizó para el análisis de aminoácidos procedentes de hidrolizados de péptidos y proteínas, con detección ultravioleta o fluorescente, como describen Cohen y Michaud (1993). Posteriormente también Cohen y de Antonis (1994) la utilizan para la determinación de aminoácidos en cereales, disoluciones intravenosas y glucoproteínas, comparando la detección por fluorescencia con la ultravioleta, demostrando, además de la versatilidad del método, que con la detección por fluorescencia los límites de detección logrados eran menores y más adecuados para determinadas muestras. Strydom y Cohen (1994) comparando la derivatización con PICT y AQC, afirman que con diferencia el AQC resulta mejor derivatizante de aminoácidos e incluso, que con el PICT no se tienen buenos resultados analizando muestras procedentes de hidrolizados de proteínas, a pesar de obtenerlos con patrones.

El estudio cuidadoso de las distintas metodologías desarrolladas por Cohen y colaboradores (Cohen y Michaud, 1993; Strydom y Cohen, 1994; Cohen y De Antonis, 1994; Van Wandelen y Cohen, 1997), para cuantificar aminoácidos procedentes de hidrolizados de proteínas, y más concretamente Liu *et al.* (1998) que variando la técnica original, analiza aminoácidos procedentes de muestras de microdiálisis del cerebro de rata, sugirió la conveniencia de perfeccionarlas para disponer de un método más sencillo y eficaz para utilizar en las investigaciones de esta memoria (Oreiro-García *et al*., 2005).

4. ESLICARBAZEPINA ACETATO O BIA 2-093 (ECA)

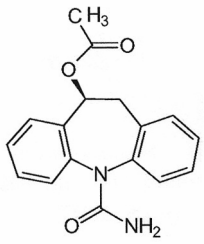
La carbamazepina (CBZ) es un derivado dibenzo[*b*,*f*]azepínico sintetizado en 1960 por Schindler (Schindler, 1960), es el fármaco más prescrito para el tratamiento de ataques epilépticos parciales y secundariamente generalizados, también está prescrito para el dolor neuropático (neuralgia del trigémino), y para la psicosis esquizo-afectiva (manía y tratamiento profiláctico de la enfermedad maniaco-depresiva).

Aunque es un fármaco muy efectivo, aproximadamente un 30% o 40% de los pacientes con epilepsia crónica no responden o no son bien controlados con éste tratamiento (Benes *et al*., 1999). De los pacientes que sufren epilepsia crónica entre un 33% y un 50% sufren efectos tóxicos no deseados, como náuseas, vómitos, cefalea, ataxia, somnolencia, fatiga, diplopía, vértigo o reacciones alérgicas cutáneas (Almeida y Soares-da-Silva, 2004). La CBZ, vía oral, tiene una absorción lenta, errática e impredecible, por ello la medicación y la polimedicación especialmente, es complicada. Éste derivado dibenzo[*b*,*f*]azepínico se metaboliza en gran medida, vía complejo citocromo P450 (isoforma CYP3A4), en su principal metabolito farmacológicamente activo: carbamazepina-10,11-epóxido, que se convierte rápidamente en un *trans*-carbamazepin-diol (*trans*-10,11-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina) farmacológica-mente inactivo, por una enzima microsomal. Los metabolitos formados, en especial la carbamazepina-10,11-epóxido, son los responsables de su toxicidad neuronal y general. Otro inconveniente importante, es la capacidad que tiene la CBZ de ejercer una potente activación de las enzimas microsomales hepáticas, causando la auto inducción de su metabolismo (Hainzl *et al.*, 2001).

A concentraciones terapéuticas, la CBZ tiene una acción específica para prevenir ataques sin disminuir la actividad eléctrica normal del cerebro. Aunque el mecanismo por el cual ejerce su acción antiepiléptica no está claro, se propuso que inhibe los canales de sodio voltaje-dependientes, que inhibe los canales de calcio, y que interacciona con los receptores de adenosina, entre otros mecanismos (Ambrósio *et al*., 2002). Basándose en la interacción con los sitios envueltos en la activación de los canales de sodio, y en la modulación de la entrada y de la corriente de sodio, la inhibición de los canales de sodio parece ser el mecanismo de acción más probable, para su efecto anticonvulsivante, aunque no el único (Benes *et al.*, 1999).

Posteriormente se realizaron distintas modificaciones en la estructura química de éste fármaco, pero no es hasta 1.990 con la aparición de la oxicarbazepina (OXC), un análogo de la CBZ, cuando se logra una mejorada actividad antiepiléptica. La OXC tiene la ventaja frente a la CBZ, de una baja incidencia en las reacciones alérgicas y una menor inducción enzimática, ya que no se forma el metabolito tóxico carbamazepina-10,11-epóxido, pero parece tener una menor potencia anticonvulsivante (Almeida y Soares-da-Silva, 2004). En el caso de la terapia combinada con otros antiepilépticos, la OXC es normalmente mejor tolerada que la CBZ. De todos modos, la toxicidad neuronal de éste fármaco todavía no se ha investigado (Ambrósio *et al*., 2000).

El BIA 2-093 o eslicarbazepina acetato (ECA) (fig. 10) es un compuesto cabeza de serie derivado de la dibenzo[*b*,*f*]azepina-5-carboxamida. Se diseño para mejorar la eficacia y la seguridad de sus compuestos relacionados: la CBZ y la OXC. Logrando así minimizar la degradación hacia metabolitos tóxicos como epóxidos e impurezas enantioméricas, y la producción innecesaria de enantiómeros o diasteroisómeros de los metabolitos y conjugados, que se producen en éste tipo de compuestos. La fórmula química de éste compuesto es *S*-(—)-10-acetoxi-10,11-dihidro-5*H*-dibenzo[*b*,*f*]azepina-5-carboxamida.



ESLICARBAZEPINA ACETATO

Figura 10. Estructura química de la eslicarbazepina acetato (ECA) o BIA 2-093. (Modificado de Almeida y Soares-da-Silva, 2004).

Comparte con la CBZ y la OXC (fig. 11) el núcleo dibenzoazepina con un grupo funcional sustituido 5-carboxamida, pero es estructuralmente diferente en la posición 10,11. Gracias a ésta variación molecular se evita la formación de metabolitos epoxi,

como el carbamazepina-10,11-epóxido, sin perdida de su potencia anticonvulsivante (Benes *et al*., 1999).

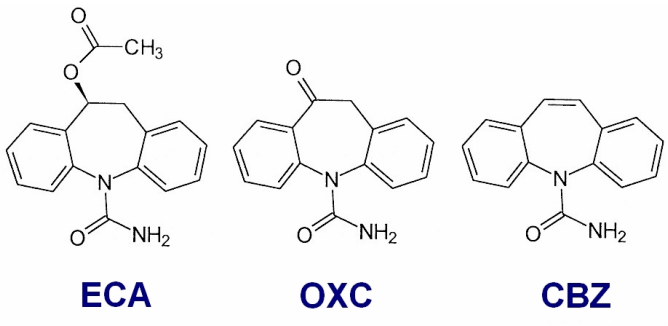


Figura 11. Comparación de las estructuras químicas de diferentes fármacos antiepilépticos relacionados con el ECA. (Modificado de Bonifacio *et al*., 2001).

La ECA ejerce una función como potente bloqueador de los canales de sodio voltaje-dependientes, exactamente interfiere con el sitio 2 del estado inactivado del canal, con una potencia inhibidora similar a la CBZ (Bonifácio *et al*., 2001), y aparentemente no interfiere ni con los receptores benzodiazepínicos, ni con los del ácido γ-amino butírico (GABA), ni con los del glutamato (Ambrósio *et al*., 2001). Es un compuesto que protege de una manera dosis dependiente el desarrollo de ataques epilépticos, en los modelos de epilepsia predictivos de eficacia anticonvulsivante, como en el modelo *kindling* y en el de crisis por electroshock (MES).

En el modelo de rata ha demostrado ser particularmente efectivo ante los MES y una gran variedad de agentes convulsivantes. Demostrando en éste caso, una potencia anticonvulsivante similar a la CBZ y mayor que la de la OXC al administrarse por vía gástrica, produciendo menor daño neuronal (Benes *et al*., 1999). Un perfil que indica, que como otros fármacos antiepilépticos, puede ejercer propiedades anticonvulsivantes al interferir selectivamente con las neuronas excitadas sobre las que muestran una actividad normal (Almeida y Soares-da-Silva, 2004). En relación al metabolismo en rata, el ECA se transforma en su mayor parte en OXC, y en menor medida produce el metabolito *trans*-carbamazepin-diol (Hainzl *et al*., 2001).

Ambrósio *et al*. (2000) estudió su carácter tóxico, observado como apoptosis, al administrar CBZ, OXC y ECA a neuronas cultivadas de hipocampo de embriones de rata. Éstos autores comprueban que el ECA causa menor toxicidad neuronal que la CBZ o la OXC, además de ser éstos últimos más tóxicos a menor concentración. En 2004, Araújo *et al*. realizaron también estudios de toxicidad en neuronas cultivadas del hipocampo de embriones de rata tratadas con CBZ, OXC y ECA, examinando evidencias morfológicas de marcadores neurodegenerativos y sugiriendo que éste nuevo fármaco no es tan tóxico como la CBZ o la OXC.

Entre otras características de la ECA está la inhibición de la liberación del glutamato endógeno de un modo dependiente de la concentración, en los sinaptosomas del hipocampo, debido a la inhibición de los canales de sodio voltaje-dependientes, aunque con menor potencia que la CBZ y la OXC. La ECA no afecta a los canales de calcio voltaje-dependientes, ni a los receptores ionotrópicos de glutamato. Además produce un deterioro neuronal y motor menor, ejerciendo un efecto protector neuronal mayor que otras dibenzo[*b*,*f*]azepina-5-carboxamidas (Ambrósio *et al*., 2002). Tanto la ECA, como la CBZ y la OXC, causan deterioro neuronal dosis-dependiente en ratas. Cuando los compuestos se administran vía intraperitoneal, el grado de protección de la ECA es mayor que en el caso de la CBZ y la OXC (Ambrosio *et al*., 2000).

Comparando el metabolismo *in vitro* de la ECA con el de la OXC, se observa, que la ECA es un fármaco preferible sobre la OXC ya que tiene un metabolismo en humanos mas “limpio” (Hainzl *et al*., 2001). La farmacocinética clínica en humanos (fig. 12) muestra que la ECA administrada por vía oral, se metaboliza rápidamente en su mayor metabolito con capacidad anticonvulsivante: la licarbazepina (99%) y en menor medida produce oxicarbazepina. Las concentraciones plasmáticas máximas de su metabolito mayoritario, se consiguen de dos a tres horas después de la administración, y el estado estable en plasma dentro de los cuatro o cinco días, después de administrarlo una o dos veces al día. La vida media de eliminación es de 20 a 24 horas, y la eliminación del principal metabolito o de sus conjugados es principalmente renal. Los resultados de la administración conjuntamente con alimento, muestran que la su presencia no varía ni la farmacocinética de la ECA, ni la de sus metabolitos

(Almeida *et al*., 2005). Los estudios de toxicidad dosis-única o dosis-repetida revelan un perfil de seguridad muy favorable (Almeida y Soares-da-Silva, 2004).

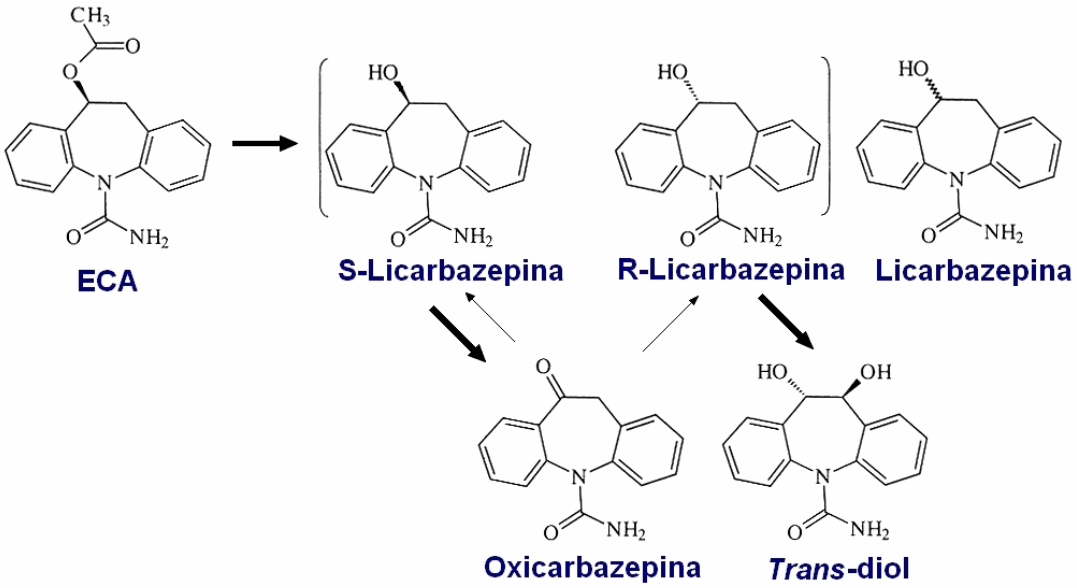
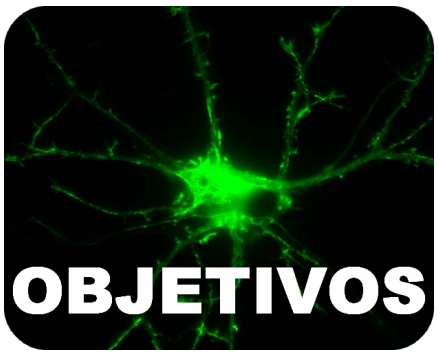


Figura 12. Detalle de la vía metabólica propuesta para la eslicarbazepina acetato. (Modificado de Almeida y Soares-da-Silva, 2004).


OBJETIVOS

Recientemente el Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, ha desarrollado un nuevo modelo experimental de epilepsia en rata, basado en la acción de la latrunculina A como agente despolimerizador de la actina.

La latrunculina A provoca alteraciones en la excitabilidad de las neuronas, que dan lugar a la aparición de ataques epilépticos espontáneos entre uno y seis meses después de su administración. Una posible explicación de éste efecto es el movimiento de los receptores sinápticos de NMDA a localizaciones extrasinápticas, como ya se ha descrito *in vitro*, por la despolimerización de las fibras de actina localizadas en las espinas dendríticas.

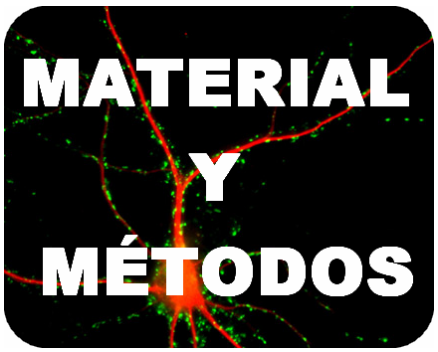
Establecido el modelo, y una vez se han estudiado los registros electroencefalográficos, es necesaria una investigación más profunda de los posibles cambios en las concentraciones de aminoácidos neuroactivos relacionados con los receptores NMDA. Apoyándose en el nuevo modelo también se ensayó el potencial efecto de un nuevo fármaco en fase III de experimentación, la eslicarbazepina acetato o ECA, diseñado por Laboratorios BIAL (San Mamede do Coronado, Portugal).

- Desarrollo de una metodología analítica, adecuada para el estudio de las concentraciones de aminoácidos libres procedentes de microdiálisis en el hipocampo de la rata, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y detección por fluorescencia.

- Efecto de la administración oral de distintas dosis de ECA, sobre las crisis epilépticas inducidas por la latrunculina A.

- Efecto agudo y crónico, de la perfusión de la latrunculina A, sobre la concentración de los aminoácidos extracelulares en el hipocampo de la rata.

- Efecto de la administración oral de distintas dosis de ECA, sobre las modificaciones en las concentraciones de aminoácidos extracelulares producidas por la latrunculina A.


MATERIAL
Y
MÉTODOS

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. Instrumentación general

- Balanza analítica electrónica Premium Serie Genius ME 235S, Sartorius.
- Baño de ultrasonidos 2510, Branson.
- Cámara de congelación a -20ºC.
- Cámara de vídeo, JVC.
- Cámara frigorífica.
- EEG Minihuit Alvar.
- Equipo de estereotaxis para pequeños animales, David Kopf.
- Holter-EEG Oxford Medilog 9200.
- Incubador de baño seco 36401-03, Cole-Parmer.
- Microscopio SMZ-1, Nikon.
- Monitor de televisión y reproductor de vídeo.
- pH-metro GLP 21, Crison.
- Pipetas automáticas y puntas Eppendorf.
- Sistema de microdiálisis para animal libre, CMA/120.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q, Millipore.
- Sondas de microdiálisis CMA/12.
- Vórtex Atomixer.

1.2. Reactivos y disolventes de RP-HPLC

El reactivo derivatizante AccQ-Fluor y la fase móvil concentrada AccQ-Tag utilizados, forman parte del método comercial de análisis de aminoácidos procedentes de hidrolizados de proteínas y péptidos denominado AccQ-Tag, de Millipore Corporation (Milford, MA, USA). El kit de derivatización AccQ-Fluor consiste en el reactivo AQC en polvo, acetonitrilo para su disolución y una disolución de borato sódico 0,2 M con un pH de 8,8. La fase móvil concentrada contiene 1,4 M acetato sódico trihidratado, 17,0 mM TEA (trietilamina) con 10,0 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,01% azida sódica, todo ello ajustado a un pH de 5,02 con ácido fosfórico al 10%.

El acetonitrilo calidad HPLC para gradiente, fue adquirido a Productos Químicos Romil (Cambridge, England). El agua ultrapura procede de un equipo Milli-Q de Millipore Corporation (Milford, MA, USA).

1.3. Sustancias utilizadas en los experimentos de microdiálisis

Los aminoácidos utilizados como patrones (ácido aspártico, ácido glutámico y glicina) provienen de Sigma (St. Louis, MO, USA).

La latrunculina A procede de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). La ECA y la carboximetilcelulosa las suministró Laboratorios BIAL (San Mamede do Coronado, Portugal).

El resto de sustancias utilizadas durante los experimentos fueron suministradas por Sigma (St. Louis, MO, USA).

1.4. Animales

Como animales de experimentación se han utilizado 36 ratas macho Sprague-Dawley con un peso inicial entre 250 y 300 g, obtenidas del animalario de la Universidad de Santiago de Compostela.

Los animales son mantenidos inicialmente en grupos de cuatro con libre acceso a comida (pienso comercial) y agua. Una vez operados, se trasladan a cajas individuales especialmente diseñadas para evitar que se dañen el montaje. El medio ambiente en el que se encuentran está sometido a condiciones controladas de temperatura 21±1ºC, humedad 50-60% y ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas.

El cuidado de los animales y todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la legislación española sobre el uso de animales para la experimentación y otras finalidades científicas: “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986). Se ha utilizado toda la tecnología y cuidados para evitar sufrimientos a los animales de experimentación. Los protocolos

con animales crónicos utilizados para los experimentos de microdiálisis, se han planteado de acuerdo a una metodología que permite reducir el número de animales. Al realizar experimentos crónicos a lo largo de varios meses es posible someter a cada animal a múltiples experimentos, con un mínimo de una semana de intervalo entre un experimento y el siguiente. Al finalizar los experimentos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previa administración de CO_2.

1.5. Preparación quirúrgica de los animales

Para la intervención las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/Kg) administrado intraperitonealmente. Después son colocadas en una unidad de estereotaxis para pequeños animales (David Kopf, Tujunga, USA). Se procede al rasurado de la cabeza y esterilización de la piel. Con material quirúrgico previamente esterilizado, se realiza una incisión longitudinal media del cuero cabelludo y se separa la piel para dejar a la vista los huesos craneales. Sobre las regiones frontales y occipitales de cada hemisferio, se enroscan dos tornillos de acero inoxidable de reducidas dimensiones con cables soldados, para ser utilizados como electrodos para el registro electroencefalográfico. Además se fija otro tornillo de las mismas características en la línea media, 7-9 mm por delante de la sutura coronal, para ser utilizado como conexión a tierra.

La colocación de la cánula intracerebral para el paso de la sonda de microdiálisis (CMA/12, CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suecia), una vez que ha sido esterilizada con etanol al 70% y lavada en Ringer estéril (147,0 mM ClNa; 4,0 mM ClK; 2,4 mM Cl_2Ca), se realiza introduciéndola verticalmente hasta el borde superior del hipocampo ventral. Las coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el altlas de Paxinos y Watson (1997) son: 5 mm posterior, 4,8 mm lateral y 4 mm ventral con relación a bregma para el extremo intracerebral de la cánula en relación a la superficie de la duramadre (fig. 13).

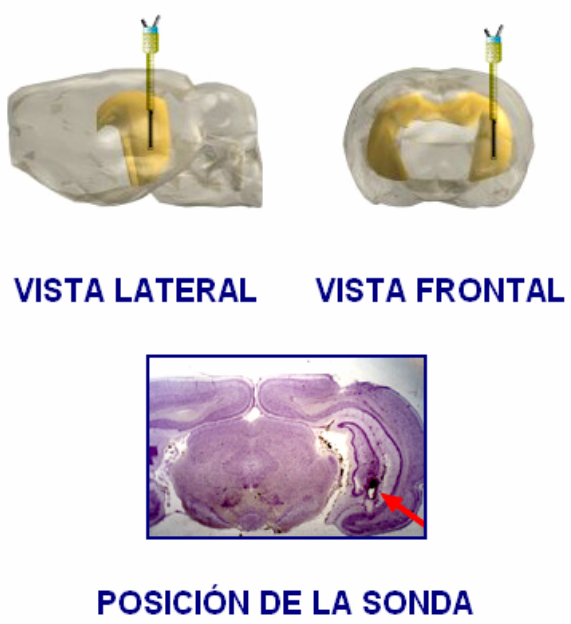


Figura 13. Posición de la cánula y de la sonda de microdiálisis en el hipocampo ventral de la rata. La flecha roja señala la posición exacta de la membrana de la sonda.

Los cables de los tornillos que actúan como electrodos se sueldan a un microconector (Cannon MD1-9SL1, USA) que se fija firmemente al cráneo con cemento acrílico dental. La figura 14 permite comprobar cómo se puede realizar el experimento que se describirá a continuación.

Después de la intervención quirúrgica, al animal se le coloca un collarín y se le somete a los cuidados postoperatorios estándar, administrándole una terapéutica antibiótica con amoxicilina (10 mg/Kg diarios) vía subcutánea durante un período de 4 o 5 días. A partir de la intervención las ratas son colocadas en cajas individuales.

Al terminar todos los estudios realizados en un animal, se le anestesia con pentobarbital sódico, se introduce la microsonda, y se perfunde Sudán Negro para localizar la posición de la zona de microdiálisis. Se sacrifica al animal por decapitación y se extrae el cerebro, que es conservado en una disolución de formaldehido al 4% tamponada con fosfato. Una semana más tarde el cerebro se corta en secciones coronales de 50 mm y se le trata con cresil-violeta para verificar la posición de la sonda con la ayuda de un microscopio óptico (fig. 13).

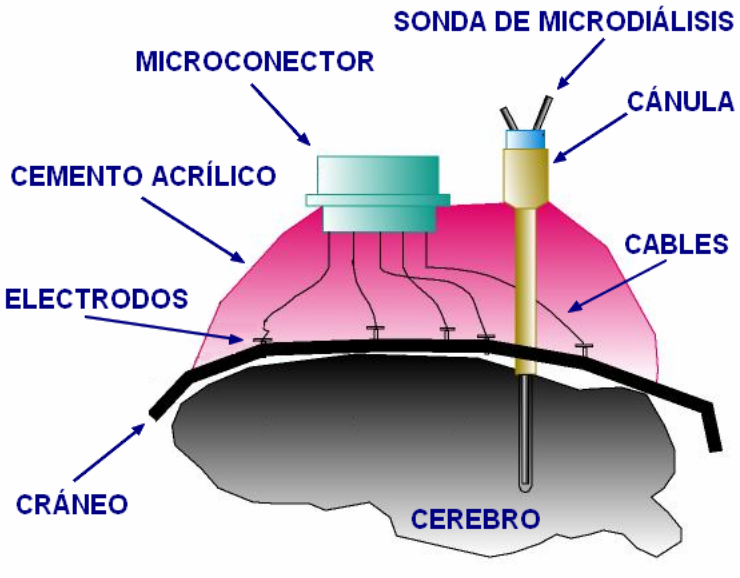


Figura 14. Esquema del montaje, mostrando todos los componentes.

1.6. La sonda de microdiálisis

La técnica de microdiálisis emplea el principio de diálisis (fig. 15) en el que un catéter con una membrana semipermeable al agua y a pequeñas moléculas, se introduce en un determinado tejido. Por el interior de éste catéter se perfunde un líquido que tiende a equilibrar las concentraciones a ambos lados de la membrana, permitiendo así la difusión de analitos desde el líquido extracelular al interior del catéter (Chaurasia, 1999).

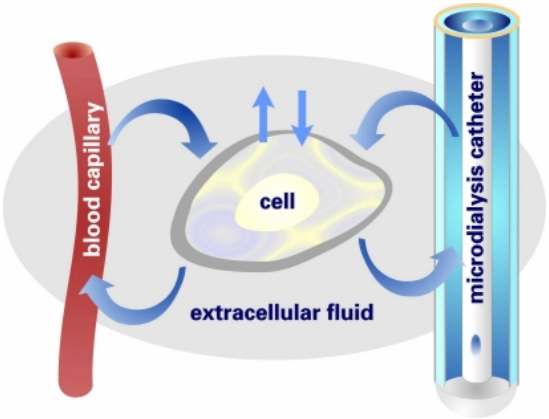


Figura 15. Esquema del principio de diálisis.

La herramienta básica de la técnica de microdiálisis es una membrana tubular semipermeable o sonda de microdiálisis. La sonda se coloca en un tejido o medio biológico, en este caso el cerebro. Se conecta mediante un tubo a una jeringa que forma parte de una bomba de microperfusión encargada de impulsar, con un flujo entre 0,5 y 5 µl/min. el medio de perfusión, que es una disolución que imita la composición iónica del líquido extracelular del cerebro. Las sustancias endógenas, como los neurotransmisores, difunden del líquido extracelular al líquido de perfusión. La membrana de diálisis no permite el paso de sustancias de alto peso molecular y enzimas que podrían interferir en análisis de los analitos de interés. El líquido perfundido llega a través de otro tubo de polietileno hasta un colector de fracciones donde se recogen las muestras. Dependiendo del tamaño de poro de la membrana de la sonda, así será el tamaño máximo de los analitos que se recojan (Parent *et al.*, 2001).

Existen distintos tipos de sonda: lineal, curva, *side-by-side* y concéntrica. La elección depende del lugar donde se vaya a implantar. La concéntrica (fig. 16) es la más utilizada para la diálisis de tejidos *in vivo* como el cerebro, tejido vascular o sistémico. Se basa en una pieza cilíndrica de membrana sellada en el extremo de entrada al tejido, al otro extremo se une un tubo de metal sólido que forma el cuerpo de la sonda con una cánula, donde están situados los tubos de entrada y salida hacia la bomba de microperfusión y al colector de fracciones. El líquido de perfusión es bombeado a través del cuerpo de la sonda, que llega a la membrana donde se produce la diálisis, y finalmente el dializado se recoge del espacio entre la membrana y el cuerpo metálico (Ungerstedt, 1991). La rigidez de las sondas concéntricas permite una estabilidad mecánica y una buena resistencia en el lugar donde se implanten.

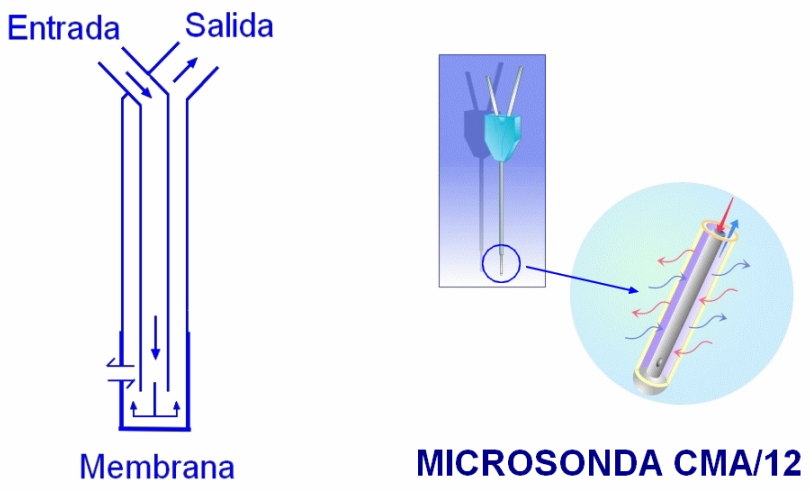


Figura 16. Estructura básica de la sonda de microdiálisis y sonda concéntrica CMA/12 con detalle de la membrana de diálisis.

1.7. Realización de los experimentos de microdiálisis

Los experimentos se realizan en ratas no anestesiadas y con libertad de movimientos, y se inician tras un período de reposo postoperatorio de diez días. Desde el cuarto día después de la intervención, los animales se colocan durante tres horas en la unidad utilizada para la realización de los experimentos (fig. 17) con la finalidad de que se habitúen, y para la realización del registro electroencefalográfico de control durante el estado de vigilia y de sueño, para comprobar que el cerebro no ha sufrido alteraciones inesperadas durante la intervención quirúrgica.

El electroencefalograma en derivaciones bipolares es registrado en cinta magnética usando un sistema Holter-EEG (Oxford Medilog 9200, Oxford, UK), y en papel con un electroencefalógrafo Minihuit (Alvar Electronics, Paris, Francia).

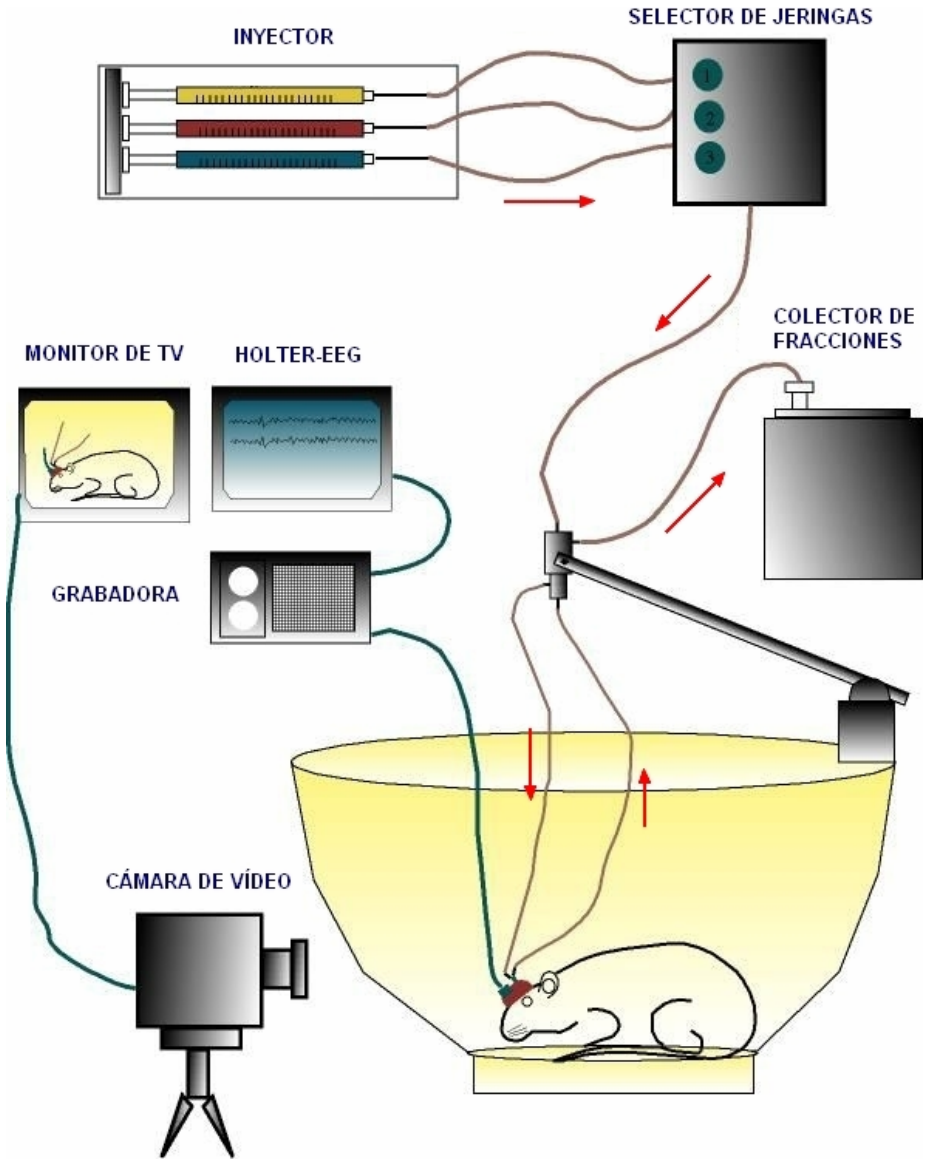


Figura 17. Esquema del sistema experimental.

Pasado el período de 10 días de reposo postoperatorio, el tiempo de realización de un experimento se distribuye de la siguiente forma:

a) Se realiza un período de registro electroencefalográfico previo a la introducción de la microsonda. A continuación y tras la colocación de la sonda, un nuevo registro durante tres horas, que permite comprobar que la introducción de la sonda no produce alteraciones electroencefalográficas.

Los animales fueron divididos en 4 grupos de experimentación:

b) En el primero de los grupos, se realizaron perfusiones de 8 horas cada día de latrunculina A (4 µg/ml) durante tres días consecutivos, con toma de muestras de microdiálisis cada hora.

Los animales descansaron durante un mes, en el que sólo se realizaron controles electroencefalográficos. Después del mes se procedió a la toma de nuevas muestras de microdiálisis, cada hora durante 8 horas.

d) En los otros tres grupos se administró latrunculina A siguiendo el mismo protocolo anterior. Previamente a cada grupo se les administró la dosis de ECA correspondiente a 3 o 10 o 30 mg/Kg, por vía oral a través de una sonda esofágica.

f) Se realizaron controles semanales de ocho horas diarias, con perfusión de Ringer a todos los animales y recogida de muestras de microdiálisis cada hora.

Todas las sesiones de habituación, así como todas las sesiones experimentales en toda su duración son registradas en vídeo utilizando una cámara estándar con la finalidad de poder comparar la conducta del animal (estado de vigilia, sueño o crisis epiléptica) con el trazado registrado en el electroencefalograma.

Para la realización de los experimentos se utilizó el equipo CMA/120 para animales con libertad de movimientos (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suecia) y microsondas CMA/12 con una membrana de microdiálisis de 4 mm de longitud (fig. 16). La microsonda está conectada mediante un tubo de polietileno a un selector de jeringas (CMA/111), que a su vez se conecta a una jeringa de 1 ml montada sobre una bomba de microinyección (CMA/100). Las muestras de microdiálisis son recogidas en viales de polipropileno con una capacidad máxima de 300 µl, utilizando un colector de fracciones refrigerado (CMA/170). Una vez recogidos los viales con las muestras, son etiquetados y congelados a -20ºC hasta el momento de su análisis en el sistema cromatográfico.

Después de comprobar la integridad de la microsonda con un microscopio, se perfunde con una disolución de Ringer estéril durante 10 minutos, introduciéndola seguidamente en el hipocampo a través de la cánula intracerebral implantada crónicamente. Una vez terminado el experimento se procede a comprobar de nuevo la integridad de la microsonda. La microsonda nunca se reutiliza, para así mantener su capacidad de recuperación constante en todos los experimentos.

1.7.1 Controles

Para la realización de un experimento control, se perfunde Ringer a través de la microsonda situada en el hipocampo a un flujo constante de 2 µl/min. durante 8 horas, con monitorización continua de vídeo y EEG.

1.7.2. Perfusión de la latrunculina A

Se prepararon disoluciones madre de latrunculina A en etanol (100 µg/ml), que se mantuvieron a -20ºC hasta el momento de su uso. Para la perfusión a través de la sonda de microdiálisis se prepararon disoluciones en líquido Ringer conteniendo un máximo de etanol de 1:18750 a partir de la disolución madre, con una concentración final de latrunculina A de 4 µg/ml.

Se realizaron controles perfundiendo disolución Ringer con 1:18750 de etanol. Una vez comprobado que ésta disolución no producía ningún efecto observable, el resto de los experimentos control se realizaron sólo con disolución Ringer.

La dosis de latrunculina A y tiempos de perfusión fueron tomadas de Sierra-Paredes *et al*. (2000b, 2001a, 2005, 2006), y utilizadas por las alteraciones permanentes en la excitabilidad neuronal comprobadas por la aparición de crisis espontáneas, disminución del umbral de picrotoxina (Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006), y aumento de la sensibilidad frente a las altas concentraciones de glutamato y glicina (Vázquez-López *et al.*, 2005)

1.7.3. Administración de la ECA

La administración del fármaco se realiza vía oral. Se prepararon suspensiones de ECA a concentraciones de 3, 10 y 30 mg/ml en un vehículo determinado, preparado disolviendo 500 mg de carboximetilcelulosa en 100 ml de agua ultrapura. Para asegurar una suspensión homogénea, se agita la mezcla en el vórtex y se coloca en un baño de ultrasonidos durante aproximadamente 10 minutos antes de cada administración. La ECA se administró por vía oral, 30 minutos antes de comenzar la microdiálisis, utilizando una sonda esofágica.

1.8. Preparación de los patrones y del reactivo derivatizante

Para la preparación de las diferentes concentraciones de patrones necesarios (para la validación y la recta de calibrado utilizada en los análisis de muestras de microdiálisis) se partió de una disolución madre de 10 mM de aspartato, glutamato y glicina en una disolución estéril de Ringer (147,0 mM ClNa; 4,0 mM ClK; 2,4 mM Cl_2Ca), que se conservó a -20ºC en condiciones de oscuridad. Las distintas concentraciones de patrones de trabajo se prepararon mezclando un volumen apropiado de esta disolución madre de aminoácidos con Ringer, desechándose después del proceso de validación.

Para reconstituir el reactivo AccQ-Fluor se transfiere 1 ml de acetonitrilo al vial donde se encuentra el reactivo AQC en polvo y se calienta en el baño seco a 55ºC durante diez minutos, la concentración final una vez reconstruido es de 10 mM (3 mg/ml). Una vez aclimatado a la temperatura ambiente ya puede utilizarse. Su almacenamiento es a temperatura ambiente protegido de la luz y de la humedad en un desecador durante una semana, después se descarta.

1.9. Proceso de derivatización

La reacción de derivatización se realiza, en los viales de polipropileno con inserto de 250 µl y tapón con septa de silicona de 8 mm, que luego se introducen en el sistema cromatográfico. Para el proceso de derivatización se utilizan 10 µl de la mezcla de patrones o una muestra o un blanco (disolución Ringer), que se tampona

con 30 µl de disolución de borato AccQ-Fluor, para lograr un pH final entre 8,0 y 10,5. Los compuestos derivatizados se forman al añadir 10 µl de la disolución de AQC reconstituida. Con ésta proporción se garantiza una total derivatización de todos los aminoácidos de interés presentes en las muestras o en los patrones. Lo que se confirma posteriormente en los cromatogramas, en donde el pico de AMQ, principal producto de la hidrólisis del AQC, tiene un área mayor del 80% del área del AMQ presente en el blanco. El reactivo reacciona con los aminoácidos primarios y secundarios rápidamente, y el exceso de derivatizante se hidroliza en tan solo 1 minuto, por lo que después de éste tiempo la mezcla está preparada para ser inyectada en el cromatógrafo.

1.10. Instrumentación cromatográfica

El sistema cromatográfico en fase líquida de alta resolución consiste en un módulo de separaciones Waters Alliance 2695 (fig. 18), con un sistema de inyección automática, bomba cuaternaria, un sistema desgasificador de vacío en línea de cuatro canales, horno de columna (desde temperatura ambiente a 65ºC) y calentador/refrigerador de muestras (desde 4ºC hasta 40ºC) con 5 carruseles con capacidad para 120 viales. El detector es un modelo 2475 con detección multicanal por fluorescencia desde 200 a 900 nm de longitudes de onda de trabajo, con lámpara de arco voltaico de xenón (150 W), todos ellos componentes de Waters, Milford, MA, USA. Para el control de las condiciones cromatográficas, la recogida y el análisis de los datos se utilizó el programa informático Empower Pro 5.0.0. con base Windows XP Professional, también de Waters, Milford, MA, USA.

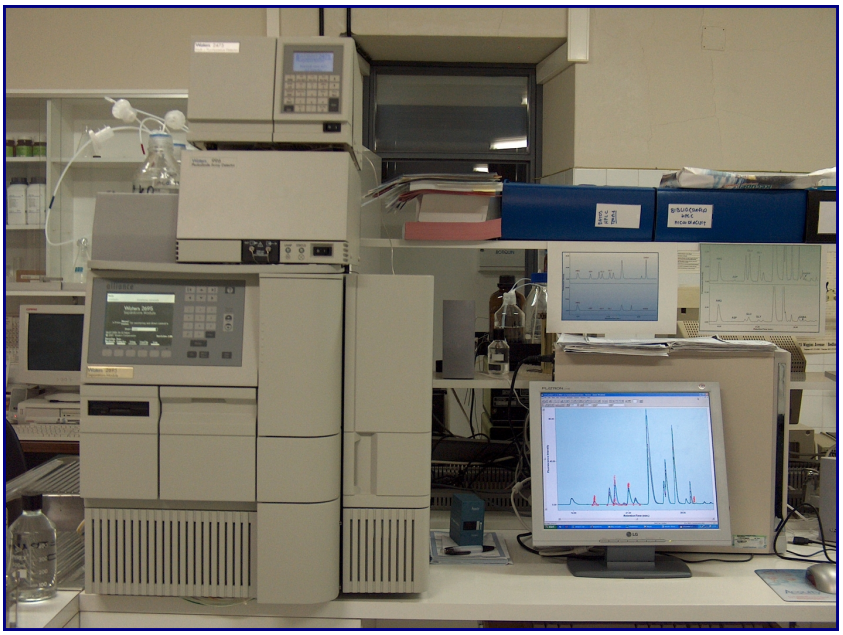


Figura 18. Equipo de RP-HPLC utilizado para los análisis.

1.11. Condiciones cromatográficas

La separación de las muestras se llevo a cabo con una columna de 4 µm AccQ-Tag C_{18} (150×3,9 mm D.I.), conectada a una precolumna 20×3,9 mm con relleno Nova-Pak C_{18}, ambas de Waters (Milford, MA, USA). Las fases móviles utilizadas para la separación de los aminoácidos fueron: la fase móvil A fue una disolución preparada con 200 ml de concentrado AccQ-Tag y 2 l de agua ultrapura, la fase móvil B acetonitrilo calidad HPLC y la fase móvil C agua ultrapura.

El gradiente lineal utilizado para el análisis se muestra en la tabla 1. El tiempo total de análisis es de 43 minutos, aquí se incluyen los 21 minutos de análisis y los aproximadamente 10 minutos de lavado entre muestras con 80% acetonitrilo y 20% agua. Además se necesitan 10 minutos de acondicionado con 100% de fase móvil A para equilibrar el sistema cromatográfico antes de cada inyección.

La columna AccQ-Tag se termostatizó a 37ºC y se empleó durante el análisis un flujo de 1 ml/min. El detector, con una celda de flujo con una capacidad de 8 µl, se

ajustó a una longitud de onda de excitación de 250 nm y una de emisión de 395 nm. La salida de la señal se tomó con una ganancia de 10. Las inyecciones se realizaron cada 43 minutos, con un volumen de inyección de 5 µl.

Tabla 1. Gradiente optimizado para la separación de los diferentes aminoácidos a 37ºC de temperatura de la columna.

TIEMPO (minutos)	TAMPÓN ACETATO (A %)	ACETONITRILO (B %)	AGUA (C %)
Inicio	100,0	0,0	0,0
0,5	99,0	1,0	0,0
18,0	95,0	5,0	0,0
21,0	0,0	80,0	20,0
33,0	100,0	0,0	0,0

2. METODOLOGÍA DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE RP-HPLC

Mediante el proceso de validación del sistema de cromatografía líquida se intenta garantizar que los resultados analíticos obtenidos por éste método son lo más fieles posible a la realidad. Se consigue analizando minuciosamente una serie de parámetros como son la exactitud, selectividad, precisión, o la linealidad, entre otros. Existen guías que marcan pautas y límites para el proceso de validación, orientados al análisis farmacéutico, como es el caso de la *Food and Drug Administration* (US FDA, 1987; US FDA, 1994), la *Pharmacopeia* Americana (USP, 1999) o la *International Conference on Harmonization* (ICH Q2A, 1995; ICH Q2B, 1997).

Desafortunadamente no existe una guía general que marque los ensayos y los criterios a seguir, por ello en cada validación se intentan ajustar los parámetros a determinar, más adecuados al método a validar. Sobre todo cuando se trata de validar un método no destinado al análisis farmacéutico, como es el caso de esta investigación.

Una de las consideraciones previas para lograr resultados fiables y reproducibles es el análisis de la estabilidad de las muestras, de los patrones, reactivos, y de las fases móviles. Es imprescindible que las distintas disoluciones sean lo suficientemente estables como para permitir alguna interrupción durante los análisis, como cortes de luz o cualquier otro problema que pueda surgir. Los límites en la estabilidad de las muestras/patrones almacenados con respecto a los frescos se sitúan en un 2%. La fase móvil se considera estable si la antigua con respecto a la fresca tiene una desviación de menos de un 2% en los resultados cromatográficos. Además de la consideración de la estabilidad se tiene en cuenta el mantenimiento del equipo y su capacidad para facilitar datos de calidad aceptable, lo que se logra verificando que el equipo es el adecuado para la finalidad que se intenta desarrollar (Shabir, 2003). Una vez establecidos éstos criterios se puede hablar ya propiamente de validación, aquí se examina, la selectividad, linealidad, límite de detección, precisión y exactitud.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Las concentraciones de todos los aminoácidos determinadas por RP-HPLC procedentes de muestras de microdiálisis, se expresan como media±E.T.M. (error típico de la media). En ningún caso éstos valores se corrigieron por el factor de recuperación relativa *in vitro* de la membrana de microdiálisis.

Para el estudio estadístico se agruparon los datos según la comparación que se realice. Para el análisis de los controles, de la perfusión de la latrunculina A, y del efecto post-latrunculina A, se utilizó primero una comparación de medias ANOVA de un factor seguida de una prueba post hoc Dunnett (Ambrosio *et al.*, 2000; Ambrosio *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2004).

Para el análisis de la perfusión de la latrunculina A, y de la administración de las diferentes dosis del fármaco (ECA), se utilizó primero una comparación de medias ANOVA de un factor seguida de una prueba post hoc Bonferroni (Ambrosio *et al.,* 2000).

Para el análisis de los controles, y de la administración de las diferentes dosis de ECA, se utilizó primero una comparación de medias ANOVA de un factor seguida de una prueba post hoc Dunnett (Ambrosio *et al.*, 2000; Ambrosio *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2004).

La significación estadística para ambas pruebas (Dunnett y Bonferroni) se estableció en $p<0,05$. El programa estadístico utilizado fue el SPSS 12.0S para Windows.


GLUTAMATO
RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE RP-HPLC

1.1. Estabilidad

La determinación de la estabilidad de los patrones/muestras, mezcla de derivatización, fase móvil y reactivos, se realizó previamente al estudio de la validación del método. La estabilidad de los patrones/muestras, obtenidos por microdiálisis, se debe de garantizar en las distintas etapas de su manipulación hasta que son analizados por RP-HPLC: una vez recogidos se conservan en un colector de fracciones refrigerado a 4ºC, hasta que se etiquetan y se transfieren al congelador, manteniéndose en todo momento la cadena de frío.

Durante los análisis, una vez descongeladas a temperatura ambiente, se derivatizan inmediatamente las distintas muestras/patrones en conjunto, proceso con el que se garantiza la estabilidad de la mezcla de derivatización a temperatura ambiente durante como mínimo una semana (Cohen y Michaud, 1993; Cohen, 2000). Tiempo suficiente para realizar todos los análisis, tan sólo hay que tener la precaución de cerrar correctamente los viales ya que debido al pequeño volumen de la mezcla ésta puede llegar a evaporarse. Además los muestras/patrones fueron analizados después de un largo período de congelación a -20ºC y la cuantificación de los diferentes aminoácidos fue comparada con muestras/patrones frescas, no encontrándose variaciones significativas de las concentraciones de aminoácidos congelados con respecto a las frescas.

También se comprobó la estabilidad del proceso de derivatización comparando muestras derivatizadas y analizadas en el sistema cromatográfico en fresco, frente a la misma mezcla de derivatización conservada a -20ºC durante cinco meses. Manteniendo en todo momento la mezcla en los viales en donde se había realizado la reacción de derivatización. En la figura 19 se puede observar la excelente reproducibilidad tanto de los tiempos de retención como del área de los picos de interés pasados los cinco meses.

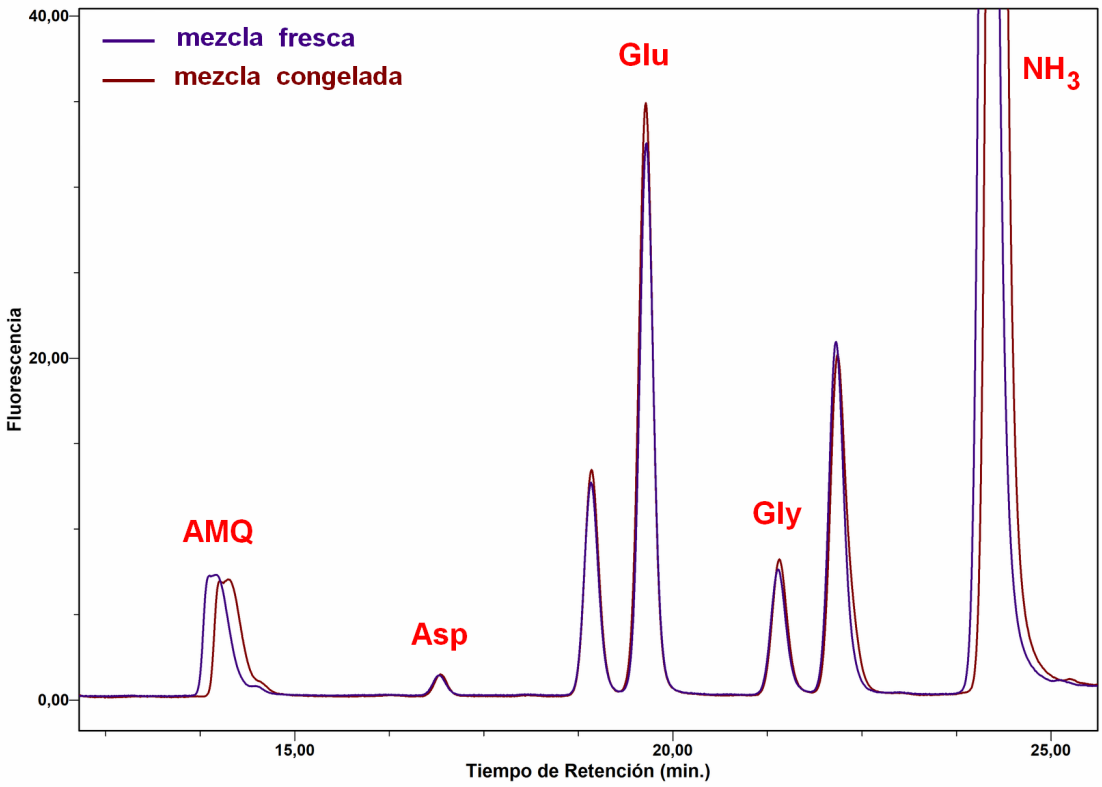


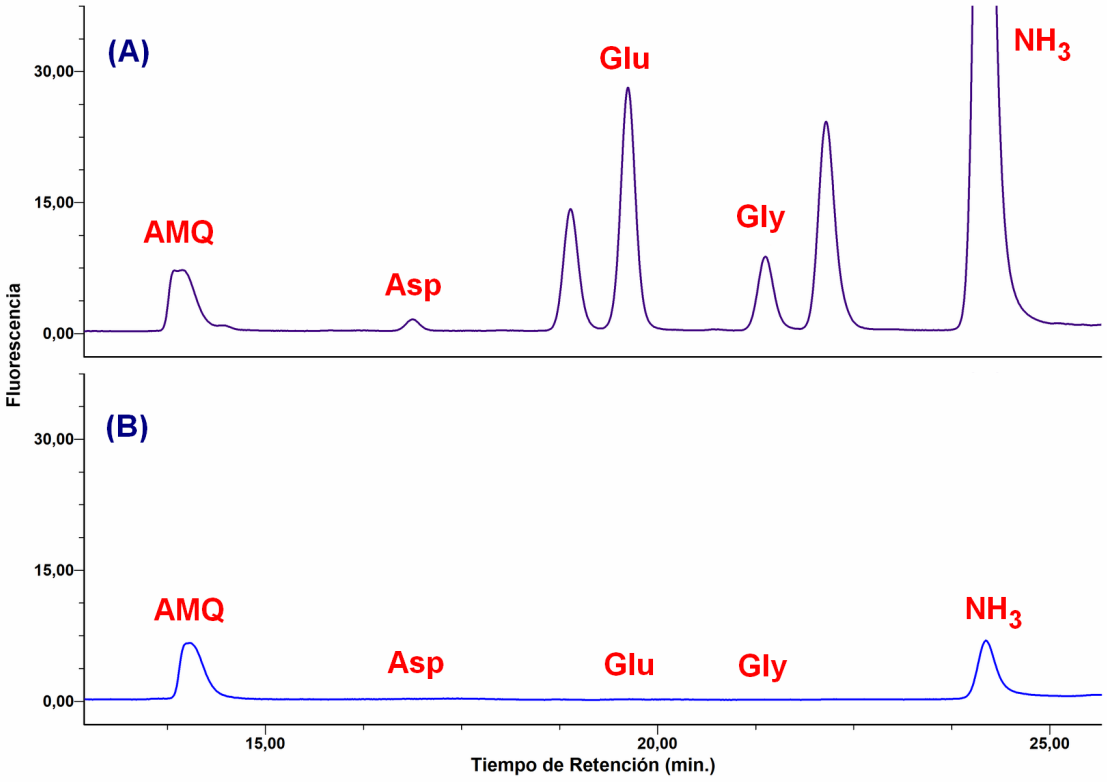
Figura 19. Cromatogramas de la misma muestra de microdiálisis derivatizada en fresco e inyectada, y congelada a -20ºC durante cinco meses e inyectada en el sistema cromatográfico. El gradiente utilizado, con una temperatura de la columna de 30ºC, fue: Inicial=0,0%B (acetonitrilo); 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A (tampón acetato) durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

Para la fase móvil, preparada a partir del concentrado comercial, el fabricante garantiza su estabilidad durante más de un mes conservándola a 4°C. Nunca se utilizó la fase móvil reconstituida más de una semana, con lo que se garantiza totalmente su estabilidad durante todos los análisis (Waters AccQ-Tag Chemistry Package, 1993).

El reactivo que puede degradarse en su almacenaje es el reactivo en polvo AQC procedente del kit AccQ-Fluor. Se han seguido las recomendaciones de la casa comercial para su almacenaje garantizando su estabilidad durante 6 meses, conservándolo sellado en lugar seco y oscuro. Una vez reconstituido el reactivo AQC se almacena durante 5 días como máximo en un desecador a temperatura ambiente bien sellado, así su estabilidad se mantiene durante como mínimo una semana (Waters AccQ-Tag Chemistry Package, 1993).

1.2. Selectividad

Mediante la selectividad se evalúa la capacidad de un método de distinguir y medir exactamente la respuesta de los analitos, en presencia de compuestos que puedan existir en la muestra. Se logra demostrando la ausencia de respuesta en varias muestras blanco a los tiempos de retención de los aminoácidos de interés (Karnes, 1991). Se inyectaron en el sistema cromatográfico seis muestras blanco comprobándose que no existen interferencias a los tiempos de retención de los aminoácidos, al compararse con diferentes tipos de muestras de microdiálisis. La figura 20 (A) muestra un cromatograma de una muestra de microdiálisis con los diferentes aminoácidos identificados, una muestra blanco (fig. 20 B), y la misma muestra blanco aumentada 10 veces (fig. 20 C), donde se puede observar la buena selectividad del método. Bajo las condiciones de análisis todos los aminoácidos de interés son correctamente separados e identificados.



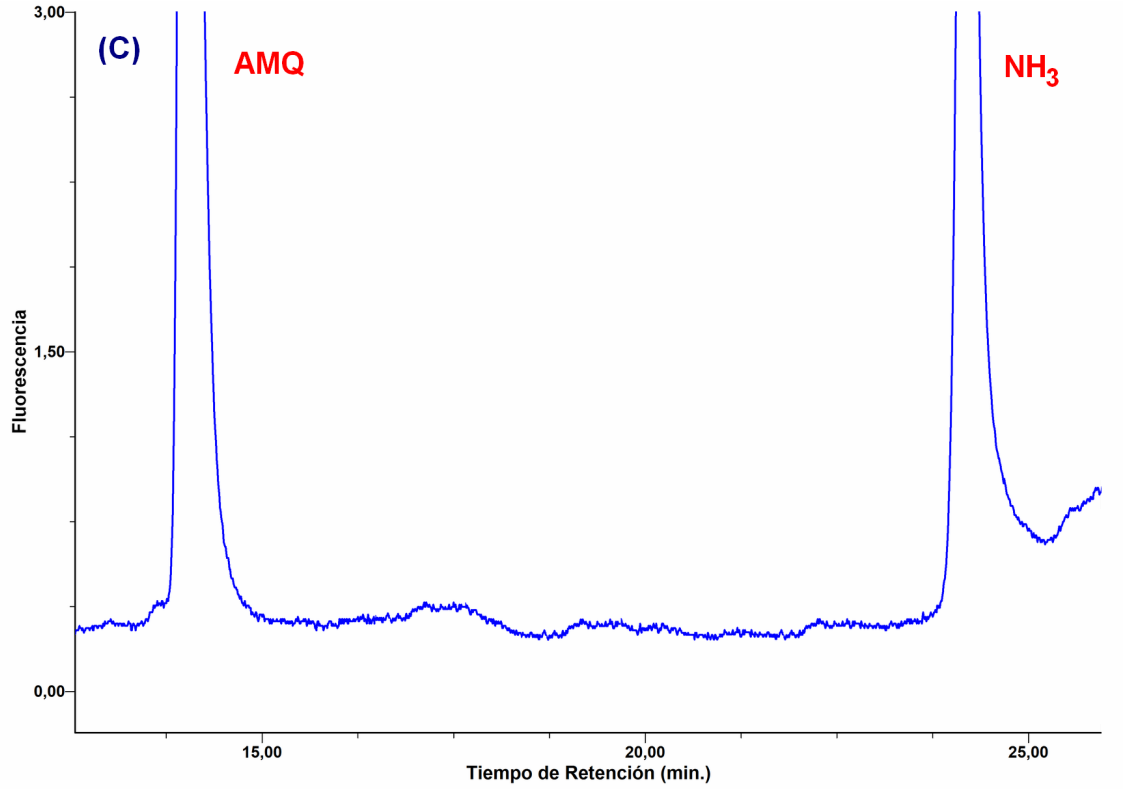


Figura 20 (A). Cromatograma de una muestra de microdiálisis derivatizada. (B) Cromatograma de una muestra blanco derivatizada. (C) Cromatograma del mismo blanco aumentado 10 veces. El volumen inyectado fue de 5 µl. El gradiente utilizado a 30ºC de temperatura de la columna es: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos.

1.3. Linealidad y límites de detección

La linealidad es la capacidad del método para ajustar de un modo directamente proporcional, la concentración del analito dentro de un rango de concentraciones conocidas. Se consigue mediante la recta/curva de calibrado, que muestra la relación que existe entre la respuesta del instrumento detector y concentraciones conocidas del analito. Normalmente se escogen 5 valores de concentración para crear la recta de calibrado, el estudio de su linealidad tiene que diseñarse según el método que se valide. La linealidad de la recta se evalúa observando los datos del coeficiente de correlación, además de la ordenada en el origen. Un coeficiente de correlación (*R*) mayor de 0,999 indica que los datos de la recta se ajustan a una línea de regresión, que es el caso más habitual. Además la suma de los cuadrados residuales (*Residual*

Sum of Squares, RSS) indica también si los datos se ajustan o no a una línea de regresión (Shabir, 2003).

En éste caso los datos obtenidos se ajustan a una recta de calibrado representada por la ecuación: área= A + B×concentración (y= A + Bx), donde A es la ordenada en el origen y B la pendiente. Para verificar la linealidad de la recta se han determinado el coeficiente de correlación o R, el coeficiente de determinación o R^2, el error estándar de la calibración o E, y la suma de los cuadrados residuales o RSS. Las fórmulas para RSS y E son las siguientes:

$$RSS = \sum_{i=1}^{n} w_i(\hat{y}_i - y_i)^2$$

n = número de puntos.
w_i = factor de carga.
$\hat{y}_i$ = respuesta de un punto usando la calibración.
y_i = respuesta de un punto de la calibración.

$$E = \sqrt{\frac{1}{d}RSS}$$

d = grados de libertad.
RSS = suma de los cuadrados residuales.

Para el cálculo de la recta de calibrado (tabla 2) se analizaron una serie de concentraciones patrón desde 0 (blanco: disolución Ringer sin analito) a 100 µM (tres réplicas de cada punto) según el aminoácido analizado. La linealidad fue calculada examinando el área bajo pico de cada aminoácido con respecto a su concentración, calculada con el programa Empower Pro. En todos los casos los coeficientes de determinación (R^2) fueron mayores de 0,998 lo que demuestra una excelente linealidad de las rectas de calibrado.

Tabla 2. Recta de calibrado entre 0 y 100 µM de los diferentes aminoácidos utilizada para la validación. (área = A + B×concentración).

AMINOÁCIDO	A ($\times 10^3$)	B ($\times 10^4$)	E ($\times 10^4$)	RSS ($\times 10^9$)	R	R^2
Aspartato	-1,79	2,29	1,43	3,07	0,9991	0,9982
Glutamato	-2,26	3,04	1,73	4,54	0,9993	0,9987
Glicina	4,83	2,83	1,48	3,30	0,9996	0,9993

El límite de detección (LOD) se define como la concentración mínima del analito en la muestra que puede ser detectado, pero no cuantificado. Los límites de detección se determinaron según la relación señal/ruido=3/1 estudiando cinco muestras de microdiálisis y cinco muestras blanco, para todos los aminoácidos fueron menores de 1 nM (tabla 3).

Tabla 3. Límites de detección de los aminoácidos.

AMINOÁCIDO	RUÍDO (M)	LOD (nM)
Aspartato	$1{,}3\times10^{-10}$	0,4
Glutamato	$2{,}0\times10^{-10}$	0,6
Glicina	$2{,}3\times10^{-10}$	0,7

1.4. Precisión y Exactitud

La precisión es la medida del grado de concordancia entre los valores obtenidos de manera independiente al aplicar repetidamente el mismo método analítico a alícuotas de la misma muestra, bajo condiciones de trabajo sensiblemente iguales. Se expresa normalmente como coeficiente de variación (*C.V.*) para un número significativo de muestras. Mediante la precisión se expresa la desviación de las medidas individuales de analito al analizar en varias ocasiones un mismo volumen de una misma muestra biológica. Se han utilizado cinco determinaciones por cada concentración. La precisión se determinó según la fórmula:

$$C.V. = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right)\times 100$$

Donde s es la desviación estándar, calculada según la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{x}$ = valor de la media.

x_i = valor de cada medida individual.

n = número total de medidas realizadas.

El valor de la media se calculó según la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i-1}^{n} x_i}{n}$$

$\bar{x}$ = valor de la media.

x_i = valor de cada medida individual.

n = número total de medidas realizadas.

La exactitud se define como la proximidad o grado de concordancia de los valores obtenidos experimentalmente por el método analítico, al valor real. Se han utilizado cinco determinaciones por cada concentración. Se evalúa, en éste caso, como recuperación analítica en tanto por ciento, analizando replicados de concentraciones conocidas según la siguiente relación: Media de las concentraciones medidas/Concentración teórica (Shabir, 2003).

En ambos casos se hicieron estudios intra-día e inter-día, para los primeros se analizaron cinco replicas el mismo día de tres concentraciones de patrones diferentes. En el caso de los ensayos inter-día se analizaron también tres concentraciones conocidas durante cinco días consecutivos. Las concentraciones utilizadas fueron 2,5 µM, 25,0 µM y 100,0 µM, las cuales se derivatizaron e inyectaron bajo las condiciones cromatográficas descritas en Material y Métodos. En los ensayos intra-día (tabla 4) la precisión de las repuestas está entre 0,9 y 2,6%, mientras que la exactitud abarca desde 95,3 al 98,0%. Para los ensayos inter-día (tabla 5) la precisión se situó entre 4,5 y 5,5% y la exactitud entre 97,8 y 105,2%.

Tabla 4. Precisión y exactitud intra-día del método descrito (n=5).

Aminoácido/ Concentración teórica (µM)		Precisión *C.V.* (%)	Exactitud (%)
Aspartato	2,5	1,5	98,0
	25,0	1,1	96,7
	100,0	1,2	95,3
Glutamato	2,5	2,6	97,0
	25,0	1,0	96,9
	100,0	1,3	95,7
Glicina	2,5	1,9	96,6
	25,0	0,9	97,4
	100,0	1,1	96,6

Tabla 5. Precisión y exactitud inter-día del método descrito (n=5).

Aminoácido/ Concentración teórica (µM)		Precisión *C.V.* (%)	Exactitud (%)
Aspartato	2,5	5,3	97,8
	25,0	4,5	104,2
	100,0	4,7	100,5
Glutamato	2,5	5,5	99,3
	25,0	4,7	104,3
	100,0	4,8	100,8
Glicina	2,5	5,5	102,3
	25,0	4,9	105,2
	100,0	5,0	102,3

También se realizó un estudio inter-día de la precisión del método con muestras procedentes de microdiálisis del hipocampo de rata (n=3), (tabla 6).

Tabla 6. Valores de precisión inter-día en muestras de microdiálisis (n=3).

AMINOÁCIDO	Concentración medida ± desviación típica (µM)	Tiempo de Retención *C.V.* (%)	Área *C.V.* (%)
Aspartato	1,1±0,1	0,2	0,4
Glutamato	52,5±0,2	0,1	1,4
Glicina	20,5±0,1	0,1	0,1

Para la identificación de los diferentes analitos se utilizó el tiempo de retención (T.R.). Tal y como se muestra en la tabla 7 y 8, los tiempos de retención tanto en los ensayos intra-día como inter-día tienen una desviación mínima (menor del 0,3%), lo que permite una excelente e inequívoca identificación de los diferentes aminoácidos incluso en las muestras de microdiálisis (tabla 6).

Tabla 7. Tiempos de Retención y *C.V.* (%) de los aminoácidos intra-día (n=5).

Aminoácido/ Concentración teórica (µM)		T.R. (minutos)	Media	*C.V.* (%)
Aspartato	2,5	13,6		
	25,0	13,6	13,6	0,0
	100,0	13,6		
Glutamato	2,5	15,8		
	25,0	15,8	15,8	0,0
	100,0	15,8		
Glicina	2,5	17,4		
	25,0	17,4	17,4	0,0
	100,0	17,4		

Tabla 8. Tiempos de Retención y *C.V.* (%) de los aminoácidos inter-día (n=5).

Aminoácido/ Concentración teórica (µM)		T.R. (minutos)	Media	*C.V.* (%)
Aspartato	2,5	13,7		
	25,0	13,7	13,6	0,3
	100,0	13,6		
Glutamato	2,5	15,9		
	25,0	15,9	15,8	0,3
	100,0	15,8		
Glicina	2,5	17,4		
	25,0	17,4	17,8	0,0
	100,0	17,4		

2. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS

2.1. Recuperación de la sonda de microdiálisis

Como se mencionaba en el apartado de la Introducción, mediante la perfusión en continuo de un determinado medio a través de la sonda por difusión en gradiente se obtienen desde el espacio extracelular muestras de microdiálisis. Por ello, debido al continuo flujo existente, no se permite que la concentración de los analitos en ambos lados de la membrana llegue a estar en equilibrio. Bajo éstas condiciones de no equilibrio, la concentración del analito en el dializado es menor que la concentración existente en el líquido extracelular que rodea la sonda.

La relación entre la fracción recuperada (dializado) y la real (perfundida) es normalmente expresada en porcentaje, y se denomina recuperación relativa o porcentaje de recuperación. Se calcula *in vitro* sumergiendo la sonda en una disolución conocida de los neurotransmisores a estudio, y perfundirlos con un medio libre de los neurotransmisores (Ungerstedt, 1991; Parent *et al.*, 2001). Comparando entonces las concentraciones recogidas y las reales se calcula la recuperación de la sonda. Se expresa como *R* y se calcula según la siguiente ecuación:

$$R = Cp,f/Ce,f$$

Donde Cp,f es la concentración del analito en la disolución perfundida recogida y Ce,f es la concentración del analito en la disolución externa a la sonda.

Es necesario determinar la recuperación de diferentes sondas para asegurarse de que el valor no varía, y no afecta a la cantidad de aminoácido recogido. Se analizó la recuperación relativa de cinco sondas (tabla 9), perfundiendo patrones de diferentes valores, dentro del rango de la recta de calibrado utilizada para la cuantificación de las muestras de microdiálisis. Posteriormente durante los distintos experimentos realizados se determinó la recuperación relativa de modo rutinario, para asegurarse de que seguía dentro del rango de recuperaciones descritas para todos los aminoácidos.

Tabla 9. Recuperación Relativa y *C.V.* de las sondas (n=5).

AMINOÁCIDO	Recuperación relativa ± desviación típica (%)	*C.V.* (%)
Aspartato	23,23±2,25	9,68
Glutamato	23,96±2,92	12,22
Glicina	33,20±3,87	11,66

2.2. Recta de calibrado

Los diferentes niveles de concentraciones de patrones que componen la recta de calibrado de cada aminoácido, utilizada para el análisis de muestras de microdiálisis, se preparan en la misma matriz en las que éstas se recogen (Ringer), (ver preparación de patrones en Material y Métodos). Posteriormente a todos los niveles de concentraciones, al igual que a las muestras de microdiálisis, se las somete al mismo proceso de diálisis, de derivatización y de análisis cromatográfico (ver Material y Métodos). De tal modo que tanto las muestras de microdiálisis como las diferentes niveles de concentraciones de patrones que componen las rectas de calibrado, han sufrido idéntico tratamiento.

En los experimentos es muy importante incluir en el vehículo perfundido controles (patrones de concentración conocida de cada aminoácido), que nos permita asegurar que todo el proceso de la microdiálisis se lleva a cabo correctamente. Además de garantizar que la recta de calibrado utilizada es la adecuada. Para ello se perfunden controles de concentración 10 µM de cada aminoácido, al final de cada experimento individual.

Los niveles de concentraciones que componen las distintas rectas de calibrado (tabla 10) se eligen en función de las diversas concentraciones de cada aminoácido, que luego se esperan encontrar en las muestras de microdiálisis del hipocampo en el cerebro de la rata. Las concentraciones utilizadas fueron, en el caso del aspartato: 0; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20 µM; para el glutamato: 1; 2; 5; 10; 20; 50; 150 µM; para la glicina: 1;

2; 5; 10; 20; 50; 150 µM; con unos valores de R^2 para todos los aminoácidos estudiados, siempre mayores de 0,998.

Tabla 10. Recta de calibrado utilizada para la cuantificación de los diferentes aminoácidos en muestras de microdiálisis, área = A + B×concentración (*y*= A + B*x*).

AMINOÁCIDO	A	B	E	*RSS*	*R*	R^2
Aspartato	$3{,}10\times10^{2}$	$5{,}15\times10^{3}$	$2{,}30\times10^{3}$	$2{,}10\times10^{9}$	0,9997	0,9985
Glutamato	$9{,}63\times10^{3}$	$5{,}31\times10^{3}$	$6{,}50\times10^{3}$	$1{,}68\times10^{8}$	0,9998	0,9996
Glicina	$1{,}13\times10^{4}$	$7{,}29\times10^{3}$	$8{,}43\times10^{3}$	$3{,}55\times10^{8}$	0,9998	0,9996

2.3. Ajuste de la temperatura de la columna

Una vez validado el método cromatográfico con una temperatura de la columna de 37ºC, se encontró que para un pequeño grupo de muestras de microdiálisis la separación de los aminoácidos glutamato y glicina de los picos adyacentes, no se conseguía con una óptima resolución. Se intentó solventar éste inconveniente con un mínimo cambio en el método, que no afectase a la validación. Por lo que únicamente se modificó la temperatura de la columna. Para comprobar qué temperatura era la adecuada se ensayaron diferentes temperaturas: 50ºC, 40ºC y 30ºC con las muestras de microdiálisis anteriores (fig. 21). Observándose que a 30ºC se mejoraba la eficacia de separación de los picos del glutamato y glicina, de los picos adyacentes. A pesar de que se retrasaba el tiempo de elución de todos los aminoácidos, tal como se observa en la figura 22 y en la figura 23. Es significativo el caso del aspartato (fig. 21) que a la temperatura de 50ºC no se logra separar, y coeluye con el AMQ.

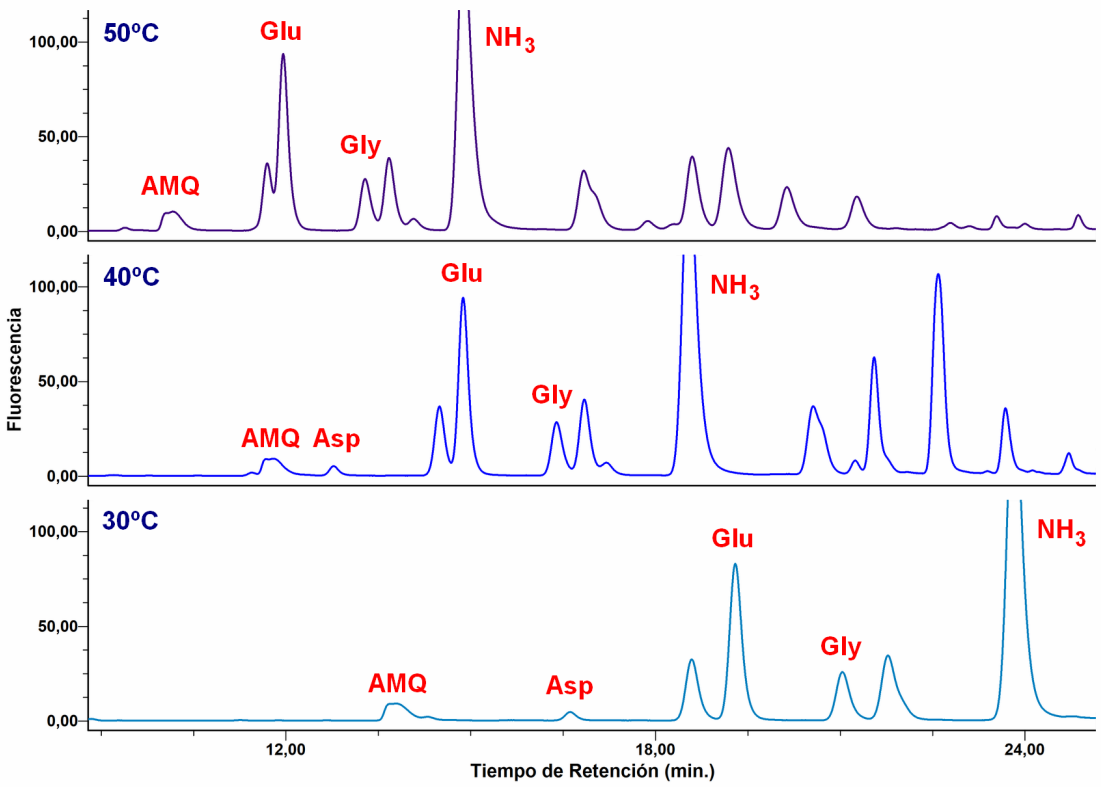


Figura 21. Cromatogramas de una muestra de microdiálisis con una temperatura de la columna de 50ºC, 40ºC y 30ºC. Los gradientes utilizados para cada temperatura fueron ajustados en base al de la tabla 1.

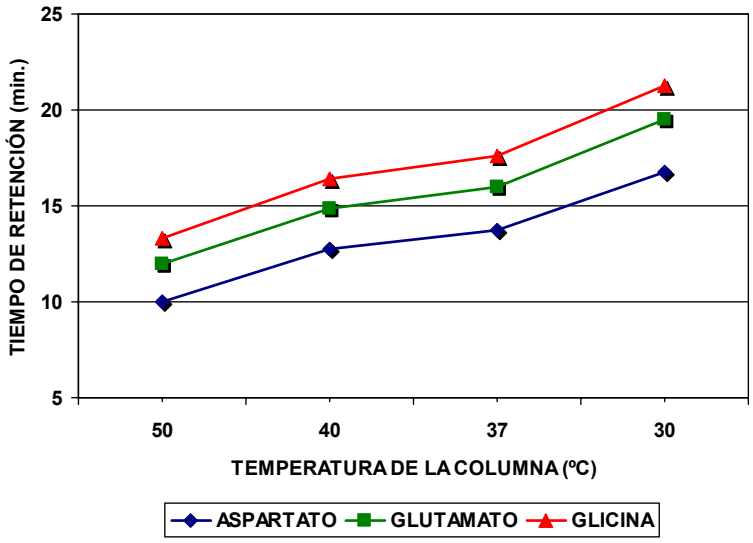


Figura 22. Efecto de la temperatura de la columna sobre el tiempo de retención de los aminoácidos aspartato, glutamato y glicina.

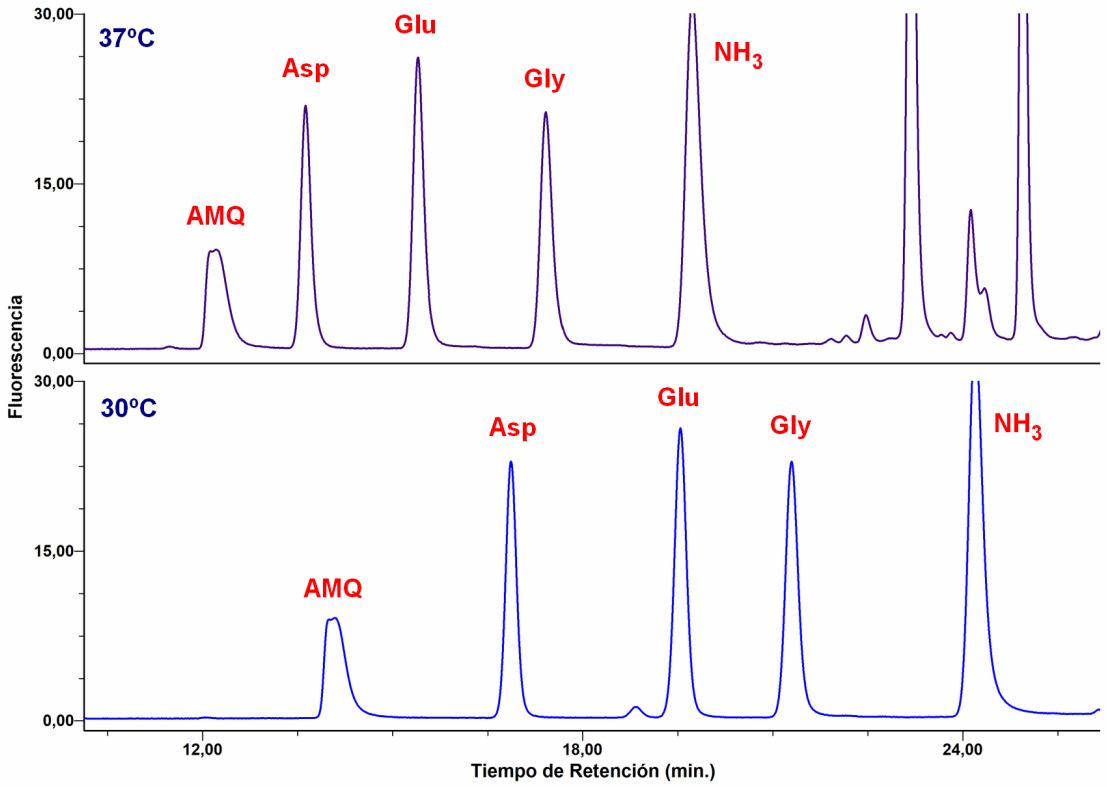


Figura 23. Cromatogramas de los patrones de los distintos aminoácidos de concentración 10 µM sin dializar, a 37ºC y 30ºC de temperatura de la columna. Para la temperatura de la columna de 37ºC el gradiente fue el de la tabla 1, y para la temperatura de 30ºC fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos.

Finalmente las condiciones de análisis cromatográficos son las mismas que en el método descrito anteriormente, salvo la corrección de la temperatura de la columna que provoca un pequeño ajuste en el gradiente y por ello unos tiempos de retención ligeramente superiores a los detallados para la validación (fig. 24). A pesar del cambio, tal como se observa en la figura 25, la separación incluso para los picos más pequeños se realiza perfectamente, y los tiempos retención de los aminoácidos en muestras de microdiálisis presentan una excelente repetibilidad.

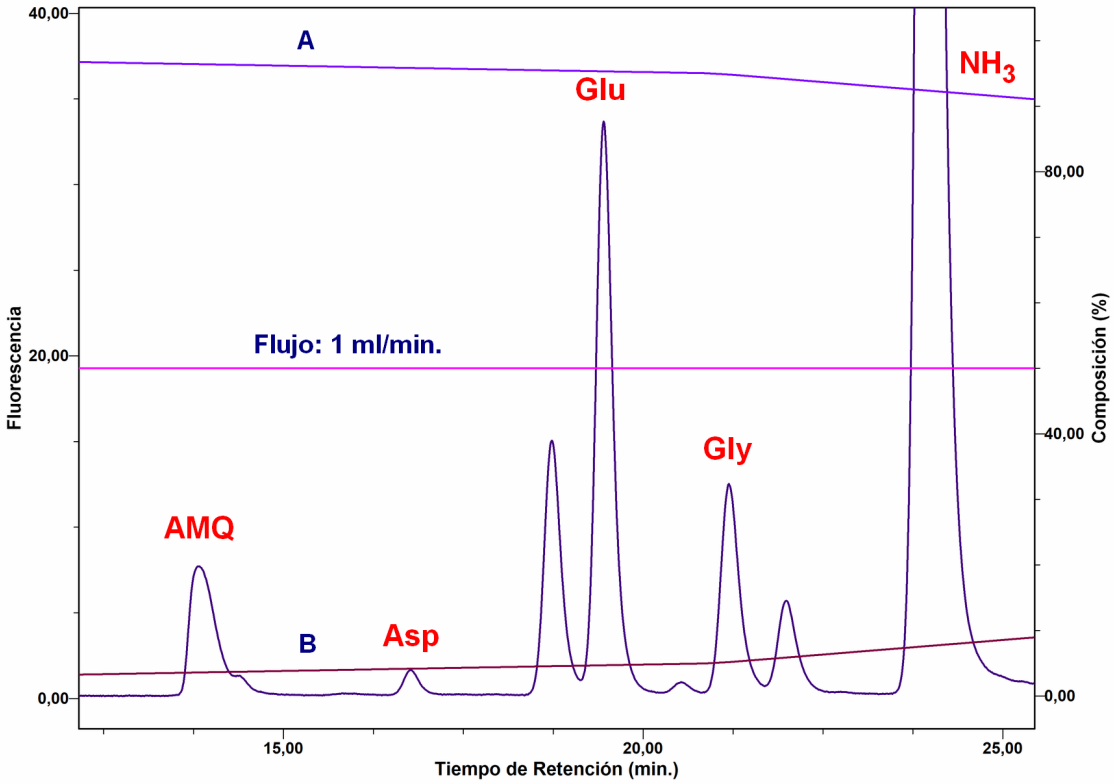


Figura 24. Evolución de las fases móviles A (%) y B (%) (ver tabla 1), en la separación de los aminoácidos de una muestra de microdiálisis. El gradiente utilizado, con una temperatura de la columna de 30ºC, fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

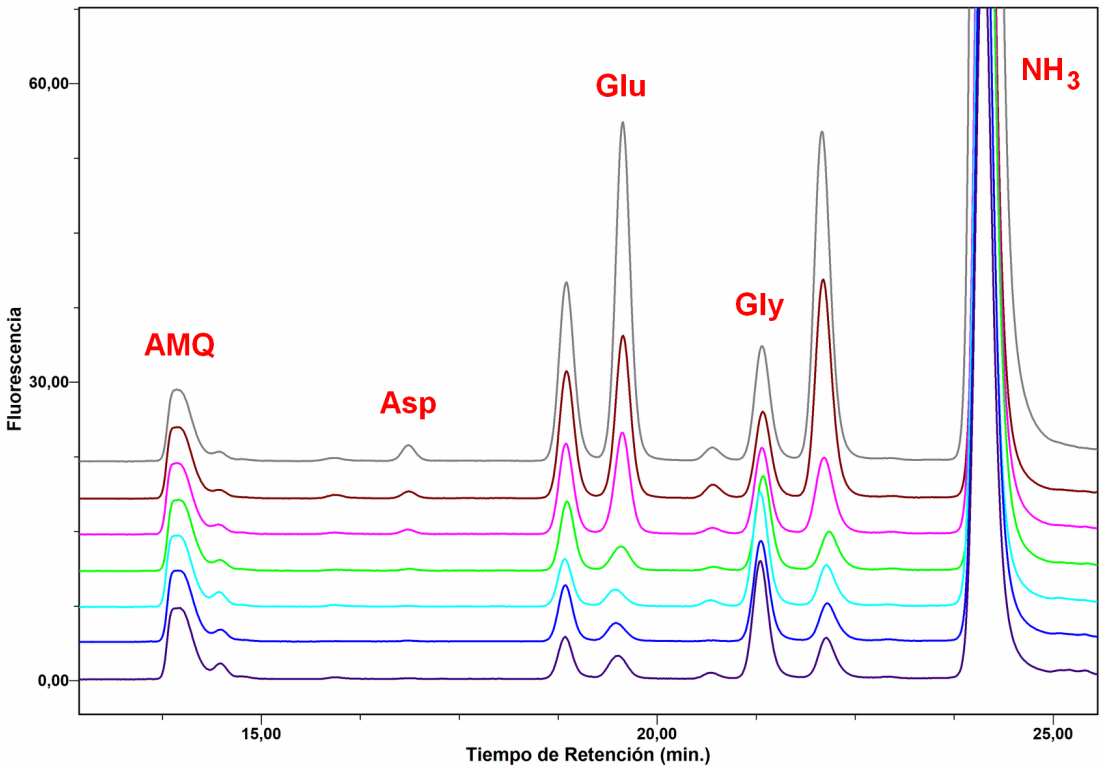


Figura 25. Cromatogramas de siete muestras de microdiálisis diferentes, inyectadas en el cromatógrafo consecutivamente. El gradiente utilizado, con una temperatura de la columna de 30ºC, fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

3. CROMATOGRAMAS DE LOS AA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS

Después de la administración de los distintos tratamientos a todos los conjuntos de animales las muestras de microdiálisis se recogen, etiquetan y almacenan en un congelador a -20ºC hasta que se analizan en el sistema cromatográfico. Para su análisis las muestras se descongelan a temperatura ambiente durante unos segundos, y se derivatizan en conjunto, siguiendo las pautas descritas en Material y Métodos. Inmediatamente después de la derivatización se analizan en el sistema cromatográfico según las condiciones expuestas en Material y Métodos, como resultado se obtienen cromatogramas como los mostrados en la figura 26 (CONTROL), figura 27 (LAT), figura 28 (POSTLAT) y figura 29 (ECA):

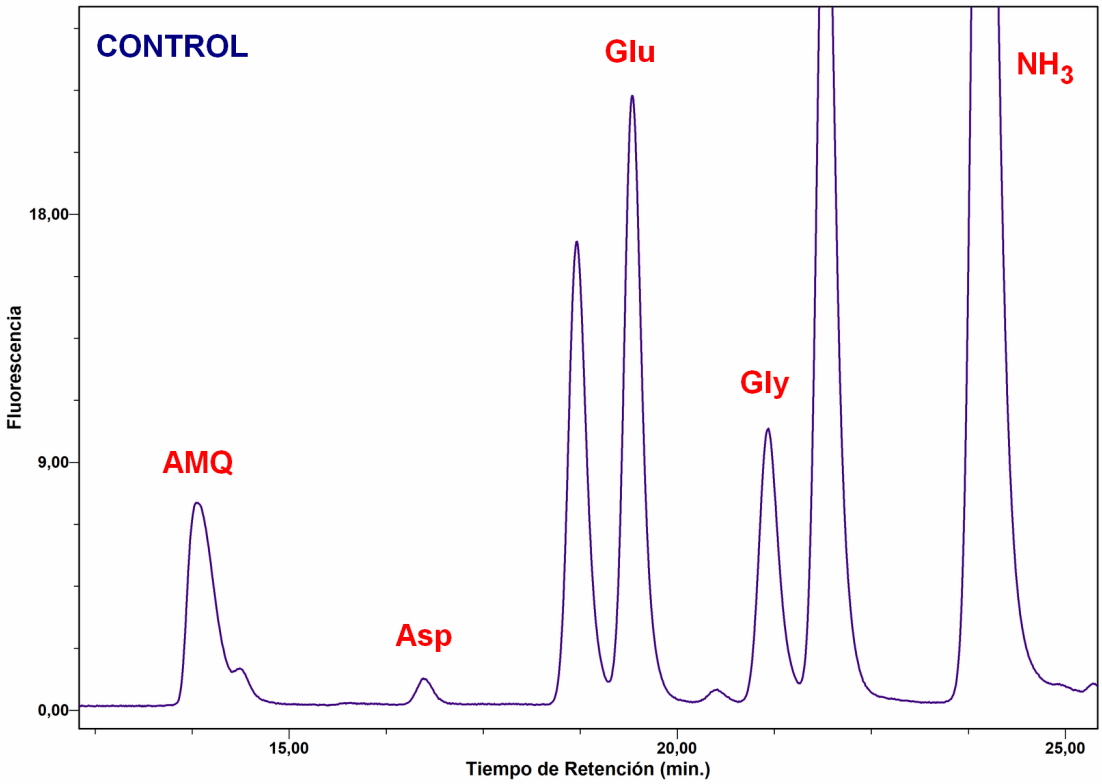


Figura 26. Cromatograma de una muestra de microdiálisis control (sólo se le ha perfundido Ringer al animal). El gradiente utilizado con una temperatura de la columna de 30ºC fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

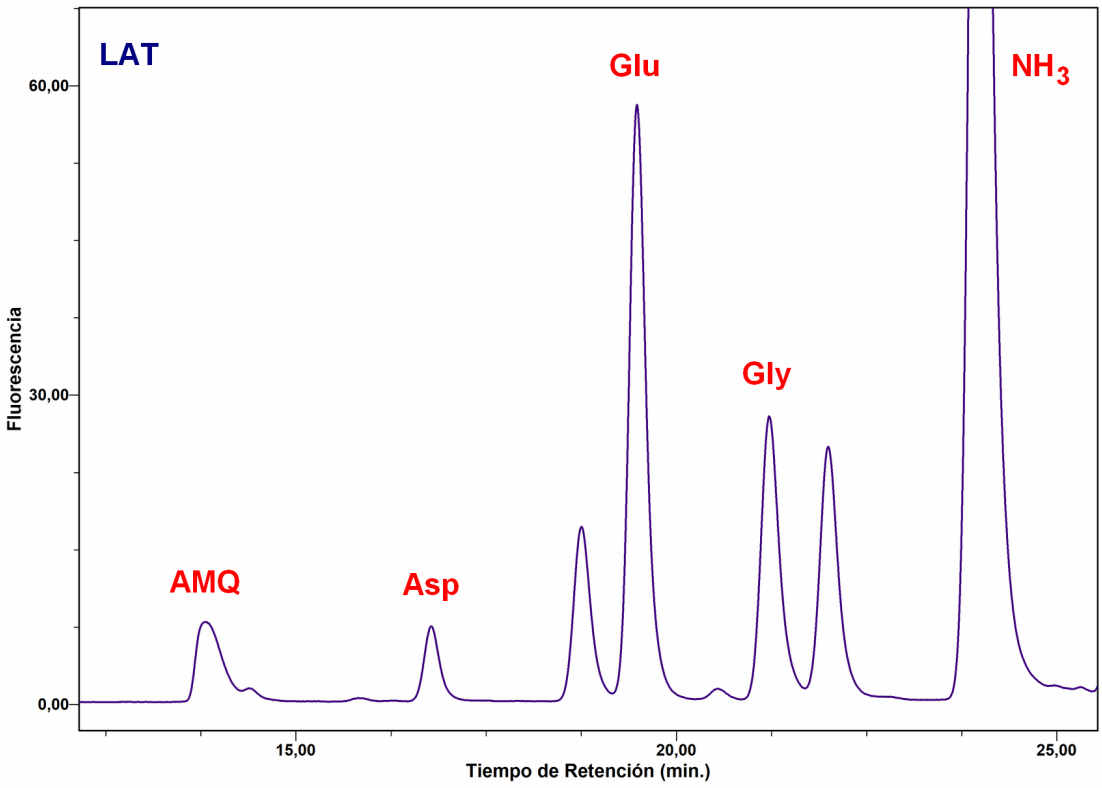


Figura 27. Cromatograma de una muestra de microdiálisis al perfundir la latrunculina A (4µg/ml). El gradiente utilizado con una temperatura de la columna de 30ºC fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

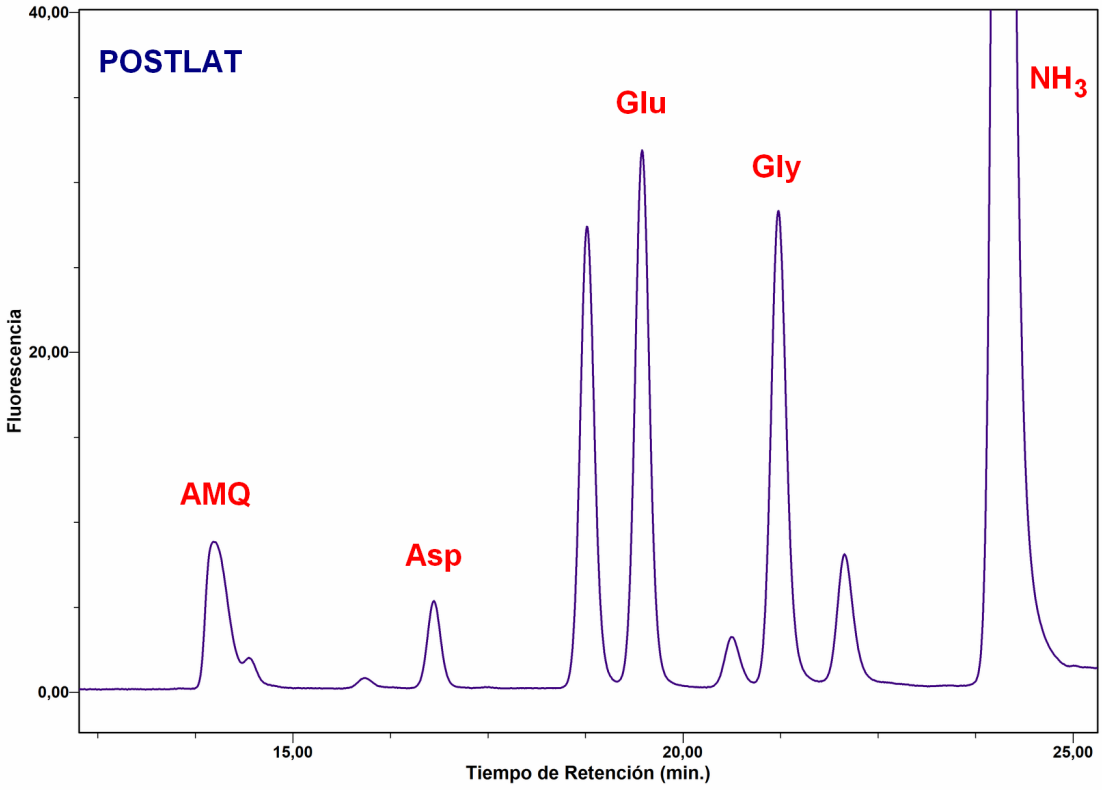


Figura 28. Cromatograma de una muestra de microdiálisis después de un mes de haber sido perfundida la latrunculina A (4µg/ml). El gradiente utilizado con una temperatura de la columna de 30ºC fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

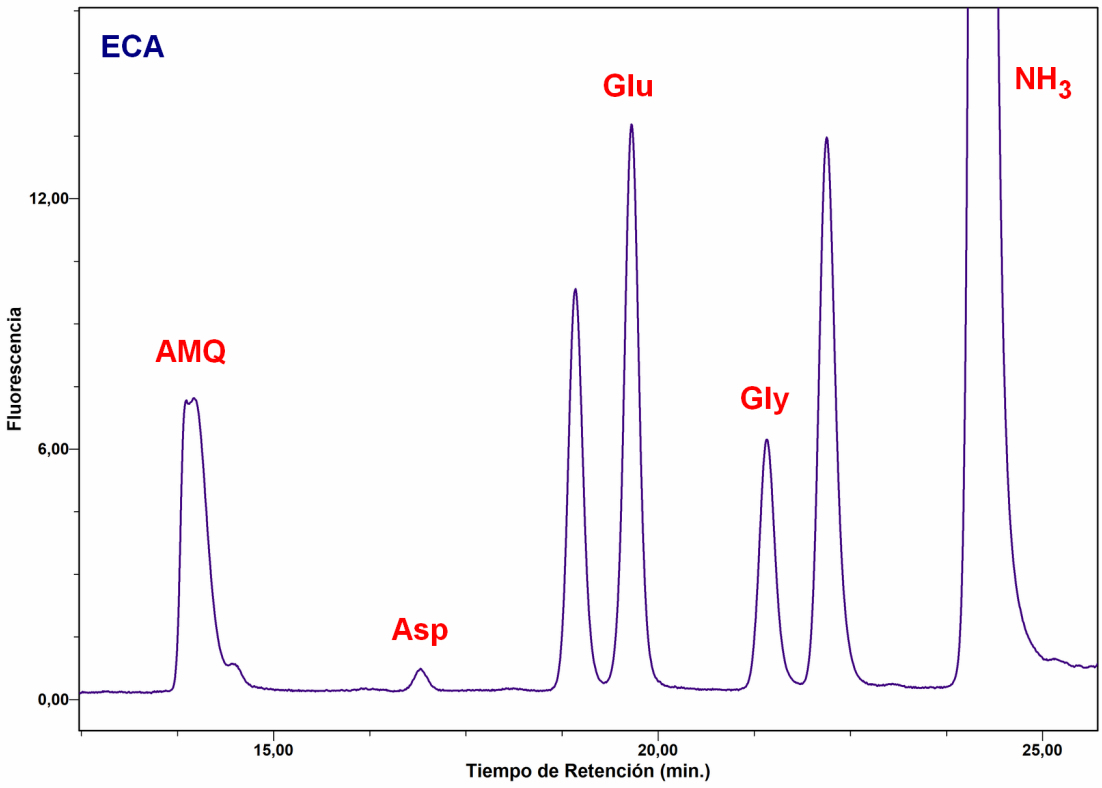


Figura 29. Cromatograma de una muestra de microdiálisis al perfundir la latrunculina A (4µg/ml) y administrar la ECA. El gradiente utilizado con una temperatura de la columna de 30ºC fue: Inicial=0,0%B; 0,5=1,0%B; 21,0=5,0%B; lavado con 80,0%B durante 5 minutos y equilibrado con 100,0%A durante diez minutos. El volumen de inyección fue de 5 µl.

4. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS CRISIS EPILÉPTICAS INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A

En todo momento durante los distintos experimentos los animales estuvieron monitorizados mediante un equipo de electroencefalografía, de vídeo y de microdiálisis. El electroencefalograma control del animal, tanto de vigilia como de sueño, es el que se muestra en la figura 30 A y B.

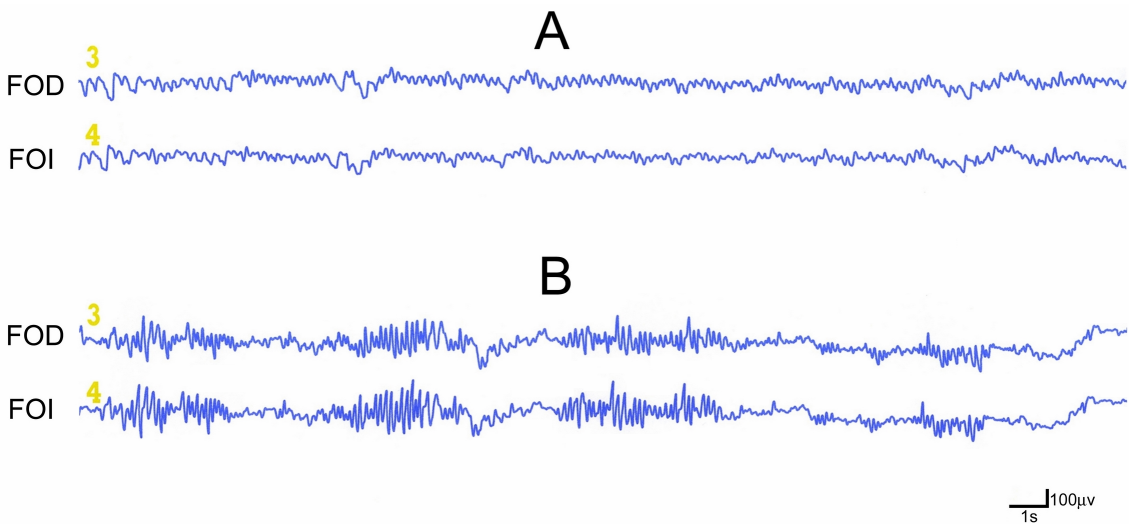


Figura 30. Electroencefalograma control, perfundiendo Ringer, (FOD: fronto-occipital derecho, FOI: fronto-occipital izquierdo) de vigilia (A) y sueño (B).

La latrunculina A causa un aumento de la excitabilidad neuronal que conduce a la aparición de crisis epilépticas. Aumento en la hiperexcitabilidad que está relacionado con la duración de la perfusión, y no con la concentración perfundida (Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006). Mediante la perfusión de la latrunculina A (4µg/ml) durante ocho horas diarias tres días consecutivos, se verifica que su administración provoca crisis epilépticas de un modo agudo. Durante éste experimento un 80% de los animales tratados (fig. 34) presentan crisis epilépticas, como la que se observa en la figura 31.

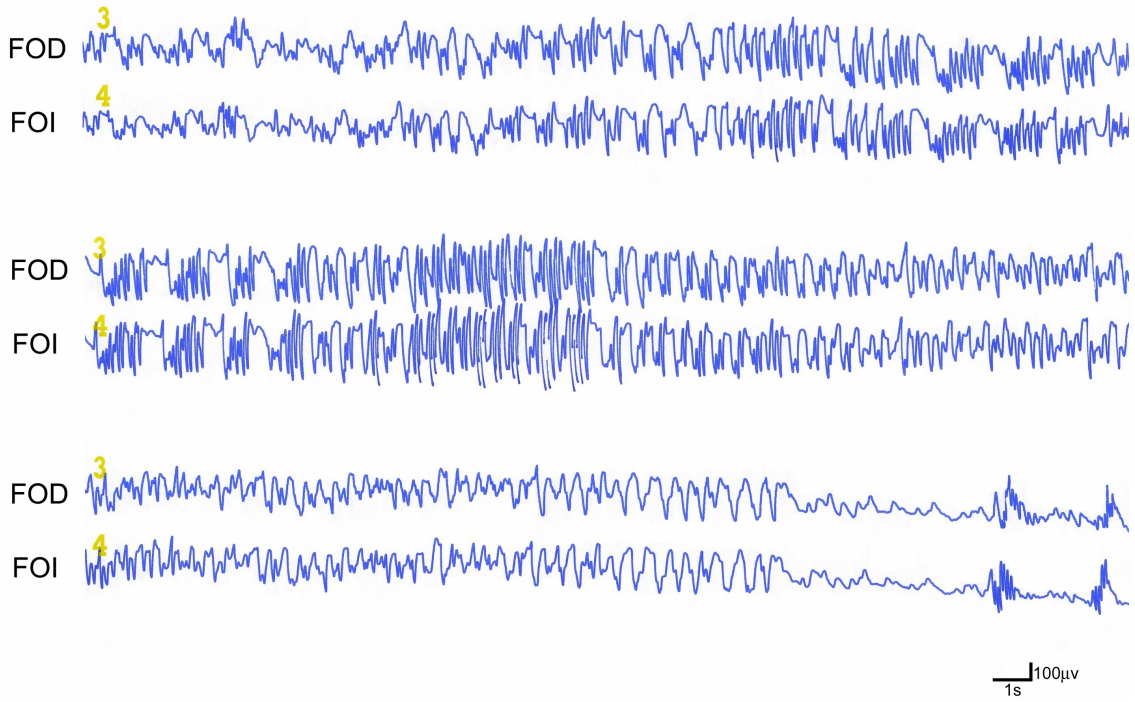


Figura 31. Electroencefalograma de una crisis epiléptica inducida por la perfusión de la latrunculina A (4µg/ml), durante ocho horas diarias tres días consecutivos (FOD: fronto-occipital derecho, FOI: fronto-occipital izquierdo).

Después un mes de la perfusión de la latrunculina A se monitorizaron los mismos animales previamente tratados con la latrunculina A, para comprobar si existía algún cambio de tipo crónico. En los registros electroencefalográficos se observó que algunos animales presentaban descargas intercríticas (fig. 32) y crisis epilépticas espontáneas.

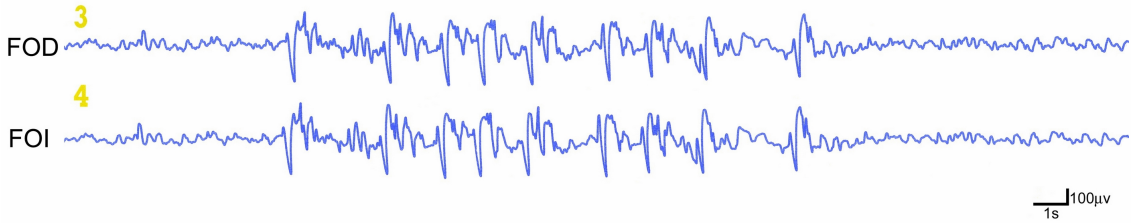


Figura 32. Electroencefalograma de una de una descarga intercrítica, durante un control con perfusión de Ringer, después de un mes de perfundida la latrunculina A (FOD: fronto-occipital derecho, FOI: fronto-occipital izquierdo).

Se ha estudiado el efecto anticonvulsivante de tres dosis sucesivas de ECA (3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 30 mg/Kg) administradas por vía oral, sobre la acción de la latrunculina A perfundida en el hipocampo durante ocho horas diarias tres días consecutivos. La administración de ECA a dosis de 10 y 30 mg/Kg suprime por completo las crisis epilépticas inducidas por la perfusión de latrunculina A (fig. 34). En la figura 33 A y B pueden observarse dos registros electroencefalográficos de vigilia y sueño, tomados durante los experimentos de administración de ECA 30 mg/Kg, que muestran la total ausencia de crisis y descargas paroxísticas en los animales tratados con ésta dosis. La administración de ECA a dosis de 3 mg/Kg suprime por completo las crisis en el 66,7 % de los animales estudiados (fig. 34), y reduce el número de descargas paroxísticas intercríticas durante el período de perfusión de latrunculina A.

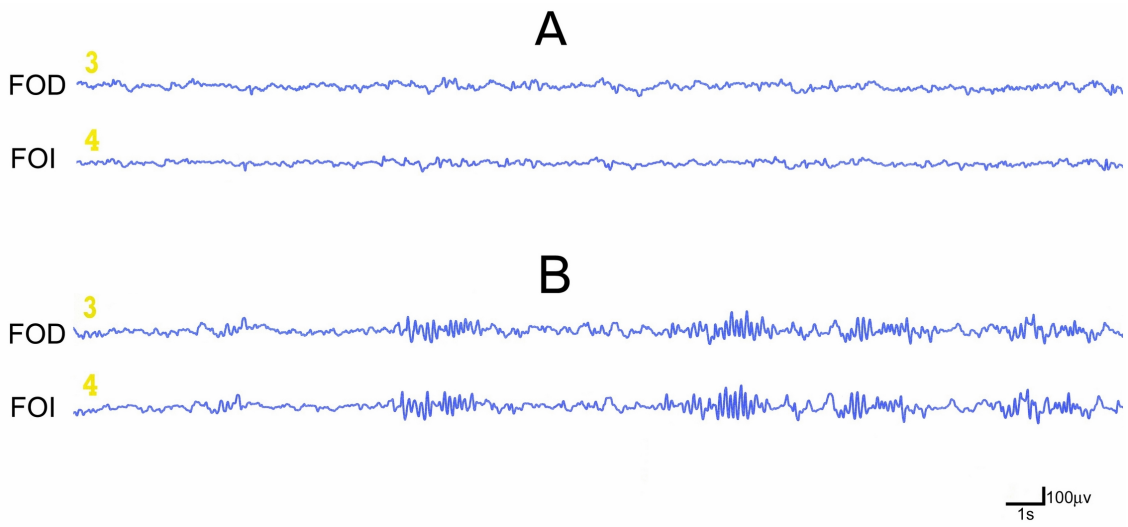


Figura 33. Electroencefalograma de vigilia (A) y de sueño (B) al administrar la dosis de ECA de 30 mg/Kg y la latrunculina A, durante ocho horas diarias tres días consecutivos (FOD: fronto-occipital derecho, FOI: fronto-occipital izquierdo).

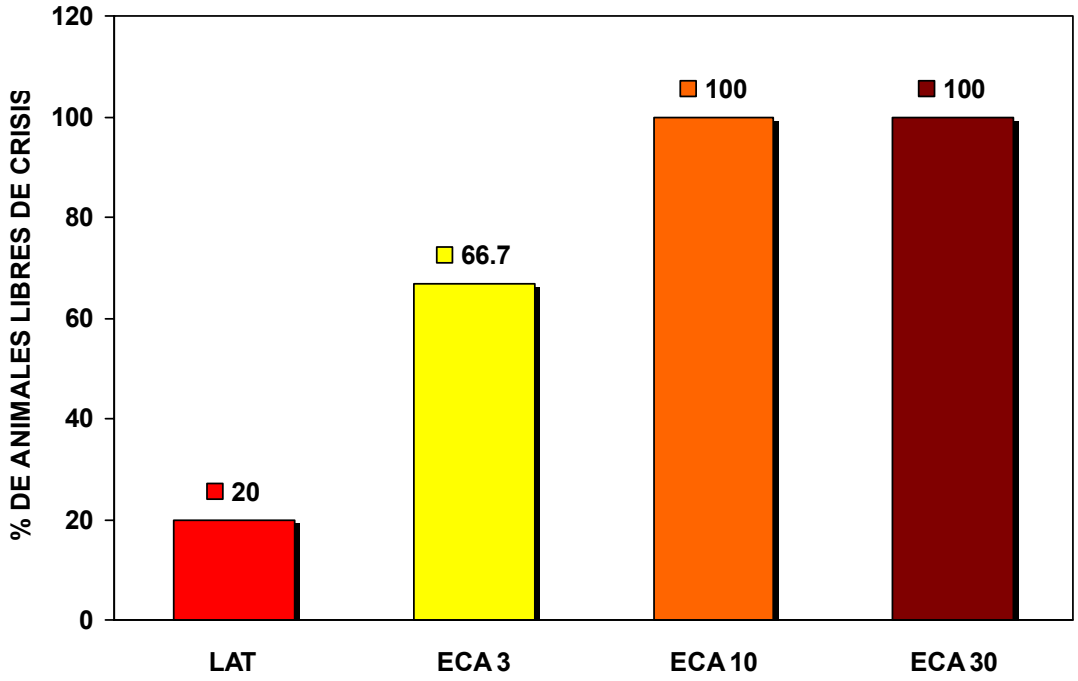


Figura 34. % de animales libres de crisis durante de la perfusión única de la latrunculina A (4 µg/ ml) (LAT) y de la latrunculina A con las distintas dosis de ECA (3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 30 mg/Kg) (ECA 3, ECA 10, ECA 30).

5. EFECTO DE LA LATRUNCULINA A SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

5.1. Efecto agudo

El efecto agudo se determina después de la perfusión durante 8 horas diarias tres días consecutivos de la latrunculina A (4µg/ml) en el hipocampo de la rata. Después de su perfusión a todos los grupos de animales se observa, que existe un aumento significativo de la concentración de todos los aminoácidos estudiados expresada como media±E.T.M. (error típico de la media), con respecto a los controles de aspartato (2,45±0,19 µM), glutamato (49,04±3,78 µM) y glicina (14,64±1,00 µM), como se observa en las figuras 35, 36 y 37. Para el aspartato la concentración medida después de perfusión de la latrunculina A es de 6,16±0,62 µM (p<0,05), para el glutamato de 80,01±8,22 µM (p<0,05) y para la glicina de 51,63±2,23 µM (p<0,05). Por lo que la administración de la latrunculina A provoca una alteración a corto plazo, sobre las concentraciones de todos los aminoácidos investigados.

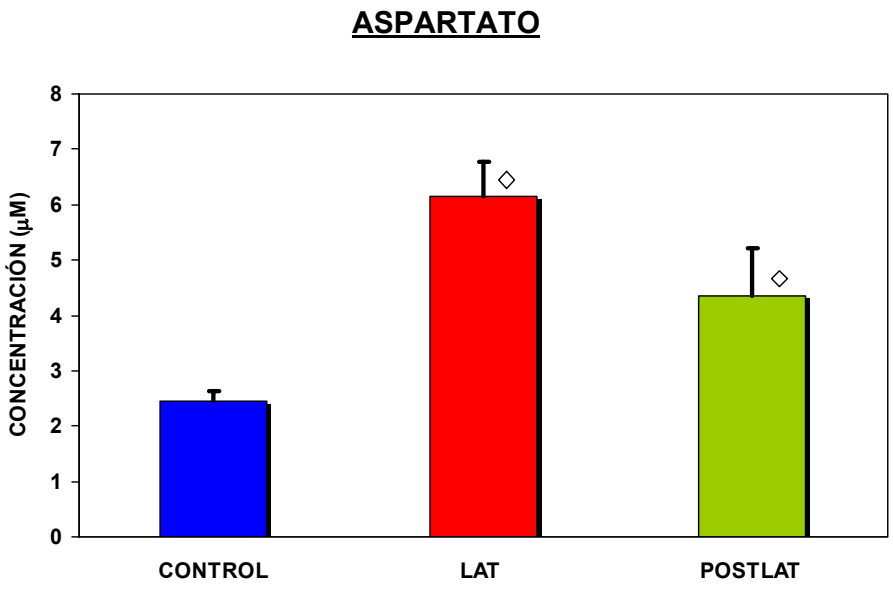


Figura 35. Efecto de la perfusión de la latrunculina A en el hipocampo de la rata, sobre la concentración de aspartato, después de tres días consecutivos (LAT) y después de un mes de haberse perfundido (POSTLAT). Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). Las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con los rombos, según prueba de Dunnett con respecto a controles.

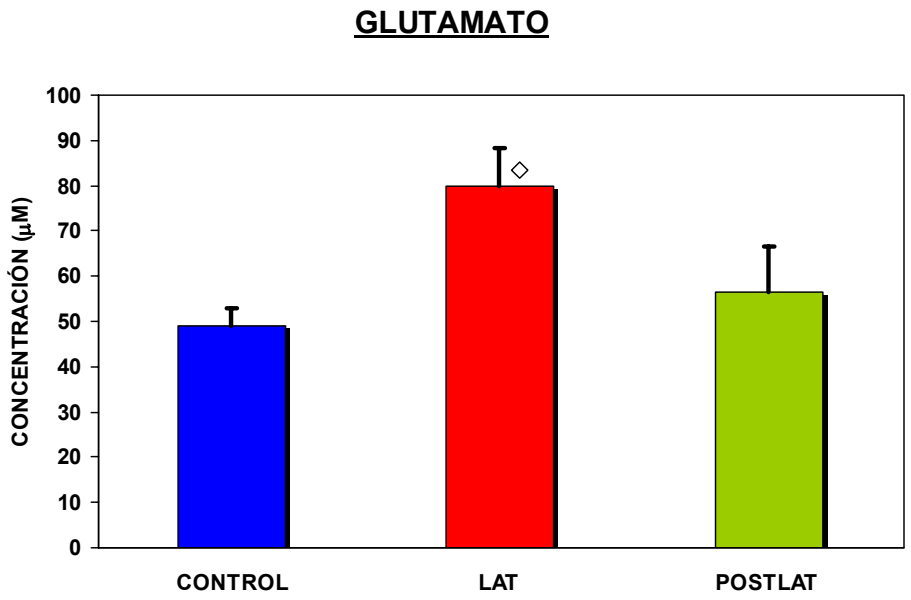


Figura 36. Efecto de la perfusión de la latrunculina A en el hipocampo de la rata, sobre la concentración de glutamato, después de tres días consecutivos (LAT) y después de un mes de haberse perfundido (POSTLAT). Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). La diferencia es significativa (p<0,05), indicada con el rombo, según prueba de Dunnett con respecto a controles.

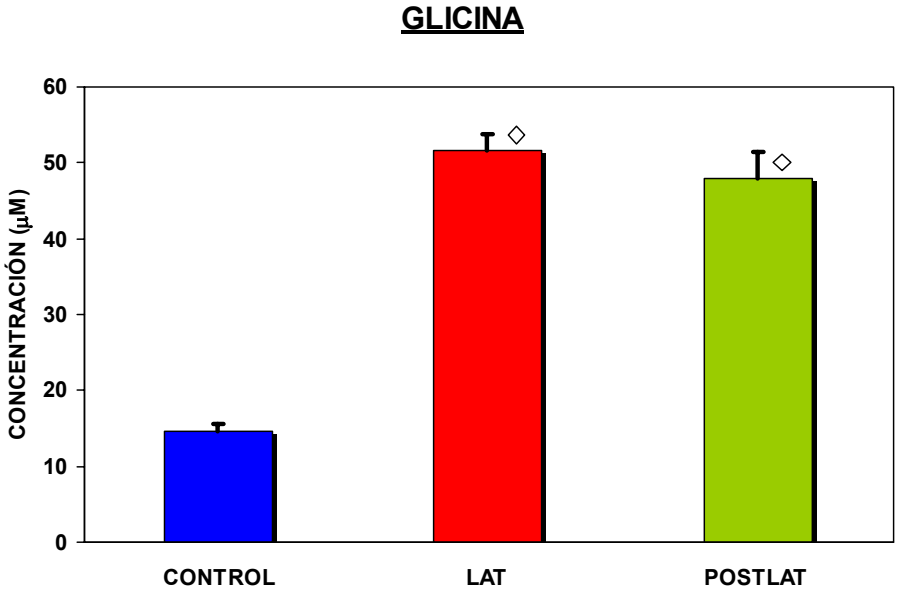


Figura 37. Efecto de la perfusión de la latrunculina A en el hipocampo de la rata, sobre la concentración de glicina, después de tres días consecutivos (LAT) y después de un mes de haberse perfundido (POSTLAT). Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). Las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con los rombos, según prueba de Dunnett con respecto a controles.

5.2. Efecto crónico

Para comprobar la posibilidad de un efecto crónico de la latrunculina A sobre las concentraciones de los diferentes aminoácidos, se utilizan los mismos grupos de animales ya tratadas de modo agudo con la latrunculina A. Para ello, después de un mes de perfundida la latrunculina A, se les realiza un control con perfusión de Ringer durante 8 horas. Se ha observado un incremento significativo en las concentraciones de aspartato (4,35±0,85 μM) (p<0,05) y de glicina (47,00±3,65 μM) (p<0,05) con respecto a los controles (figuras 35 y 37). Sin embargo, la concentración de glutamato (56,44±10,11 μM) no es significativamente diferente al control (fig. 36).

6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ECA SOBRE LAS MODIFICACIONES EN LAS CONCENTRACIONES DE AA PRODUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A

6.1. Aspartato

La concentración del aspartato tras la administración conjunta de la latrunculina A y de cada un de las dosis de ECA, sufre una disminución significativa con respecto a la perfusión única de la latrunculina A. Éstos valores no son significativamente diferentes a los anteriormente descritos para los controles, tal como se representa en la figura 38. Después de administrar la dosis de 3 mg/Kg de ECA, el valor de la concentración del aspartato cae, con respecto a los valores detallados para la latrunculina A, a 3,03±0,35 µM (p<0,05), para ECA 10 mg/Kg a 1,76±0,14 µM (p<0,05) y para ECA 30 mg/Kg a 2,17±0,20 µM (p<0,05) (figuras 38, 39 y 40). Valores que son en todos los casos, inferiores a los descritos anteriormente para la latrunculina A, por ello todas las dosis de ECA administradas disminuyen el efecto agudo por la perfusión de la latrunculina A.

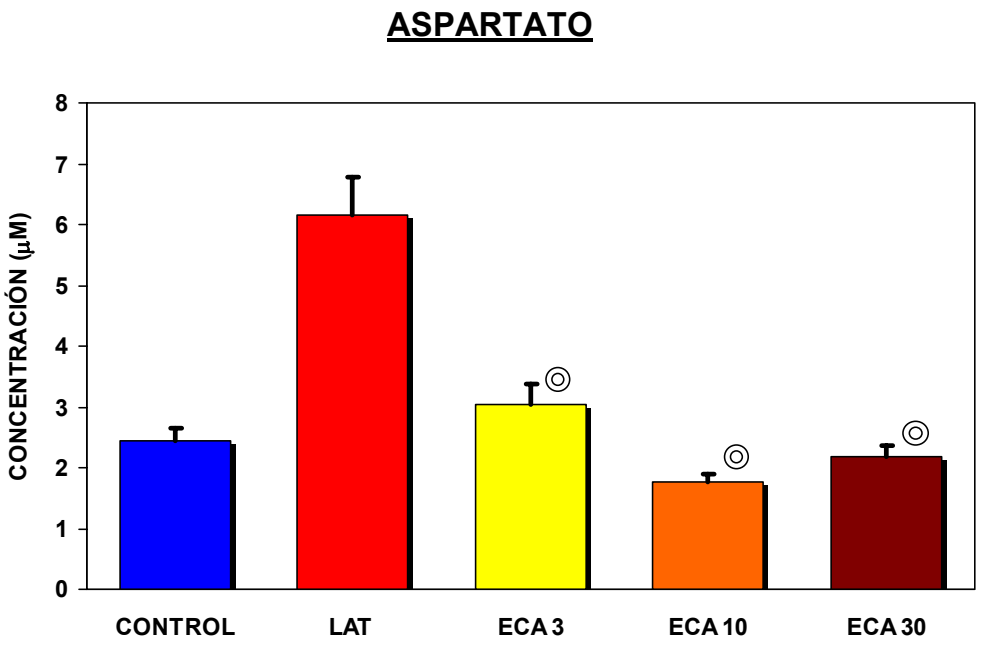


Figura 38. Efecto de la administración de cada una de las distintas dosis de ECA (3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 30 mg/Kg) y de la latrunculina A, sobre la concentración de aspartato. Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). Las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con los círculos, según prueba de Bonferroni con respecto a la latrunculina A (LAT).

6.2. Glutamato

La concentración del glutamato tras la administración conjunta de la latrunculina A y de cada una de las dosis de ECA con respecto a la perfusión única de la latrunculina A, sufre al igual que el aspartato una disminución significativa, volviendo a valores no significativamente diferentes a los descritos para los controles, tal como se representa en la figura 39.

En el caso de la dosis de 3 mg/Kg de ECA, el valor de la concentración del glutamato desciende, con respecto a los valores detallados para la latrunculina A, a 53,27±5,95 µM (p<0,05), para ECA 10 mg/Kg a 44,95±4,80 µM (p<0,05) y para ECA 30 mg/Kg a 30,36±3,70 µM (p<0,05) (figuras 38, 39 y 40). Éstos valores de la concentración del glutamato son, para todas las concentraciones de ECA estudiadas, inferiores a los descritos anteriormente para la latrunculina A, por ello todas las dosis de ECA administradas disminuyen el efecto agudo por la perfusión de la latrunculina A.

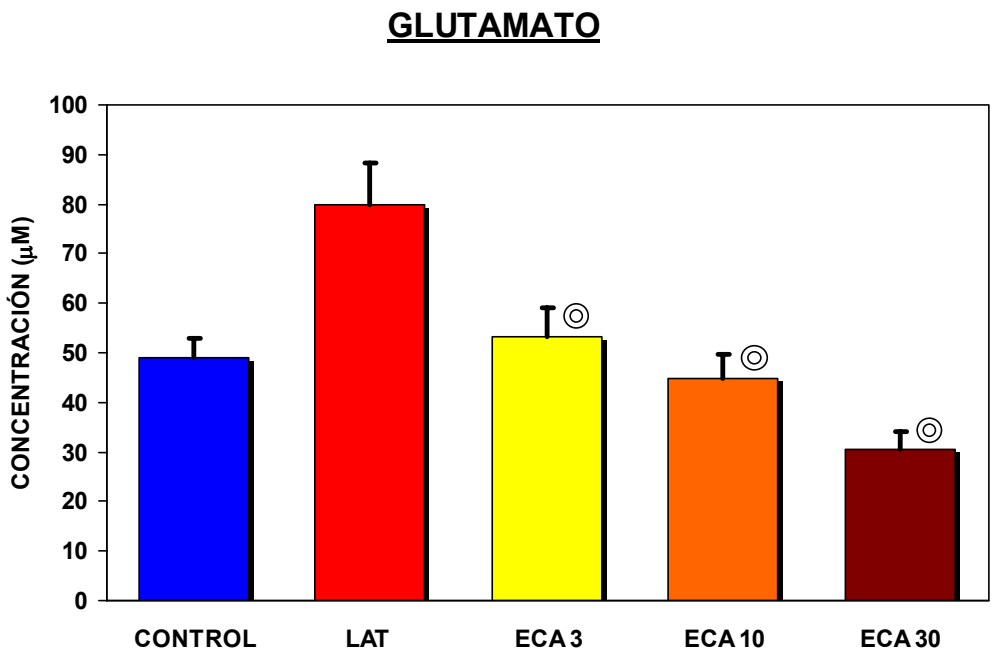


Figura 39. Efecto de la administración de cada una de las distintas dosis de ECA (3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 30 mg/Kg) y de la latrunculina A, sobre la concentración de glutamato. Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). Las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con los círculos, según prueba de Bonferroni con respecto a la latrunculina A (LAT).

6.3. Glicina

La concentración de glicina, tras la administración conjunta de la latrunculina A y de cada una de las dosis de ECA, con respecto a la perfusión única de la latrunculina A, sufre al igual que en el caso de los aminoácidos anteriores una disminución significativa, volviendo a valores similares descritos para los controles, tal como se representa en la figura 40.

Para la dosis de 3 mg/Kg de ECA el valor de la concentración del glutamato disminuye, con respecto a los valores detallados para la latrunculina A, a 34,20±1,76 µM (p<0,05), para ECA 10 mg/Kg a 24,77±1,83 µM (p<0,05) y para ECA 30 mg/Kg a 24,75±2,24 µM (p<0,05) (figuras 38, 39 y 40). Los valores de la concentración de glicina son, para todas las dosis de ECA estudiadas, inferiores a los descritos anteriormente para la latrunculina A, por ello todas las dosis de ECA administradas disminuyen el efecto agudo por la perfusión de la latrunculina A.

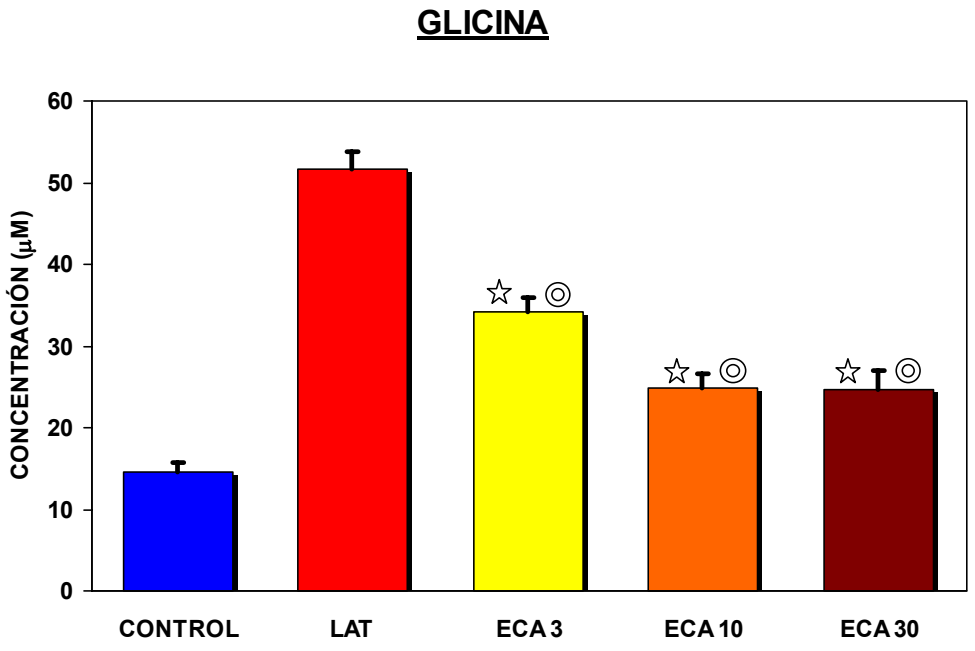


Figura 40. Efecto de la administración de cada una de las distintas dosis de ECA (3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 30 mg/Kg) y de la latrunculina A, sobre la concentración de glicina. Los datos están expresados como media±E.T.M. (µM). Con respecto a la latrunculina A (LAT) las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con los círculos, según prueba de Bonferroni. Con respecto al control las diferencias son significativas (p<0,05), indicadas con las estrellas, según prueba de Dunnett.


GLICINA
DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DEL ASPARTATO, GLUTAMATO Y GLICINA EN EL LÍQUIDO INTERNEURONAL

El método cromatográfico descrito por Cohen y Michaud en 1993, utilizando derivatización precolumna con AQC y detección por fluorescencia, presenta numerosas ventajas tal como se detalló en la Introducción: el proceso de derivatización es sencillo y rápido, el reactivo derivatizante y los compuestos derivatizados son muy estables, además éstos compuestos presentan una buena respuesta lineal y muy reproducible (Cohen y De Antonis, 1994; Van Wandelen y Cohen, 1997), no interfiere el exceso de derivatizante en la detección de los aminoácidos derivatizados, la separación de los analitos es excelente (Cohen y Michaud, 1993), y existe la posibilidad de utilizar reactivos comercializados. Recurriendo a la detección por fluorescencia se aumenta la sensibilidad consiguiendo niveles de detección del rango de fentomoles (Cohen, 2000). Ésta técnica fue optimizada para la determinación de aminoácidos, tanto primarios como secundarios, procedentes de hidrolizados de proteínas.

La derivatización con AQC se trata de una metodología que supera los inconvenientes de las técnicas existentes para la determinación de aminoácidos en fluidos biológicos, como en el caso del reactivo derivatizante FMOC-Cl. El cual, al contrario que con el AQC, tiene que extraerse por ser un reactivo fluorescente (Molnár-Perl, 2003; Josefsson, 2005). Otra técnica sobre la que el AQC presenta ventajas es la derivatización con OPA: el mayor inconveniente es su escasa estabilidad, con la derivatización con AQC la estabilidad del reactivo derivatizante e incluso de los compuestos derivatizados permanece como mínimo una semana (Cohen y Michaud, 1993). Por todo ello se ha escogido la derivatización precolumna con AQC como la metodología de análisis de referencia, para el análisis de aminoácidos procedentes de muestras de microdiálisis de líquido interneuronal en ratas.

Recientemente, Liu *et al*. (1998) desarrollaron una nueva aplicación para el AQC, el análisis de aminoácidos libres procedentes de microdiálisis en hipotálamo, tálamo y en sustancia negra de rata. Las muestras recogidas por microdiálisis se derivatizan directamente, sin tratamiento previo, y se inyectan en un cromatógrafo siguiendo un gradiente de pH, controlando la temperatura (40ºC o 50ºC) de la columna

e inyectando volúmenes de 20 µl. En comparación con éste trabajo, similar a la metodología aquí expuesta (Oreiro-García *et al*., 2005), se mejoran distintos aspectos importantes. Se utiliza un gradiente sin cambios de pH, lo que facilita los análisis cromatográficos sin perder la resolución del aspartato, glutamato y glicina; la temperatura de la columna es menor (30ºC), aumentando su tiempo de vida y mejorando la resolución de los analitos glutamato y glicina de los picos adyacentes. Los volúmenes de inyección son de tan sólo 5 µl, pudiéndose repetir la inyección de la misma muestras varias veces si es necesario y evitando distorsiones de los picos de los aminoácidos por volúmenes de muestra en la columna elevados. Aunque lo más destacable es la excelente reproducibilidad de las áreas de los picos y de los tiempos de retención para el aspartato, glutamato y glicina con el nuevo método (Oreiro-García *et al*., 2005), y la disminución en los niveles de detección en aproximadamente diez veces, como se demostró claramente en la descripción detallada de la técnica y en la validación/evaluación de la metodología descrita en los apartados de Material y Métodos, y Resultados.

Tal como describen Strydom y Cohen (1994) una correcta derivatización precolumna depende de la estabilidad de los compuestos derivatizados, de un proceso de derivatización reproducible, de la posible interferencia de los compuestos formados en el proceso de derivatización, y de la sencillez en la detección. Con el método descrito en este trabajo se superan todos los objetivos anteriores:

- Los compuestos derivatizados se forman en tan sólo un minuto y son estables durante más de una semana (Cohen y Michaud, 1993). Co mo se demostró en los Resultados tanto las muestras como el proceso de derivatización son estables durante como mínimo cinco meses, con lo que pueden realizarse gran cantidad de análisis de un modo automático.

- La excelente precisión y exactitud intra-día e inter-día de las áreas (*C.V*. ≤ 5,5% y exactitud ≤ 105,2%) y de los tiempos de retención (*C.V*. ≤ 0,3%) garantizan una identificación y una cuantificación, reproducible, exacta e inequívoca de los distintos aminoácidos (Oreiro-García *et al*., 2005) y por ello no es necesario analizar patrones entre muestras para confirmar el tiempo de retención de ningún analito (ver Resultados).

- Ninguno de los compuestos derivatizados formados, ni los productos del exceso de derivatizante (AMQ y NHS) interfieren en la determinación de los aminoácidos Asp, Glu y Gly (Cohen, 2005; Oreiro-García *et al*., 2005).

- La detección por fluorescencia permite análisis con una alta sensibilidad y muy sencillos (Cohen, 2000).

Como se expuso en los Resultados se determina con una óptima selectividad, los aminoácidos Asp, Glu y Gly en volúmenes muy pequeños (10 µl) procedentes de muestras biológicas recogidas mediante microdiálisis en cerebro de rata. Inclusive en muestras tan dispares como las que se obtienen durante los distintos experimentos, donde las concentraciones pueden variar en rangos muy extremos, desde los 200 µM del glutamato en los experimentos de la perfusión de la latrunculina A, hasta los 0,5 µM del aspartato en la administración oral de ECA, pero siempre manteniendo una perfecta linealidad (R^2 ≥0,998) y con unos límites de detección del rango de fentomoles que permiten cuantificar el Asp, Glu y Gly en todas las muestras a estudio (Oreiro-García *et al*., 2005).

2. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS CRISIS EPILÉPTICAS INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A

Los fármacos antiepilépticos disponibles en la actualidad, parecen actuar sobre un número muy limitado de dianas terapéuticas (fundamentalmente los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje, receptores $GABA_A$, receptores NMDA del glutamato, transportadores del GABA y la GABA transaminasa) (Levy *et al*., 1995). Sin embargo, muchos estudios apuntan a que las posibles alteraciones bioquímicas causantes de la epilepsia, pueden encontrarse en otras moléculas que participan en los complejos procesos de regulación de la transmisión de información, desde la síntesis y liberación de neurotransmisores hasta la expresión génica en la neurona postsináptica y los mecanismos de plasticidad y desarrollo (Delgado-Escueta *et al*., 1999). El desarrollo y estudio de nuevos modelos experimentales *in vivo* de epilepsia parece un excelente método para localizar mecanismos bioquímicos específicos, indicar nuevas dianas terapéuticas y ensayar nuevos fármacos. Partiendo de éstos antecedentes el presente trabajo aporta nueva información bioquímica sobre el modelo de epilepsia experimental por perfusión de la latrunculina A en el hipocampo, así como el efecto de un nuevo fármaco antiepiléptico en fase III de ensayo clínico, la eslicarbazepina acetato o ECA.

Inicialmente, se ha estudiado el efecto de la ECA (en dosis de 3, 10 y 30 mg/Kg, administradas por vía oral) sobre las crisis agudas inducidas durante la perfusión de la latrunculina A. Los efectos de la microperfusión de la latrunculina A (4 µg/ml) en el hipocampo de la rata son similares a los obtenidos en investigaciones previas (Sierra-Paredes *et al*., 2000b, 2001a; Vázquez-López *et al*., 2005; Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006), donde se ha observado la aparición de crisis epilépticas agudas durante la perfusión, y de crisis crónicas espontáneas a partir de un mes después de su administración.

Los resultados han demostrado una excelente acción anticonvulsivante de la ECA a dosis de 10 y 30 mg/Kg, suprimiendo completamente las crisis. La dosis de ECA de 3 mg/Kg muestra también un buen efecto anticonvulsivante, pues suprime completamente las crisis en el 66,7% de los animales estudiados. En el caso de la rata, la ECA es metabolizada a OXC (Hainzl *et al*., 2001), por lo que no puede

excluirse que el efecto observado sea consecuencia de la acción conjunta de ambas sustancias.

Resultados que completan la información previa acerca de la acción de la ECA en modelos experimentales *in vitro* (Bonifácio *et al*., 2001; Cunha *et al*., 2002), y su eficacia anticonvulsivante *in vivo* frente a las crisis por electroshock y por inyección de metrazol (Ambrósio *et al*., 2002), así como el efecto anticonvulsivante de dosis similares por vía oral frente a las crisis epilépticas provocadas mediante perfusión de picrotoxina en el hipocampo (Sierra-Paredes *et al*., 2004).

Es de destacar que las dosis estudiadas de ECA son más eficaces en la protección contra las crisis inducidas por la latrunculina A, que frente a las crisis inducidas por microperfusión de picrotoxina, modelo en el que sólo la dosis de 30 mg/Kg suprime las crisis en el 75% de los animales (Sierra-Paredes *et al*., 2004). Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de la latrunculina A parece relacionado con los receptores NMDA del glutamato (Vázquez-López *et al*., 2005; Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006), mientras que la picrotoxina es un antagonista del receptor $GABA_A$. Los resultados expuestos apoyan la hipótesis de que la acción de la ECA pudiera estar relacionada con los mecanismos de neurotransmisión glutamatérgica, aunque no actúe directamente sobre los receptores ionotrópicos del glutamato (Ambrósio *et al*., 2002).

3. EFECTO DE LA LATRUNCULINA A SOBRE LAS CONCENTRACIONES EXTRACELULARES DE LOS AA

Los resultados de esta memoria muestran, que la administración aguda de latrunculina A, incrementa significativamente las concentraciones extracelulares de aspartato, glutamato y glicina, tres aminoácidos relacionados con la actividad de los receptores NMDA del glutamato.

En numerosos estudios previos, se ha expuesto que las modificaciones en las concentraciones de aminoácidos durante las crisis epilépticas, parecen estar relacionado con el modelo de epilepsia experimental utilizado, la severidad y la duración de las crisis epilépticas (Rogawski, 1995). Así, algunos trabajos coinciden en señalar un incremento en los niveles de glutamato en el líquido extracelular interneuronal (Walker *et al*., 1995; Liu *et al*., 1997), si bien otros autores no han encontrado modificaciones significativas en los niveles extracelulares de glutamato y de otros aminoácidos durante las crisis epilépticas experimentales (Lehman y Hansson, 1988; Millan *et al*., 1991).

En el caso de las crisis inducidas por microperfusión de picrotoxina en el hipocampo de ratas, se han observado disminuciones significativas en las concentraciones de glutamato y aspartato (Sierra-Paredes *et al*., 1998) sin modificaciones en la concentración de glicina. Cabe destacar que el incremento en las concentraciones extracelulares de aminoácidos, suele ser observada en modelos experimentales de epilepsia que dan lugar a crisis crónicas (Ueda y Tsuru, 1995), como es el caso de la perfusión de la latrunculina A.

En los estudios realizados en muestras procedentes de focos epilépticos humanos, es más frecuente encontrar un aumento significativo en las concentraciones de glutamato, aspartato y glicina, especialmente durante crisis intensas y *status epilepticus* (Sherwin, 1999), lo que ha llevado a proponer que el tejido epileptogénico humano puede tener una capacidad mayor de síntesis de aminoácidos excitatorios, que la observada en los modelos experimentales de epilepsia tradicionales (Sherwin, 1999). Concepto apoyado por diversas observaciones acerca de algunos enzimas que regulan el metabolismo del glutamato y aspartato, como la glutamato deshidrogenasa

(Sherwin, 1999) y la aspartato aminotransferasa (Kish *et al*., 1988). El aumento de actividad metabólica de los astrocitos estimulados por las crisis o las frecuentes descargas intericticales, parece tener relación con las modificaciones en las concentraciones de glutamato y aspartato en el tejido epiléptico humano (Sherwin, 1999).

Investigaciones realizadas *in vitro* (Morales *et al*., 2000) han manifestado que la despolimerización de la actina mediante la latrunculina A, incrementa la frecuencia de potenciales excitatorios postsinápticos, lo que se atribuye a un aumento en la liberación de neurotransmisores por un proceso independiente de calcio. Un efecto específico del tratamiento con la latrunculina A, y no causado por otros agentes despolimerizantes de la actina como la citocalasina D. Morales *et al*. (2000) proponen que los filamentos de actina participan en un mecanismo de regulación que impide la fusión de las vesículas sinápticas en la zona activa de las sinapsis, sin embargo, no miden directamente las concentraciones de neurotransmisor liberado.

En los resultados obtenidos durante la administración aguda de la latrunculina A en animales vivos no anestesiados y en libre movimiento, es de destacar que, mientras la concentración de glutamato se incrementa en un 60% (de 49,04±3,78 μM a 80,01±8,22 μM) en el caso del aspartato y la glicina, el incremento es del 150% (de 2,45±0,19 μM a 6,16±0,62 μM) y del 250% (de 14,64±1,00 μM a 51,63±2,23 μM) respectivamente. Teniendo en cuenta que se conoce que la liberación y recaptación de cada uno de los aminoácidos se realiza por mecanismos diferentes (Semba *et al*., 1995; Danysz y Parsons, 1998; Bradford y Nadler, 2004), parece que la latrunculina A *in vivo* altera en mayor medida los mecanismos que regulan las concentraciones extracelulares de aspartato y glicina, aminoácidos que parecen actuar preferentemente sobre los receptores NMDA extrasinápticos (Bradford y Nadler, 2004). Otra explicación de estas divergencias puede ser, que los mecanismos gliales y vasculares de eliminación del glutamato, parecen ser más activos que los de eliminación de la glicina y de aspartato (Hertz, 1979; O'Kane *et al*., 1999). Las diferencias en las alteraciones de las concentraciones extracelulares de aminoácidos cobran mayor interés con el estudio del efecto crónico de la latrunculina A, que muestra que las concentraciones intercelulares de aspartato y glicina permanecen incrementadas pasados un mes después del tratamiento, mientras que las concentraciones de glutamato tienden a

recuperar sus niveles basales. Lo que podría indicar que el aumento de excitabilidad permanente que se observa, en los animales después de la administración de la latrunculina A está más en relación con los niveles de glicina y aspartato que con los de glutamato, lo que, sin excluir otros posibles mecanismos bioquímicos a largo plazo, sugiere tres interesantes hipótesis:

i) las alteraciones agudas de la concentración del glutamato observadas durante la perfusión de la latrunculina A, podrían estar en relación con el fenómeno de regulación de las vesículas sinápticas por la actina descrito por Morales *et al*. (2000). Una vez desaparecida la acción de la latrunculina A, el efecto presináptico desaparecería y la liberación de glutamato regresaría a sus niveles normales. Sin embargo, teniendo en cuenta que ni el aspartato ni la glicina se acumulan en vesículas, la latrunculina A debe alterar, esta vez de forma permanente, otros mecanismos bioquímicos implicados en la regulación de las concentraciones extracelulares de dichos aminoácidos. Explicación con el inconveniente, ya comentado en la Introducción, de que el glutamato liberado en las sinapsis no suele alcanzar el espacio intercelular. Sin embargo, no puede excluirse que el tratamiento con latrunculina A produzca alteraciones en el citoesqueleto de los astrocitos, permitiendo la difusión extrasináptica del glutamato sináptico.

ii) teniendo en cuenta que los astrocitos parecen los principales responsables de la concentración extracelular de ambos aminoácidos, los datos crónicos obtenidos favorecen la teoría del importante papel de la glía en la epileptogénesis, tal y como ha sido propuesto recientemente (Tian *et al*., 2005). Mediante la activación de receptores NMDA extrasinápticos por las elevadas concentraciones de glicina y aspartato, los astrocitos pueden colaborar en la sincronización de la actividad de múltiples neuronas (Sierra-Paredes *et al*., 2000a; Tian *et al*., 2005) y mantener una alta excitabilidad que se manifiesta en la disminución al umbral de picrotoxina (Sierra-Paredes *et al*., 2005, 2006), y la sensibilidad al aumento en la concentración de glutamato (Vázquez-López *et al*., 2005).

iii) teniendo en cuenta las observaciones *in vitro* acerca del desplazamiento de receptores NMDA a posiciones extrasinápticas como efecto de la latrunculina A (Allison *et al*., 1998, 2000; Sattler *et al*., 2000), parece muy probable que el número de

receptores extrasinápticos permanezca aumentado en los animales tratados, por lo que el significativo incremento en las concentraciones de glicina y aspartato puede tener un efecto epileptogénico que no se observa en animales normales (Sierra-Paredes *et al*., 2001b).

Los resultados obtenidos en esta memoria, también permiten conciliar dos tipos de observaciones frecuentes en el estudio del cerebro de los pacientes epilépticos: las alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas y el incremento en las concentraciones de glutamato, glicina, aspartato y otros aminoácidos.

Aunque se ha propuesto repetidas veces que el incremento en las concentraciones extracelulares es neurotóxico y puede dar lugar a un daño neuronal y por ello a crisis epilépticas, diversos estudios realizados en animales vivos demuestran que es posible incrementar la concentración de glutamato y glicina sin que se produzca daño neuronal ni crisis epilépticas (Obrenovitch *et al*., 1997a, 1997b; Sierra-Paredes *et al*., 2000a, 2001b). Observaciones que conjuntamente con el hecho de que las dendritas están aisladas del líquido extracelular por los astrocitos (Harris y Rosenberg, 1993), llevó a varios investigadores a proponer que el glutamato exógeno nunca llega al espacio postsináptico, y que su acción sólo se manifiesta en determinadas condiciones por la activación de receptores extrasinápticos (Sierra-Paredes *et al*., 1999; Sinor *et al*., 2000).

Diversas investigaciones sugieren que la compartimentalización y distribución de los receptores NMDA, así como la unión de los receptores NMDA a proteínas intracelulares son muy importantes para que se produzca la excitotoxicidad (Furukawa *et al*., 1997; Sattler *et al*., 1998, 1999). Es muy posible que la comunicación entre el receptor NMDA y los mecanismos moleculares intracelulares que permiten un aumento de la excitabilidad o la muerte celular sean diferentes en las dendritas que en el cuerpo celular (Sinor *et al*., 2000). Sugiriendo que la acción patológica del glutamato extracelular debería incrementarse al aumentar el número de receptores NMDA no sinápticos.

La fijación de los receptores en los elementos postsinápticos, dio lugar al concepto de una organización relativamente estable de la membrana postsináptica.

Sin embargo, numerosas publicaciones recientes han demostrado que los receptores AMPA y NMDA del glutamato, son elementos móviles que pueden desplazarse con rapidez mediante endo/exocitosis, y a través de la membrana a posiciones extrasinápticas (Carroll *et al*., 1999; Tovar y Westbrook, 1999; Hayashi *et al*., 2000; Liu y Cull-Candy, 2000).

Además, los estudios realizados *in vitro* sobre la acción de la latrunculina A indican que la despolimerización de los filamentos de actina, da lugar al desplazamiento de los receptores AMPA y NMDA a posiciones extrasinápticas (Allison *et al*., 1998, 2000; Sattler *et al*., 2000). En conjunto todos los estudios previos realizados *in vitro*, así como con las observaciones en pacientes epilépticos, parece sugerir que la acción epileptógena del glutamato, la glicina y el aspartato extracelulares sólo se produce cuando existe una alteración previa en la estructura o la posición de los receptores ionotrópicos del glutamato.

Hardingham *et al*. (2002) han señalado que la clave que determina la naturaleza de la señal transmitida a través de los receptores NMDA, es la localización de los receptores activados (Riccio y Ginty, 2002). Nuevos resultados que apoyan la idea de que las señales que favorecen la supervivencia de las neuronas, son transmitidas a través de receptores sinápticos, mientras que las que favorecen la muerte neuronal son transmitidas a través de receptores no sinápticos. En experimentos realizados en cultivos de neuronas del hipocampo, se ha descrito que la activación de los receptores sinápticos mediante el inhibidor del GABA bicuculina, induce la fosforilación del factor de transcripción CREB en el residuo regulador Ser 133. De ese modo, la activación de los receptores NMDA sinápticos promueve la expresión de genes dependientes de CREB y la supervivencia de las neuronas.

Sin embargo, cuando se activan los receptores NMDA extrasinápticos, CREB sólo es fosforilada de modo transitorio, sin llegar a activar la expresión de genes dependientes, y las neuronas en cultivo mueren. Parece que la señal transmitida a través de los receptores NMDA extrasinápticos, sea la de inhibir la transcripción dependiente de CREB.

Los resultados obtenidos *in vivo* (Sierra-Paredes *et al*., 2001b; Vázquez-López *et al*., 2005) no parecen apoyar la idea de que la señal de los receptores NMDA extrasinápticos lleve necesariamente a la muerte neuronal, pero han de tenerse en cuenta las diferencias entre el número de señales intercelulares, que le llegan a la neurona en el cerebro y las que le llegan en cultivo. El cultivo empleado por Hardingham *et al*. (2002), carece de astrocitos, lo que de por sí desposee a las neuronas de diversas señales antiapoptóticas (Rothstein *et al*., 1996).

Un aspecto interesante es, cómo pueden distinguir las neuronas entre la señal que les llega desde los receptores sinápticos y los extrasinápticos. Algunas publicaciones manifiestan que las propiedades farmacológicas de unos y otros receptores son diferentes (Riccio y Ginty, 2002). Los complejos sinápticos y extrasinápticos de receptores NMDA, pueden estar compuestos de subunidades diferentes (Tovar y Westbrook, 1999): los heterómeros NR1/NR2B parecen localizarse preferentemente en posiciones extrasinápticas. Lu *et al*. (2001) han mostrado *in vitro* que, mientras que la activación de los receptores NMDA sinápticos favorece la potenciación a largo plazo (LTP), la activación de los extrasinápticos induce depresión a largo plazo (LTD). También, los receptores NMDA están asociados a un gran número de proteínas (Ponting *et al*., 1997), y es muy probable que las proteínas asociadas sean diferentes en las posiciones sinápticas y extrasinápticas, dando lugar a señales diversas. El tratamiento con la latrunculina A puede modificar cualquiera de éstos aspectos. Aunque en general se habla de “movilización” de los receptores sinápticos a posiciones extrasinápticas (Allison *et al*., 1998; Tovar y Westbrook, 2002), no existe evidencia de que los receptores que aparecen en posiciones extrasinápticas, sean los mismos que se encontraban en el espacio postsináptico. Parece posible que la despolimerización de los filamentos de actina pueda dar lugar a la internalización y proteolisis de los receptores (Zhou *et al*., 2001). Al mismo tiempo que nuevos receptores, posiblemente con una distinta composición de subunidades, sean trasladados hasta la membrana neuronal sin el preciso control de localización que se produce en condiciones fisiológicas. Receptores que serían activados por el glutamato, glicina y aspartato extracelulares dando lugar a modificaciones bioquímicas que pueden inducir crisis epilépticas. La despolimerización de los filamentos de actina con la latrunculina A puede producir también alteraciones en la fijación de proteínas fijadas

a los receptores NMDA, modificando las señales intracelulares inducidas por receptores tanto sinápticos como extrasinápticos.

Es posible que el efecto de la latrunculina A sea incrementado por las crisis epilépticas, en las que los receptores NMDA extrasinápticos son probablemente activados por el aumento de excitabilidad de la neurona (Sierra-Paredes *et al*., 2000a). Además, durante las crisis epilépticas, la entrada masiva de calcio a través de los receptores NMDA produce de por sí despolimerización de los filamentos de actina, sumándose de este modo al efecto de la latrunculina A.

Los resultados obtenidos en esta memoria, junto con los estudios previos realizados acerca del modelo experimental de epilepsia mediante microperfusión de latrunculina A en el hipocampo de la rata, demuestran que en éste modelo parecen combinarse distintas alteraciones neuroquímicas para inducir crisis crónicas espontáneas. Así, se ha comprobado que al probable desplazamiento de receptores NMDA a posiciones extrasinápticas (Allison *et al*., 1998; Tovar y Westbrook, 2002) y las posibles alteraciones en las espinas dendríticas, se suman cambios en la actividad de la calcineurina (Vázquez-López, 2005), enzima responsable de la regulación de los receptores $GABA_A$, y un incremento crónico en las concentraciones de aspartato y glicina. Resultados que apoyan la hipótesis de que la epileptogénesis, a diferencia de la inducción de crisis agudas, es un proceso multifactorial que requiere la coordinación de numerosos agentes neuroquímicos y morfológicos.

A la vista de los datos disponibles, es posible proponer una secuencia bioquímica de eventos implicada en la epileptogénesis experimental mediante latrunculina A. Secuencia que supondría el desplazamiento de receptores NMDA a posiciones extrasinápticas, activación más frecuente de dichos receptores (sobre todo cuando las neuronas reciben un exceso de estimulación) debido a las altas concentraciones extracelulares de glicina y aspartato, aumento en la concentración de calcio intracelular en compartimentos extrasinápticos, activación de la calcineurina y regulación negativa de los receptores $GABA_A$. Hipotética secuencia que deberá ser comprobada en posteriores investigaciones.

4. EFECTO DE LA ECA SOBRE LAS MODIFICACIONES DE LOS AA EXTRACELULARES INDUCIDAS POR LA LATRUNCULINA A

Aunque el estudio de la eficacia de un fármaco en evitar las alteraciones neuroquímicas inducidas por crisis epilépticas experimentales no siempre nos revela su mecanismo de acción, sí es un buen indicio para evaluar su capacidad antiepiléptica.

En los experimentos realizados se ha observado por primera vez que la administración de diferentes dosis de ECA (3, 10 y 30 mg/Kg) a ratas tratadas con latrunculina A previene el incremento en las concentraciones de glutamato, glicina y aspartato, manteniéndolas en valores significativamente menores que la administración única de la latrunculina A y, en el caso del glutamato y aspartato, en valores no significativamente diferentes de los valores control. Datos neuroquímicos coherentes con la excelente eficacia anticonvulsivante que muestran las dosis de ECA estudiadas.

Los resultados obtenidos *in vivo* corroboran estudios previos, realizados *in vitro*, en los que la ECA inhibe la liberación del glutamato endógeno en sinaptosomas (Ambrósio *et al*., 2001) y de glutamato, aspartato y GABA inducidos por veratridina en cortes de estriado (Parada y Soares-da-Silva, 2002), efecto atribuido en ambos casos a la inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Estudios realizados mediante microdiálisis han mostrado que la CBZ, fármaco antiepiléptico de estructura y acción similar a la ECA, posee un efecto semejante sobre el incremento en la concentración de glutamato en el hipocampo producida por cloruro potásico (Okada *et al*., 1998). Sin embargo, en un trabajo más reciente (Ahmad *et al*., 2005), se observó que la CBZ, a diferencia de otros antiepilépticos como la fenitoína y la lamotrigina, no alteraba el aumento en las concentraciones de glutamato y aspartato inducidas por veratridina. Las diferencias observadas en éstos casos pueden ser debidas al uso de diferentes modelos experimentales para inducir un aumento del glutamato extracelular no directamente relacionado con las crisis epilépticas. Parece una mejor estrategia estudiar el efecto neuroquímico de los fármacos antiepilépticos en modelos experimentales de epilepsia, en los que las modificaciones en las

concentraciones de aminoácidos neuroactivos se encuentran en relación con los mecanismos de las crisis.

La mayor regulación en las concentraciones de glutamato y aspartato en comparación con las de glicina pueden deberse a dos posibles causas: tanto a la liberación de glutamato como de aspartato parecen ser calcio-dependientes (Bradford y Nadler, 2004), mientras que en el caso de la glicina no parece ser así (Semba *et al*., 1995). La acción de la ECA sobre los canales de sodio voltaje-dependientes puede regular la concentración de calcio intracelular, inhibiendo la liberación de glutamato y aspartato sin afectar a la de glicina. Por último, es posible una acción facilitadora de la ECA sobre los transportadores específicos del glutamato y aspartato, similar a la descrita recientemente para concentraciones terapéuticas de CBZ (Lee *et al*., 2005) sobre los EAAT3. Aunque es muy difícil establecer todavía las relaciones entre éste efecto y las capacidades antiepilépticas de la CBZ. Lee *et al*. (2005) proponen que el incremento en la actividad de los EAAT3 puede reducir la neurotransmisión glutamatérgica y facilitar la GABAérgica.

El presente trabajo ha permitido el desarrollo y estudio de un nuevo método de RP-HPLC para el análisis de aminoácidos libres en muestras procedentes de microdiálisis obtenidas del hipocampo de ratas despiertas y con libertad de movimientos. La aplicación de éste método ha aportado nuevos datos sobre las modificaciones neuroquímicas que se producen durante la epileptogénesis inducida por microperfusión de la latrunculina A en el hipocampo. Además ha permitido el estudio de la acción neuroquímica *in vivo* de la ECA. Serán necesarias nuevas investigaciones para determinar la importancia de éstos mecanismos neuroquímicos en la epileptogénesis humana y en la acción anticonvulsivante de la ECA.


CONCLUSIONES

I. Se ha desarrollado y validado una metodología adecuada para el análisis de aminoácidos libres procedentes de microdializado del hipocampo de rata. Se ha utilizado para ello la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, con detección por fluorescencia y derivatización precolumna con AQC. La técnica descrita permite automatizar todo el proceso, cuantificando perfectamente y en un sólo análisis los aminoácidos neuroactivos aspartato, glutamato y glicina.

II. Los efectos de la administración oral de distintas dosis de ECA sobre las crisis epilépticas inducidas por la latrunculina A han demostrado una excelente acción anticonvulsivante. Las dosis de 10 y 30 mg/Kg suprimen completamente las crisis. La dosis de ECA de 3 mg/Kg muestra también un buen efecto anticonvulsivante, al suprimir completamente las crisis en el 66,7% de los animales. Los resultados expuestos apoyan la hipótesis de que la acción de la ECA pudiera estar relacionada con los mecanismos de neurotransmisión glutamatérgica, aunque no actúe directamente sobre los receptores ionotrópicos del glutamato.

III. Los resultados obtenidos durante la administración aguda de la latrunculina A revelan que las concentraciones de aspartato, glicina y glutamato se incrementan entre un 60% y un 250%. Los mayores aumentos se observan para el aspartato y para la glicina. Por ello parece que la latrunculina A *in vivo* altera los mecanismos que regulan las concentraciones extracelulares de glicina y aspartato, aminoácidos que parecen actuar preferentemente sobre los receptores NMDA extrasinápticos.

IV. El efecto crónico, pasado un mes después del tratamiento con la latrunculina A, muestra que las concentraciones intercelulares de glicina y aspartato permanecen incrementadas. Sin embargo las concentraciones de glutamato tienden a recuperar sus niveles basales. Se podría afirmar que el aumento de excitabilidad permanente en los animales después de la administración de la latrunculina A, está en relación con los niveles de glicina y aspartato, más que con los de glutamato.

V. La administración oral de ECA previene el aumento en las concentraciones de aspartato, glutamato y glicina. Éstas se mantienen en valores significativamente menores que la administración única de la latrunculina A. En el caso del aspartato y el glutamato, en valores no significativamente diferentes de los valores control.


BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Ahmad S., Fowler, L.J. y Whitton, P.S. Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytriptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res.* 2005; 63: 141-149.

Allison D.W., Chervin A.S., Gelfand V.I. y Craig A.M. Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J. Neurosci.* 2000; 20: 4545-4554.

Allison D.W., Gelfand V.I., Spector I. y Craig A.M. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA *versus* AMPA receptors. *J. Neurosci.* 1998; 18 (7): 2423-2436.

Almeida L. y Soares-da-Silva P. Safety, tolerability, and pharmacokinetic profile of BIA 2-093, a novel putative antiepileptic, in a rising multiple-dose study in young healthy humans. *J. Clin. Pharmacol.* 2004; 44 (7): 906-918.

Almeida L., Falcão A., Maia J., Mazur D., Gellert M. y Soares-da-Silva P. Single-dose and steady-state pharmacokinetics of eslicarbazepine acetate (BIA 2-093) in healthy elderly and young subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 2005; 45: 1062-1066.

Ambrósio A., Silva A.P., Araújo I., Malva J.O., Soares-da-Silva P., Carvalho A.P. y Carvalho C.M. Neurotoxic/neuroprotective profile of carbamazepine, oxcarbazepine and two new putative antiepileptic drugs, BIA 2-093 and BIA 2-024. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 406: 191-201.

Ambrósio A.F., Silva A.P., Malva J.O., Soares-da-Silva P., Carvalho A.P. y Carvalho C.M. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61: 1271-1275.

Ambrósio A.F., Soares-daSilva P., Carvalho C.M. y Carvalho A.P. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093 and BIA 2-024. *Neurochem. Res.* 2002; 27 (1/2): 121-130.

Aoki C., Venkatesan C., Go C.G., Mong J.A. y Dawson T.M. Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *J. Neurosci.* 1994; 14: 5202-5222.

Araújo I.M., Ambrósio A.F., Leal E.C., Verdasca M. J., Malva J.O., Soares-da-Silva P., Carvalho A.P. y Carvalho C.M. Neurotoxicity induced by antiepileptic drugs in cultures hippocampal neurons: a comparative study between carbamazepine, oxcarbazepine, and two new putative antiepileptic drugs, BIA 2-024 and BIA 2-093. *Epilepsia* 2004; 45 (12): 1498-1505.

B

Bach-y-Rita P. Nonsynaptic diffusion neurotransmission (NDN) in the brain. *Neurochem. Int.* 1993; 23: 297-318.

Bach-y-Rita P. Thoughts on the role of volume transmission in normal and abnormal mass sustained functions. En *Transmission in the Brain*. (Fuxe K. y Agnati L.F., Eds) Raven Press: New York, 1991, volumen 1; 489-496.

Bading H., Ginty D.D. y Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 1993; 260: 181-186.

Badiou S., Lehmann S., Cristol J-P. y Ballet H. Determination of plasma amino acids by fluorescent derivatization and reversed-phase liquid chromatography separation. *Clin. Lab.* 2004; 50: 153-158.

Baird D.H., Trenkner E. y Mason C.A. Arrest of afferent axon extension by target neurons *in vitro* is regulated by the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 1996; 16: 2642-2648.

Benes J., Parada A., Figueiredo A.A., Alves P.C., Freitas A.P., Learmonth D.A., Cunha R.A., Garrett J. y Soares-da-Silva P. Anticonvulsant and sodium channel-blocking properties of novel 10,11-dihidro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepine-5-carboxamide derivatives. *J. Med. Chem.* 1999; 42 (14): 2582-2587.

Bianchi L., Ballini C., Colivicchi M.A., Della Corte L., Giovannini M.G. y Pepeu G. Investigation on Acetylcholine, Aspartate, Glutamate and GABA Extracellular Levels from ventral Hippocampus during Repeated Exploratory Activity in the Rat . *Neurochem. Res.* 2003; 28: 565-573.

Bianchi L., Della Corte L. y Tipton K.F. Simultaneous determination of basal and evoked output levels of aspartate, glutamate, taurine and γ-aminobutyric acid during microdialysis and from superfused brain slices. *J. Chromatogr. B* 1999; 723: 47-59.

Blumenfeld H. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 2005; 46 (9): 21-33.

Bonifácio M.J., Sheridan R.D., Parada A., Cunha R.A., Patmore L. y Soares-da-Silva P. Interaction of novel anticonvulsant, BIA 2-093, with voltage-gated sodium channels: comparison with carbamazepine. *Epilepsia* 2001; 42 (5): 600-608.

Bradford S.E. y Nadler, J.V. Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. *Neuroscience* 2004; 128: 751-765.

Burke J.P. y Hablitz J.J. Modulation of epileptiform activity by metabotropic glutamate receptors in immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 1995; 73: 205-21.

C

Carroll R.C., Lissin D.V., von Zastrow M., Nicoll R.A. y Malenka R.C. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat. Neurosci.* 1999; 2: 454-460.

Cebers G., Cebere A., Wägner A. y Liljequist S. Prolonged inhibition of glutamate re-uptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 1999; 72: 2181-2190.

Chapman A.G. Microdialysis. En *Epilepsy. A comprehensive textbook* (Engel J. y Pedley T.A., Eds) Lippincott-Raven Press: Philadelphia, 1997, pp. 1067-1072.

Chaurasia C.S. *In vivo* microdialysis sampling: theory and applications. *Biomed. Chromatogr.* 1999; 13: 317-332.

Choi D.W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 1988; 11: 465-467.

Clark B.A., Farrant M. y Cull-Candy S.G. A direct comparison of the single-channel properties of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *J. Neurosci.* 1997; 17: 107-116.

Cohen S.A. Amino acid analysis using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate. En *Methods in Molecular Biology* (Cooper C., Packer N., y Williams K., Eds). Amino Acids Analysis Protocols, Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2000, volume 159, pp. 39-47.

Cohen S.A. Quantitation of amino acids as 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatives. En *Quantitation of amino acids and amines by chromatography*. (Molnár-Perl I., Ed). Journal of chromatography library, Elsevier: Amsterdam, 2005, volume 70, pp. 242-267.

Cohen S.A. y De Antonis K.M. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate. *J. Chromatogr. A* 1994; 661: 25-34.

Cohen S.A. y Michaud D.P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1993; 211: 279- 287.

Collingridge G. y Watkins J. *The NMDA Receptor*. Oxford University Press: Oxford, UK, 1994.

Conti F. y Weinberg R.J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 451-458.

Cowan M., Südhorf T.C. y Stevens C.F. *Synapses*. The Johns Hopkins University Press: Baltimore, MA, 2001.

Craig A.M., Blackstone C.D., Huganir R.L. y Banker G. Selective clustering of glutamate and γ-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 12373-12377.

Cunha R.A., Coelho J.E., Costenla A.R., Lopes L.V., Parada A., de Mendonça A., Sebastião A.M. y Ribeiro J.A. Effects of carbamazepine and novel 10,11-dihidro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepine-5-carboxamide derivatives on synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Pharmacol. & Toxicol*. 2002; 90: 208-213.

Curras M.C. y Dingledine R. Selectivity of amino acid transmitters acting at *N*-methyl-*D*-aspartate and amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 520-526.

Curtis D.R. y Eccles R.M. The effect of diffusional barriers upon the pharmacology of cells within the central nervous system. *J. Physiol.* 1958; 141: 446-463.

D

Danysz W. y Parsons C.G. Glycine and *N*-Methyl-*D*-Aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 597-664.

De Lanerolle N.C., Eid T., von Campe G., Kovacs I., Spencer D.D. y Brines M. Glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 distribution shows reorganization in the human epileptogenic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10: 1687-1703.

De Robertis E. Some new electron microscopical contribution to the biology of neuroglia. En *Progress in Brain Research* (De Robertis E. y Carrera R., Eds) Biology of Neuroglia, Elsevier: New York, 1965, volume 15, pp. 1-11.

Delgado-Escueta A.V., Wilson W., Olsen R.W. y Porter R.J. *Jasper's basic mechanisms of epilepsies. Advances in Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins: New York, 1999, Volumen 79.

Deutch A.Y. y Roth R.H. Neurotransmitters. En *Fundamental Neuroscience* (Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L. y Squire L.R., Eds.) Academic Press: San Diego, 1999, pp. 193-234.

Diamond J.S., Bergles D.E. y Jahr C.E. Glutamate release monitored with astrocyte transporter currents during LTP. *Neuron* 1998; 21: 425-433.

Díaz J., Lliberia Ll., Comellas L. y Broto-Puig F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 719: 171-179.

Dingledine R. y McBain C.J. Excitatory amino acid transmitters. En *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T. y Price D.L.). Raven Press: New York, 1994, pp. 367-387.

Dudek F.E., Snow R.W. y Taylor C.P. Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. *Adv. Neurol.* 1986; 44: 593-617.

During M.J., Spencer D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993; 341:1607-161.

E

Engel J. y Pedley T.A. *Epilepsy. A comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Press: New York, 1998.

F

Fagni L., Baudry M. y Lynch G. Classification and properties of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampus I. Electrophysiological studies of an apparent desensititazion and interactions with drugs which block transmission. *J. Neurosci*. 1983; 3: 1538-1546.

Farb C.R., Aoki T. y LeDoux J.E. Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of amygdala: a light and electron microscope study. *J. Comp. Neurol*. 1995; 362: 86-108.

Fellin T., Pascual O., Gobbo S., Pozzan T., Haydon P.G. y Carmignoto G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 2004; 43: 729-743.

Fukushima T., Usui N., Santa T. e Imai K. Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2003; 30: 1655-1687.

Furukawa K., Fu W., Li Y., Witke W, Kwiatkowski D.J., Mattson M.P. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci*. 1997; 17: 8178-8818.

Fuxe K. y Agnati L.F. Two principal modes of electrochemical communications in the brain: volume versus wiring transmission. *Adv. Neurosci*. 1991; 1: 1-9.

G

Gamache P., Ryan E., Svendsen C., Murayama K. y Acworth I. N. Simultaneous measurement of monoamines, metabolites and amino acids in brain tissue and microdialysis perfusates. *J. Chromatogr.* 1993; 614(2): 213-20.

Ghosh A. y Greenberg M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 1995; 268: 239-247.

H

Hainzl D., Parada A. y Soares-da-Silva P. Metabolism of two new antiepileptic drugs and their principal metabolites *S*(+)- and *R*(-)-10,11-dihidro-10-hydroxy carbamazepine. *Epilepsy Res.* 2001; 44: 197-206.

Halpain S. Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci*. 2000; 23: 141-146.

Halpain S., Hipolito A. y Saffer L. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J. Neurosci*. 1998; 18: 9835-9844.

Hardingham G.E., Fukunaga Y. y Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neurosci*. 2002; 5: (5), 405-414.

Harris K.M. y Kater S.B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci*. 1994; 17: 341-371.

Harris K.M. y Rosenberg P.A. Localization of synapses in rat cortical cultures. *Neuroscience* 1993; 53 (2): 495-508.

Hayashi Y., Shi S.H., Esteban J.A., Piccini A., Poncer J.C. y Malinow R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 2000; 287: 2262-2267.

Hertz I. Astrocytes. *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A., Ed.) Plenum Press: New York, 1982, pp. 319-355.

Hertz I. Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acids transmitters. *Prog. Neurobiol*. 1979; 13: 277-323.

Hosford D.A., Crain B.J., Cao Z., Bonhaus D.W., Friedman A.H., Okazaki M.M., Nadler J.V. y McNamara J.O. Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus. *J. Neurosci*. 1991; 11: 428-434.

I

ICH Q2A. International Conference on Harmonization. Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register 1995, 60.

ICH Q2B. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology, US FDA Federal Register 1997, 62.

J

Jacobs M.P., Fischbach G.D., Davis M.R., Dichter M.A., Dingledine R., Lowenstein D. H., Morrell M.J., Noebels J.L., Rogawski M.A, Spencer S.S. y Theodore W.H. Future directions for epilepsy research. *Neurology* 2001; 57:1536-1542.

Johnson J.W. y Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse neurons. *Nature* 1987; 325: 529-531.

Josefsson B. HPLC of amino acids as chloroformate derivatives. En *Quantitation of amino acids and amines by chromatography* (Molnár-Perl I., Ed). Journal of chromatography library, Elsevier: Amsterdam 2005, volume 70, pp. 199-228.

K

Kaech S., Fischer M., Doll T. y Matus A. Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J. Neurosci*. 1997; 17: 9565-9572.

Karnes H.T., Shiu G. y Shah, V.P. Validation of bioanalytical methods. *Pharma. Res.* 1991; 8 (4): 421-426.

Kehr, J. Determination of γ-aminobutyric acid in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 1998; 708 (1/2): 49-54.

Kettenmann H. y Ransom B.R. *Neuroglia*. Oxford University Press: New York, 1995.

Kish S.J., Dixon L.M., Sherwin A.L. Aspartic acid aminotransferase activity is increased in actively spiking compared with non-spiking human epileptic cortex. *J. Neurol. Neurosurg*. *Psychiatry* 1988; 51:552-556.

Kleckner N.W. y Dingledine R. Requirement for glycine in activation of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. *Science* 1988; 241: 835-837.

Kornau H.C., y Seeburg P.H. y Kennedy M.B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Op. Neurobiol*. 1997; 7 (3): 368-373.

Kullman D.M., Erdemli G. y Asztély F. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: Evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* 1996; 17: 461-474.

L

Lee G., Huang Y., Washington J., Briggs N. y Zuo Z. Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol 3-kinase. *Epilepsy Res.* 2005; 66: 145-153.

Lehmann A. y Hansson E. Kainate-induced stimulation of amino acids release from primary astroglial cultures of the rat hippocampus. *Neurochem. Int.*, 1988; 13: 557-561.

Levy R.H., Mattson R.H. y Meldrum B.S. *Antiepileptic Drugs* (4th Edition). Raven Press: New York, 1995.

Li B., Chen N., Luo T., Otsu Y., Murphy T.H. y Raymond L.A. Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nature Neurosci.* 2002; 5 (9): 833-834.

Liao D., Hessler N.A, y Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 1995; 375: 400-404.

Liu H. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1994; 670: 59-66.

Liu H., Sañuda-Peña C, Harvey-White J.D., Kalra S. y Cohen S.A. Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *J. Chromatogr. A* 1998; 828: 383-395.

Liu S.J. y Cull-Candy S.G. Activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature* 2000; 405: 454-458.

Liu Z., Stafstrom C.E., Sarkisian M.R., Yang Y., Hori A., Tandon P. y Holmes G.L. Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: *in vivo* microdialysis. *Neuroreport* 1997; 8: 2019-2023.

Lu W.Y., Man H.Y., Ju W., Trimble W.S., MacDonald J.F. y Wang Y.T. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insection o new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2001; 29 (1): 243-254.

M

Martin D.L. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 1992; 5: 81-94.

Massieu L., Morales-Villagrán A. y Tapia R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: An *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem*. 1995; 64: 2262-2272.

Matsumoto H. y Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Inter-ictal manifestations. *Exp. Neurol.* 1964a; 9: 286-304.

Matsumoto H. y Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Ictal manifestations. *Exp. Neurol*. 1964b; 9: 305-326.

Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Scienc*e 2000; 290: 754-758.

Matus A., Ackermann M., Pehling G., Byers H.R. y Fujiwara K. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 7590-7594.

Matus A., Brinkhaus H. y Wagner U. Actin dynamics in dendritic spines: A form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus* 2000; 10: 555-560.

McNamara J.O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999; 399: A15-A22.

Meldrum B.S. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36 (s1): s30-s35.

Merlin L.R. y Wong R.K.S. Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in the Patterning of Epileptiform Activities *In Vitro*. *J. Neurophysiol*. 1997; 78: 539-544.

Millan M.H., Obrenovitch T.P., Sarna G.S., Lok S.Y., Symon L. y Meldrum B.S., Changes in rat brain extracellular glutamate concentration during seizures: an *in vivo* dialysis study with on line enzimatic detection. *Epilepsy Res*. 1991; 9: 86-91.

Molnár-Perl I. HPLC of amino acids as *o*-phthalaldehyde derivatives. En *Quantitation of amino acids and amines by chromatography* (Molnár-Perl I., Ed). Journal of chromatography library, Elsevier: Amsterdam 2005, volume 70, pp. 163-198.

Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously o separately. *J. Chromatogr. A* 2003; 987: 291-309.

Moore S. y Stein W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 1948; 30: 367-388.

Moore, S., Spackman, D.H. y Stein, W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal. Chem.* 1958; 30: 1185-1190.

Morales M., Colicos M.A. y Goda Y. Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 2000; 27: 539-550.

N

Nacher J., Rosell D.R., Alonso-Llosa G., y McEwen B.S. NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat *dentate gyrus*. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 13: 512 -520.

Neugebauer V., Keele N.B. y Shinnick-Gallagher P. Epileptogenesis *in vivo* enhances the sensitivity of inhibitory presynaptic metabotropic glutamate receptors in basolateral amygdala neurons *in vitro*. *J. Neurosci*. 1997; 17: 983-995.

Nicholls D. y Atwell D. The release and uptake of excitatory amino acid. *Trends Pharmaco. Sci*. 1990; 11: 462-468.

Nicholson, C.H. Extracellular space as the pathway for neuron-glial cell interactions. En: *Neuroglia* (Kettenmann H. y Ransom B.R., Eds). Oxford University Press: New York, 1995, pp. 387-397.

Nicoll R.A., Kauer J.A., Malenka R.C. The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1988; 1: 97-103.

O

Obrenovitch T.P., Urenjak J., y Zilkha E. Effects of increased extracellular glutamate levels on the local field potential in the brain of anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 1997a; 122: 372-378.

Obrenovitch T.P., Hardy A.M. y Urenjak J. High extracellular glycine does not potentiate *N*-methyl-*D*-aspartate-evoked depolarization *in vivo*. *Brain Res*. 1997b; 746: 190-194.

Obrenovitch T.P., Urenjak J., y Zilkha E. Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J. Neurochem*. 1996; 66: 2446-2454.

O'Brien R.J., Kamboj S., Ehlers M.D., Rosen K.R., Fischbach G.D. y Huganir R.L. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 1998; 21: 1067-1078.

Okada M., Kawata Y., Mizuno K., Wada K., Kondo T. y Kaneko S. Interaction between Ca2+, K71, carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br. J. Pharmacol*. 1998; 124: 1277-1285.

O'Kane R.L., Martínez-López I., DeJoseph M.R., Viña J.R. y Hawkins R.A. Na^+-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 31891-31895.

Olney J.W., Price M.T., Samson L., Labruyere J. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 1986; 65: 65-67.

Oreiro-García M.T., Vázquez-Illanes M.D., Sierra-Paredes G. y Sierra-Marcuño G. Analysis of neuroactive amino acids from microdialysate samples by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate method. *Biomed. Chomatogr.* 2005; 19: 720-724.

P

Parada A. y Soares-da-Silva P. The novel anticonvulsant BIA 2-093 inhibits transmitter release during opening of voltage-gated sodium channels: a comparison with carbamazepine and oxcarbazepine. *Neurochem. Int.* 2002; 40: 435-440.

Parent M., Bush D., Rauw G., Master S., Vaccarino F. y Baker G. Analysis of amino acids and catecholamines, 5-hydroxytryptamine and their metabolites in brain areas in the rat using *in vivo* microdialysis. *Methods* 2001; 23: 11-20.

Patneau D.K. y Mayer M.L. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at *N*-methyl-*D*-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci*. 1990; 10: 2385-2399.

Paxinos G. y Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: London, 1997.

Piepponen T.P. y Skujins A. Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and γ-aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with *o*-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *J. Chromatogr. B* 2001; 757: 27-283.

Ponting C. P., Phillips C., Davies K.E. y Blake D.J. PDZ domains: targeting signaling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays* 1997; 19: 469-479.

R

Rabouan S., Olivier J.C., Guillemin H. y Barthes D. Validation of HPLC analysis of aspartate and glutamate neurotransmitters following *o*-phthaldialdehyde-mercaptoethanol derivatization. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 2003; 26 (11): 1797-1808.

Rao A. y Craig A.M. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 1997; 19: 801-812.

Remy S. y Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistence in epilepsy. *Brain* 2006; 129: 18-35.

Reverter M., Lundh T. y Lindberg J.E. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1997; 696: 1-8.

Riccio A. y Ginty D.D. What a privilege to reside at the synapse: NMDA receptor signaling to CREB. *Nature Neurosci*. 2002; 5 (5): 389-390.

Rocha M. y Sur M. Rapid acquisition of dendritic spines by visual thalamic neurons after blockade of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 8026-8030.

Rogawski M.A. Excitatory amino acids and seizures. En *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate* (Stone T.W., Ed). CRC Press, New York, 1995, pp. 219-37.

Rönnback L. y Hansson E. Does astroglial network perform qualitative modifications of neuronal messages?. En: *On astroglia and glutamate neurotransmission* (Hansson E., Olsson, T. y Rönnback L., Eds). Springer- R.G.: New York, 1997, pp. 155-187.

Rothstein J.D., Dykes-Hobert M., Pardo C.A., BristolL.A., Jin L., Kuncl R.W., Kanai Y., Hediger M.A., Wang Y.F., Schtelke J.P. y Welty D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role from astroglial transport in exocitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 1996; 16: 675-686.

S

Sarkisian M.R. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy & Behav.* 2001; 2: 201-216.

Sattler R., Charlton M.P., Hafner M. y Tymianski M. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.* 1998; 71: 2349-2364.

Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., Hafner M., MacDonald J.F., Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 1999; 284: 1845-1848.

Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., MacDonald J.F. y Tymianski M. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J. Neurosci*. 2000; 20: 22-33.

Schindler, W. New *N*-heterocyclic compounds. U.S. Patent 2, 948, 718, 1960.

Schousboe A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol*. 1981; 22: 1-45.

Schousboe A., Svenneby G. y Hertz L. Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J. Neurochem*. 1977; 29: 999-1005.

Schwarz E.L., Roberts W.L., y Pasquali M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clin. Chim. Acta* 2005; 354: 83-90.

Seifert G., y Steinhäuser C. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *Eur. J. Neurosci*. 1995; 7: 1872-1881.

Semba J., Kito S. y Toru M. Characterization of extracellular amino acids in striatum of freely moving rats by *in vivo* microdialysis. *J. Neural Transm*. 1995; 100: 39-52.

Shabir G.A. Validation of High-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* 2003; 987: 57-66.

Sherwin A.L. Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review. *Neurochem. Res*. 1999; 24: 1387-95.

Shi S.H., Hayashi Y., Petralia R.S., Zaman S.H., Wenthold R.J., Svoboda K. y Malinow R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 1999; 284: 1811-1816.

Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T. y Price D.L. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects.* Academic Press: New York, 2006.

Sierra-Paredes G. y Sierra-Marcuño G. Microperfusion of picrotoxin in the hippocampus of chronic freely moving rats through microdialysis probes: A new method of induce partial and secondary generalizad seizures. *J. Neurosci. Meth.* 1996a; 67: 113-120.

Sierra-Paredes G. y Sierra-Marcuño G. Effects of NMDA antagonists on seizure thresholds induced by intrahippocampal microdialysis of picrotoxin in freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 1996b; 218: 62-66.

Sierra-Paredes G., Cornes J.M. y Sierra-Marcuño G. Calpain inhibitor I retards seizure arrest in the hippocampus of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 1999; 263: 165-168.

Sierra-Paredes G., Galán-Valiente J., Vázquez-Illanes M. D., Aguilar-Veiga E. y Sierra-Marcuño, G. Effect of ionotropic glutamate receptors antagonists on the modifications in extracellular glutamate and aspartate levels during picrotoxin seizures: a microdialysis study in freely moving rats. *Neurochem. Int*. 2000a; 37 (4): 377-386.

Sierra-Paredes G., Galán-Valiente J., Vazquez-Illanes M.D., Aguilar-Veiga E., Soto-Otero R., Méndez-Alvarez E. y Sierra-Marcuño G. Extracellular amino acids in the rat hippocampus during picrotoxin threshold seizures in chronic microdialysis experiments. *Neurosci. Lett.* 1998; 248: 53-56.

Sierra-Paredes G., Núñez-Rodríguez A., Oreiro-García M.T y Sierra-Marcuño G. Induced actin disruption: A new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* 2001a; 42 (s7): 133.

Sierra-Paredes G., Oreiro-García M.T., Cornes J.M. y Sierra-Marcuño G. Long-term decrease in picrotoxin seizure threshold induced by *in vivo* actin despolymerization in the rat hippocampus. *Epilepsia* 2000b; 41 (s7): 23.

Sierra-Paredes G., Oreiro-García M.T., Núñez-Rodríguez A., Vázquez-López A., y Sierra-Marcuño G. Seizures induced by *in vivo* latrunculin A and jasplakinolide microperfusion in the rat hippocampus. *J. Mol. Neurosci*. 2006: 28 (2): 151-160.

Sierra-Paredes G., Oreiro-García M.T., Vázquez-López A., Núñez-Rodríguez A. y Sierra-Marcuño G. Effect of novel anticonvulsant BIA 2-093 on seizures induced by picrotoxin microdialysis in the rat hippocampus. *Epilepsia* 2004; 45 (3): 116-117.

Sierra-Paredes G., Senra-Vidal A. y Sierra-Marcuño G. Effect of extracellular high concentrations of glutamate and glycine on picrotoxin seizure thresholds: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res*. 2001b; 888 (1): 19-25.

Sierra-Paredes G., Soto-Otero R., Méndez-Álvarez E., Galán-Valiente J., Aguilar-Veiga E. y Sierra-Marcuño G. Experimental spike and wave discharges induced by pentylenetetrazol and tolerant to repeated injections: an electrophysilogical and biochemical study. *Epilepsy Res.* 1989; 4: 139-146.

Sierra-Paredes G., Vázquez-López A., Oreiro-García M.T., Núñez-Rodríguez A. y Sierra-Marcuño G. Neurochemisty of epileptic seizures: the role of f-actin and glutamate ionotropic receptors location. En *Focus on neurochemistry research* (Coleman R.M., Ed). Nova Editorial: New York, USA, 2005, pp. 157-195.

Sinor J.D., Du S., Venneti S., Blitzblau R.C., Leszkiewicz D.N., Rosenberg P.A. y Aizenman E. NMDA and glutamate evoke excitotoxicity at distinct cellular locations in rat control neurons *in vitro*. *J. Neurosci*. 2000; 20: 8831-8837.

Smart F.M. y Halpain S. Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus* 2000; 10: 542-554.

Soto-Otero R., Méndez-Alvarez E., Galán-Valiente J., Aguilar-Veiga E. y Sierra-Marcuño G. Quantitative analysis of neuroactive amino acids in brain tissue by liquid chromatography using fluorescent pre-column labelling with *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-*L*-cysteine. *Biomed. Chromatogr.* 1994; 8: 114-118.

Spackman D.H., Stein W.H. y Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 1958; 30:1107-1115.

Spector I., Shochet N.R., Blasberger D. y Kashman Y. Latrunculins– novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 1989; 13: 127-144.

Spector I., Shochet N.R., Kashman Y. y Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 1983; 219: 493-495.

Steinhäuser C. y Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trend. Neurosci*., 1996, 19: 339-345.

Strydom D.J. y Cohen S.A. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* 1994; 222: 19-28.

T

Tian G.F., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J. , Oberheim N. , Lou N. , Wang X., Zielke H.R., Kang J., Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nature Medicine*, 2005, 11: 973-981.

Tovar K.R. y Westbrook G.L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 2002; 34 (2): 255-264.

Tovar K.R. y Westbrook G.L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*. *J. Neurosci*. 1999; 19: 4180-4188.

Trussell L.O. y Otis T.S. Physiology of AMPA receptors: Biophysical characteristics that subserve integrative roles of synapses. En *Excitatory Amino Acids and the Cerebral Cortex* (Conti F. y Hicks T.P., Eds). MIT Press: Cambridge, MA, USA, 1996, pp. 63-72.

Twyman R.E., Gahring L.C., Spiess J., Rogers S.W. Glutamate receptor antibodies activate a subset of receptors and reveal an agonist binding site. *Neuron* 1995: 14: 755-62.

U

Ueda Y. y Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and γ-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res.*, 1995, 20 (3): 213-219.

Ungerstedt U. Introduction to intracerebral microdialysis. En *Microdialysis in the neurosciences* (Robinson T.E. y Justice J.B., Eds). Techniques in the behavioural and neural sciences, Elsevier: Amsterdam, 1991, volume 7, pp. 3-22.

US FDA. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation, 1987.

US FDA. Reviewer Guidance of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, 1994.

USP. Validation of Compendial Methods, Section (1225), United States Pharmacopeal Convention, Rockville, MD, 1999.

V

Van Hemelrijck A., Sarre S., Smolders I. y Michotte Y. Determination of amino acids associated with cerebral ischaemia in rat brain microdialysates using narrowbore liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Neurosci. Meth.* 2005; 144: 63-71.

Van Wandelen C. y Cohen S.A. Using quaternary high-performance liquid chromatography eluent systems for separating 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized amino acid mixtures. *J. Chromatogr. A* 1997; 763: 11-22.

Vázquez-López A. Estudio del papel de la calcineurina y la PKA en las crisis epilépticas inducidas por la perfusión de picrotoxina y latrunculina A en el hipocampo de la rata. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 2005.

Vázquez-López A., Sierra-Paredes G. y Sierra-Marcuño, G. Seizures induced by microperfusion of glutamate and glycine in the hippocampus of rats pretreated with latrunculin A. *Neurosci. Lett*. 2005; 388. 81-85.

Vizi E.S. y Kiss J.P. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: Synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 1998; 8: 566-607.

Vizi E.S., Mike A. y Tarnawa I. 2,3-Benzodiazepines (GYKI 52466 and analogs): Negative allosteric modulators of AMPA receptors. *CNS Drug Rev.* 1996, 2: 91-126.

W

Walker M.C., Galley P.T., Errington M.L., Shorvon S. D., y Jefferys J.G.R. Ascorbate and glutamate release in the rat hippocampus after perforant path stimulation: a "dialysis electrode" study. *J. Neurochem*. 1995; 65: 725-731.

Wasterlain C.G. y Shirasaka Y. Seizures, brain damage and brain development. *Brain Dev.* 1994; 16: 279-295.

Waters AccQ-Tag Chemistry Package. Millipore Corporation, Milford, MA, USA, 1993.

Wheal H.V., Simpson L., Phelps S. y Stockley E. Excitatory amino acid receptor subtypes and their roles in epileptiform synaptic potentiation in the hippocampus. En: *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission* (Wheal H.V. y Thomson A., Eds). Academic Press New York, 1991, pp. 239-264.

Wilkin G.P., Marriot D.R. y Cholewinsky A.J. Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci.,* 1990; 13: 43-46.

Y

Yang C-S., Tsai P-J., Chen W-Y., Tsai W-J. y Kuo J-S. On-line derivatization for continuous and automatic monitoring of brain extracellular glutamate levels in anesthetized rats: a microdialysis study. *J. Chromatogr. B* 1999; 734: 1-6.

Yarmola E.G., Somasundaram T., Boring T.A., Spector I. y Bubb M.R. Actin-latrunculin A structure and function: differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem*. 2000; 275 (36): 28120-28127.

Yuste R. y Denk W. Dendritic spines as basic fundamental units of neuronal integration. *Nature* 1995; 375: 682-684.

Z

Zhang S., Ehlers M.D., Bernhardt J.P., Su C.T. y Hungair R.L. Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of *N*-metyl-*D*-aspartate receptors. *Neuron* 1998; 21 (2): 443-453.

Zhou Q., Xiao M. y Nicoll R.A. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 1261-6.