

Las crisis hipertérmicas modifican el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en regiones del cerebro anterior de ratas inmaduras

Misael González Ramírez¹, Leticia Neri Bazán², Hermelinda Salgado Ceballos¹, Sandra A. Orozco Suárez¹

RESUMEN

Existe evidencia de los cambios en los aminoácidos inhibitorios y excitatorios que pueden estar involucrados en la susceptibilidad e inducción de las crisis. *Objetivo:* examinar a corto plazo las modificaciones en el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en el cerebro anterior de ratas de 10 días de edad, 30 min, 24 h y 20 días después de las crisis hipertérmicas (CH). *Materiales y métodos:* las CH fueron inducidas en ratas de 10 días de edad, al aplicar una corriente moderada de aire caliente, aproximadamente a 50 cm de ellas; los cerebros fueron usados para cuantificar el contenido tisular de aminoácidos inhibitorios y excitatorios mediante HPLC. *Resultados:* en relación al contenido tisular de aminoácidos, el grupo CH 30min después de las crisis hipertérmicas mostró un aumento significativo de todos ellos en las diferentes estructuras evaluadas. Mientras que el grupo CH 24hs expuso un aumento significativo de glutamato y glutamina en hipocampo, así como de aspartato y glutamato en la amígdala, además el tallo cerebral presentó un aumento significativo en muchos de los aminoácidos analizados. En las otras estructuras evaluadas hubo un decremento significativo de los mismos. El grupo CH 20d mostró un aumento en todos los aminoácidos en estriado y cerebelo. *Conclusión:* los resultados del presente estudio no apoyan la hipótesis que las CH en estados tempranos inducen cambios a largo plazo semejantes a los observados en modelos de epilepsia del lóbulo temporal en animales adultos.

Palabras clave: crisis hipertérmicas, cerebro de rata inmadura, aminoácidos inhibitorios, aminoácidos excitatorios.

.....

The hyperthermic seizures modify the tissular content of inhibitory and excitatory amino acid in regions of the fore brain of immature rats

ABSTRACT

There is evidence that demonstrates that the changes in the inhibitory and excitatory amino acids can be involved in the susceptibility and induction of the seizures. *Objective:* evaluate in a short term the modifications in the tissular content of inhibitory and excitatory amino acid in the rat's forebrain of 10 days of age, 30 min, 24 h and 20 days after hyperthermic seizures (HS). *Material and methods:* the HS was induced in rats of 10 days of age, when applying a moderate hot air current, approximately 50 cm from them; their brains were used to quantify the tissular content of inhibitory and excitatory amino acid by HPLC. *Results:* Regarding tissular content of amino acid, the CH30min group after HS showed a significant increase of all of them in the different evaluated structures. The CH24h group presented a significant increase of glutamate, and glutamine in the hippocampus, as well as aspartate and glutamate in amygdale. In addition, the brain stem showed a significant increase in many of the analyzed amino acid, while in the other evaluated structures was observed a significant decrease of the same amino acids. The CH20d group presented an increase in all amino acid in the striatum and cerebellum. *Conclusion:* The

.....

results of the present study do not support the hypothesis that HS in early stage induces long term changes similar to those observed in epilepsy model of temporal lobe in adult animals.

Key words: hyperthermic seizures, immature rat brain, amino acid inhibitory, amino acid excitatory.

Las crisis febriles se definen como convulsiones en la niñez, que por lo general ocurren entre los 3 meses a los 5 años de edad, asociadas con hipertermia, pero sin evidencia de infección intracraneal y sin antecedentes de haber presentado convulsiones previas¹. Estas se clasifican dentro de síndromes especiales². Algunos estudios sugieren que los niños que padecen crisis febriles presentan un riesgo mayor a desarrollar esclerosis mesial temporal o epilepsia del lóbulo temporal (ELT)^{3,4}. En imágenes de resonancia magnética se ha demostrado que el hipocampo se encuentra marcadamente hiperintenso en niños con estado epiléptico febril, lo que estuvo altamente asociado con el desarrollo de esclerosis mesial temporal⁵, también, se sugiere que las crisis febriles pueden ser un factor determinante para inicio de esclerosis hipocampal⁶. Sin embargo, otros reportes indican que las crisis febriles no progresan a esclerosis mesial, ni a ELT^{7,8}.

Las crisis hipertérmicas (CH) inducidas con el modelo descrito por Baram⁹, pueden inducir efectos inhibitorios y excitatorios. Los efectos inhibitorios que se reportan son; aumento de larga duración de la transmisión presináptica inhibitoria en el hipocampo, la cual es dependiente de la activación de la proteína cinasa A (PKA) en el estado adulto¹⁰, así como aumento en el umbral a la producción de CH subsecuentes, un efecto que al parecer está mediado por el neuropéptido Y¹¹, además, de un incremento en la unión de los receptores a GABA y benzodicepinas, lo que quizás ocasiona aumento de la actividad inhibitoria¹².

Los efectos excitatorios demostrados con este modelo son: animales de 10 días de edad que experimentan CH, no muestran crisis espontáneas en el estado adulto, pero presentan un umbral bajo a la producción de crisis convulsivas subsecuentes¹³. Además, las CH prolongadas producen elevación de canales acoplados a nucleótidos cíclicos (HCN), estos canales contribuyen a mantener el potencial de membrana en reposo en el hipocampo y son modulados por AMPc, y activados por hiperpolarización, el incremento de estos, puede ocasionar una elevada susceptibilidad a las crisis^{14,15}. El incremento de excitabilidad neuronal y desarrollo de epileptogénesis subsecuentes a CH dependen de la recurrencia de crisis, más que a su duración¹¹.

Se muestra que una insuficiente inhibición sináptica inhibitoria puede generar y/o contribuir a la propagación de crisis^{16,17}, el GABA neurotransmisor inhibitorio por excelencia; es sintetizado del glutamato por la enzima glutamato

descarboxilasa (GAD₆₅ y GAD₆₇) de acuerdo a su peso molecular¹⁸. Las dos formas sintetizan GABA, la GAD₆₅ sintetiza GABA vesicular para ser liberado y la GAD₆₇ sintetiza GABA citoplasmático¹⁹. Otro aminoácido inhibitorio es la taurina que participa en el control de la excitabilidad neuronal^{20,21}, se sintetiza de la cisteína y metionina por tres vías, además, requiere del cofactor fosfato de piridoxal²². La glicina aminoácido inhibitorio; se sintetiza de serina²³, es una molécula pequeña que participa en el mecanismo de inhibición a través de su receptor quien está unido a un canal de cloro^{23,24}, su función de actuar como neuroprotector²⁵, además, en el sistema glutamatérgico funciona como cofactor del glutamato en el receptor AMPA. Por último la glutamina un neurotransmisor inhibitorio, del que su síntesis se realiza en el astrocito, que mediante la enzima glutamina sintetasa que se expresa en la glía convierte al glutamato en glutamina²⁶.

Los principales aminoácidos excitatorios son: glutamato que media la respuesta sináptica excitadora en el sistema nervioso central²⁷, en su síntesis hay dos vías: la captura de este por un acarreador en la terminal presináptica de las neuronas GABAérgicas²⁸. El glutamato proveniente del ciclo glutamato-glutamina se convierte a glutamina por la glutamina sintetasa²⁹, y está a su vez en la neurona que se convierte a glutamato por glutaminasa³⁰. El glutamato es descarboxilado y se produce GABA³¹. El aspartato neurotransmisor excitatorio, se sintetiza de la transaminación del glutamato en presencia de oxaloacetato por la enzima aspartato transaminasa o aspartato aminotransferasa resultando aspartato más α -cetoglutarato^{31,32}.

El presente estudio se diseñó con el propósito de investigar si las CH generadas por única vez en un periodo corto (20 min) en ratas inmaduras ocasionan cambios en el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en corteza, amígdala, hipocampo, estriado, cerebelo y tallo cerebral, en diferentes tiempos.

Recibido: 28 agosto 2009. Aceptado: 17 septiembre 2009.

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

²Depto. de Farmacobiología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Correspondencia: Misael González Ramírez. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades. CMN S XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores 06720. México, D.F. E-mail: mgonzalezr@cis.gob.mx

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 5 ratas hembras de la cepa *Sprague Dawley* gestantes, las cuales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, con periodos de luz-oscuridad de 12 hs y con acceso libre al agua y alimento. El día del nacimiento fue considerado el día 0, las crías se mezclaron en el momento del nacimiento, se repartieron 10 animales por madre; 5 machos y 5 hembras. En el presente estudio se utilizaron tanto machos y hembras de 10 días de edad, debido a que no se observaron diferencias en los efectos inducidos por hipertermia¹².

Modelo de crisis inducidas por hipertermia (CH)

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

Grupos experimentales

Después de su manipulación, los animales se utilizaron para determinar el contenido tisular de los aminoácidos excitatorios e inhibitorios; se formaron tres grupos experimentales el primer grupo fue el CH 30 min con una $n=7$, se utilizó para analizar el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios 30 min después de presentar CH. El grupo CH 24hs con una $n=7$, se manipuló para cuantificar los aminoácidos excitatorios e inhibitorios 24 hs después de las CH. Y el grupo CH 20d con una $n=7$, se utilizó para el análisis de aminoácidos excitatorios e inhibitorios, sólo que 20 días después de presentar CH.

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

Determinación de aminoácidos por HPLC y proteínas

Para la determinación del contenido tisular de aminoácidos los animales fueron sacrificados por decapitación: corteza, amígdala cerebral, hipocampo, estriado, cerebelo y el tallo cerebral fueron disecados. Estas estructuras cerebrales fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -70°C hasta su

análisis, esto con el propósito de reducir efectos *post mortem*. Para su evaluación, las regiones cerebrales, fueron pesadas y homogeneizadas en ácido perclórico (0.1 M) con metabisulfito de sodio 4 mM. En una proporción de 30 μl por cada 10 mg de tejido, en un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón a una velocidad de 1000 rpm, durante 60 segundos. Todos estos procedimientos fueron hechos a 4°C , las muestras fueron protegidas de la luz, el homogeneizado fue centrifugado a 12.000 rpm durante 15 min, el sobrenadante fue usado para determinación del contenido tisular de aminoácidos, posteriormente la pastilla se resuspendió con 200 μl de agua y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry (1951)³³.

El procedimiento de derivatización fue hecho como previamente lo describió Kendrick³⁴. El agente de derivatización (6 μl) preparado como sigue: 15 mg de ophtaldialdehído disuelto en 300 μl metanol y se le adicionó 2.8 ml de amortiguador de tetraborato de potasio 0.4 M más 25 μl de 2- β -mercaptoetanol. El sistema de HPLC consistió del programa Millenium 32 (Waters) con un detector de fluorescencia modelo 474 (Waters) el cual opero a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. La separación se llevó a cabo al usar una columna *Nova Pack C18*, 3.9X150 mm y 4 μm ; la elución consistió en un gradiente. La fase móvil A consistió del amortiguador de acetato de sodio 40 mM en metanol 10%, pH 5.7. La fase móvil B consistió de acetato de sodio 8 mM en metanol 80%, pH 6.7 ajustado con ácido acético, se filtraron y desgasificaron. El gradiente fue como sigue 0 min 77% A, 23% B: 1 min 55% A, 45% B: 7 min 30% A, 70% B: 11 min 3% A, 97% B: 18 a 20 min 77% A, 23% B. El flujo fue de 1 ml/min. Se realizó una curva de calibración para interpolar los valores de las muestras, la cuantificación se llevó a cabo con el programa *Millenium 32* de Waters. La curva de calibración fue ajustada de los cromatogramas con soluciones estándar 0.1, 0.3 y 0.5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de GABA, Gln, Glu, Asp, Gly y Tau. La concentración de los estándares fue ajustada por mínimos cuadrados y un análisis de regresión lineal, usando el sistema (Waters).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry, brevemente la pastilla se resuspendió con 200 μl de agua bidestilada, diluido 40 veces, de esta dilución se tomaron 100 μl . La reacción inició cuando se le adicionó 500 μl del reactivo A, que contiene: 500 μl de CuSO_4 al 1 % y 500 μl de tartrato de sodio y potasio al 2 % en 50 ml de Na_2CO_3 2 % diluido en NaOH (1N). La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente, después de 10 min se le adicionaron 50 μl del reactivo B (reactivo de Folin diluido 1:2 con agua bidestilada). Las muestras se incubaron 30 min en oscuridad, después la reacción colorimétrica se midió en un espectrofotómetro, *Perkin Elmer lambda 25 UV/VIS* a 700 nm. Este procedimiento asociado a los valores obtenidos

por HPLC, expresan las concentraciones de aminoácidos en ng/mg de proteína.

Análisis estadístico

La concentración tisular de aminoácidos, se analizó con la prueba *t* de student de dos colas, para promedios independientes; el porcentaje de cambio se analizó con la prueba de X^2 y el análisis estadístico se llevó a cabo con el programa computacional SPSS 15.0. Aceptando en cada uno de los análisis un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Contenido tisular de aminoácidos 30 min después de CH

El análisis cromatográfico mostró que el grupo CH 30 min presentó en el hipocampo un aumento significativo en el contenido tisular de la glicina (14%) y taurina (114%), así como una disminución significativa en aspartato (51%) y glutamina (42%). La corteza mostró un incremento significativo en la concentración de GABA (64%), glutamina (1,371%), glutamato (739%) y de glicina (1,493%). La amígdala exhibió un aumento significativo de GABA (178%), glutamina (78%), glutamato (996%), glicina (3,661%) y taurina (1,036%). En el estriado se mostró un incremento significativo de aspartato (136%), GABA (50%), glutamato (30%) y glicina (52%), así como una disminución significativa en el glutamato (57%). El tallo cerebral presentó una elevación de aspartato (83%), GABA (34%), glutamina (29%), glicina (114%) y taurina (55%). En el cerebelo se observó un aumento significativo en el aspartato (355%), GABA (267%), glutamina (83%), glutamato (72%), glicina (443%) y taurina (83%), al compararlos con el grupo control (figura y tabla 1).

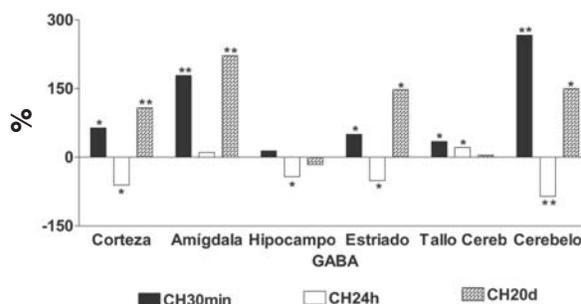


Figura 1. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de GABA en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH 30 min), 24 hs (CH 24 hs) y 20 días (CH 20 días) después de haber sido sometidas a CH. Los valores representan la media ± EE de 10 animales por grupo. X^2 , * p < 0.05 y ** p < 0.01.

Contenido tisular de aminoácidos 24 hs después de las CH

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

Tabla 1. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras sacrificadas 30 min después de inducirles CH (grupo CH30min), o de su manipulación (grupo CC30min).

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

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

Tabla 2. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras sacrificadas 24 hs después de inducirles CH (grupo CH24h), o de su manipulación (grupoCC24h).

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

Los valores son la media ± EE de 7 animales. Ala, Alanina; Asp, Aspartato; GABA, Ácido-aminobutírico; Gln, Glutamina; Glu, Glutamato; Gly, Glicina; Tau, Taurina. tStudent's, *p<0.05; **p<0.01

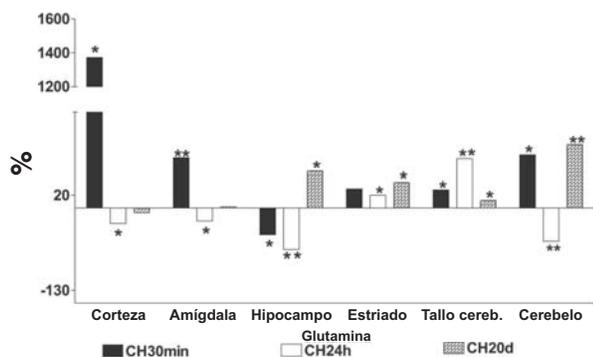


Figura 2. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de Glutamina en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH 30 min), 24 hs (CH 24 hs) y 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media ± EE de 10 animales por grupo. X², *p< 0.05 y **p<0.01

significativo de aspartato (30 %), así como un decremento significativo en el GABA (85 %), glutamina (53 %), glutamato (28 %), glicina (42 %) y taurina (21 %), al compararlos con el grupo control (figura y tabla 2).

Contenido tisular de aminoácidos 20 días después de las CH

El grupo CH 20 d, mostró en el hipocampo un aumento significativo del contenido tisular de aspartato (40 %), glutamina (58 %), glutamato (110 %) y de taurina (38 %), así como una disminución significativa de glicina (34 %). La corteza mostró un incremento significativo en el aspartato (133 %), GABA (108 %), glutamato (13 %) y de glicina (19%), también una disminución significativa en la concentración de taurina (8 %). La amígdala exhibió un aumento significativo de aspartato (47 %), GABA (222 %), glicina (70%) y disminución del glutamato (20 %). En el estriado se demostró

Tabla 3. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras, sacrificadas 20 días después de inducirles CH (grupo CH20d), o de su manipulación (CC 20 d).

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

Los valores son la media ± EE de 7 animales. Ala, Alanina; Asp, Aspartato; GABA, Ácido-aminobutírico; Gln, Glutamina; Glu, Glutamato; Gly, Glicina; Tau, Taurina. tStudent's, *p<0.05; **p<0.01

un incremento significativo de aspartato (70%), GABA (147%), glutamina (40%), glutamato (39%), glicina (147%) y taurina (58%). El tallo cerebral presentó una elevación del aspartato (109%) y glutamina (12%). En el cerebelo se observó un incremento significativo de aspartato (299%), GABA (150%), glutamina (99%), glutamato (23%), glicina (287%) y taurina (93%), al compararlos con los grupos control (figura y tabla 3).

glutamato en la amígdala, además el tallo cerebral presentó un aumento significativo en muchos de aminoácidos analizados, mientras que en las otras estructuras evaluadas se observó un decremento significativo de los mismos. El grupo CH 20 d mostró un aumento en todos los aminoácidos en estriado y cerebelo.

Después de las crisis hipertérmicas el grupo CH 30 min mostró aumento de casi todos los aminoácidos evaluados, tanto inhibitorios como excitatorios. En especial en áreas como: corteza, amígdala e hipocampo que están involucradas en la generación y propagación de las crisis^{9,35,36}, así como en la regulación de la excitabilidad cortical³⁷. El aumento del GABA, glicina y taurina, en estas áreas de animales inmaduros quizás aumenten la función del sistema GABA y reduce la susceptibilidad a las crisis, como se observa en ratas adultas^{38,39}. Sin embargo, el GABA también ha sido implicado en la excitación neuronal⁴⁰, y la aportación excitatoria del GABA podría conducir a la sincronización rítmica de la actividad como en las células piramidales de CA1 en el hipocampo maduro⁴¹. El cerebro inmaduro presenta una alta tendencia para la actividad *icta*^{42,43}, una situación que correlaciona con la excitación mediada por el GABA⁴⁴. El aumento de este en áreas específicas posterior a las crisis hipertérmicas podría estar asociado con el incremento de las acciones inducidas por el GABA en esta ventana del desarrollo. Son necesarios más estudios para comprobar si la elevación del contenido tisular del GABA en estas regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 30 min después de las crisis hiper-térmicas (grupo HP 30 min) está asociado con un aumento en la susceptibilidad, en excitabilidad neuronal y alteraciones conductuales observadas en animales en desarrollo sometidos a crisis hipertérmicas^{13,45,46}.

Los animales sacrificados a las 24 hs después de las crisis hipertérmicas mostraron un incremento del contenido tisular del glutamato y glutamina en el hipocampo, así como de aspartato y glutamato en la amígdala. Asimismo, en tallo cerebral presentaron un incremento de la mayoría de los aminoácidos analizados. Sin embargo, en el resto de las estructuras evaluadas se detectó un decremento del contenido tisular de la mayoría de los aminoácidos, este decremento puede ser consecuencia de un aumento del consumo de los aminoácidos durante la fase *icta*/o como consecuencia de un exceso de liberación de los mismos durante la crisis^{47,48}. Además se observó, un incremento de aminoácidos inhibitorios (glicina y taurina) en el estriado lo que quizá esté involucrado en el efecto de protección cerebral.

De la misma forma los animales expuestos a las crisis hipertérmicas mostraron un incremento de aminoácidos (GABA, glutamina, glicina y taurina) a nivel de tallo cerebral, 24 hs después de las crisis hipertérmicas, dicho aumento podría estar asociado a un efecto protector. Además, este

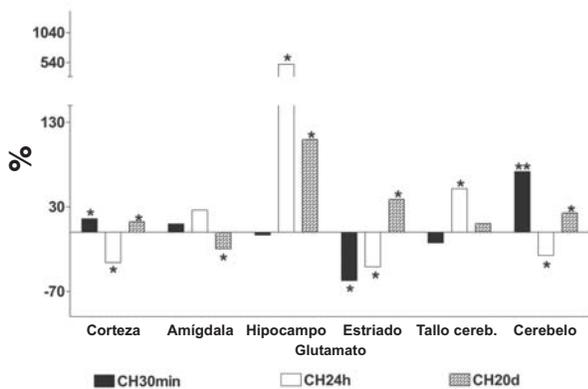


Figura 3. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de glutamato en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH 30 min), 24 hs (CH 24 hs) y 20 días (CH 20 días) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media ± EE de 10 animales por grupo. X², *p < 0.05 y **p < 0.01.

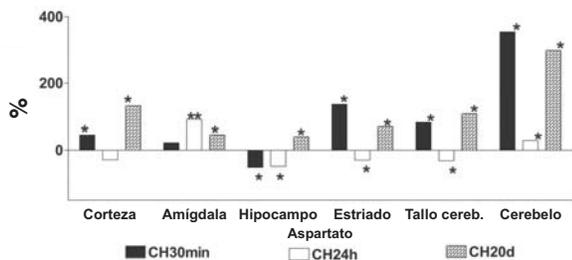


Figura 4. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de aspartato en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH 30 min), 24 hs (CH 24 hs) y 20 días (CH 20 d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media ± EE de 10 animales. X², *p < 0.05 y **p < 0.01.

DISCUSIÓN

En el presente estudio encontramos que el contenido tisular de aminoácidos en el grupo CH 30 min después de las CH mostró aumento significativo de todos ellos en las diferentes estructuras evaluadas. Mientras que el grupo CH 24 hs expuso un incremento significativo de glutamato y glutamina en hipocampo, así como de aspartato y

efecto protector pudiera ser consecuencia del decremento de la actividad neuronal durante el período refractario *postictal* de las crisis hipertérmicas⁴⁹, asociada a una disminución de los niveles tisulares de los aminoácidos en estructuras que están involucradas en la expresión de las mismas, como la corteza cerebral^{50,51}. Asimismo, el incremento de aminoácidos inhibitorios (glicina y taurina) persistió en el estriado, esto pudiera estar involucrado en mantener efectos protectores. Por otra parte, se sabe que el tallo cerebral juega un papel importante en la producción de la fase tónica inducida por el pentilinetetrazol al permitir la transmisión de señales del cerebro anterior a la médula espinal⁵². El incremento de aminoácidos, GABA, glutamato, glutamina, glicina y taurina, a nivel de tallo cerebral podría estar asociado a atenuar las crisis.

Los animales que se sacrificaron 20 días después de presentar crisis hipertérmicas, mostraron un aumento del contenido tisular de todos los aminoácidos en estriado y cerebelo. Estos datos resultan interesantes, ya que el estriado, al asociarse con la sustancia *nigra*, podría estar modulando la expresión de las crisis convulsivas en ratas inmaduras⁵³. En cuanto al cerebelo, se sabe que su estimulación eléctrica puede reducir dichas crisis^{54,55}, el incremento de los aminoácidos en estriado y cerebelo pudiera reflejar un aumento de la actividad neuronal de estas estructuras y ejercer un efecto protector. Llama la atención que en otras estructuras existe un incremento del contenido tisular de algunos aminoácidos, tanto inhibitorios como excitatorios, i.e., la corteza cerebral: GABA, glicina, aspartato y glutamato, hipocampo: aspartato, glutamina, glutamato y taurina, tallo cerebral: aspartato y glutamina y amígdala: aspartato, GABA y glicina. El incremento de aminoácidos inhibitorios pudiera relacionarse con una protección 20 días después de las crisis hipertérmicas. Por el contrario, el incremento de los aminoácidos excitatorios podría asociarse con el aumento de la excitabilidad cerebral a largo plazo varios días después de las crisis hipertérmicas reportada por algunos autores^{14,56}.

En el presente estudio se encontró un aumento del contenido tisular de aminoácidos como GABA y glutamato, 20 días después de las crisis hipertérmicas. Este incremento quizá se da por una alteración en el transporte o de las enzimas responsables de la síntesis de dichos aminoácidos. Se sabe que la actividad epiléptica, en pacientes como en modelos de epilepsia, induce cambios a largo plazo en diferentes transportadores. Como es; una disminución del transportador vesicular VGLUT-1 en la corteza epiléptica humana⁵⁷. La actividad epiléptica produce un decremento del RNAm y de proteínas del transportador de glutamato y aspartato (GLAST), del transportador del glutamato (GLT-1), y del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAC-1). El

transportador a GABA, GAT-3, presenta aumento, mientras que el transportador GAT-1 no presenta cambios a largo plazo⁴⁸.

Con respecto a la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en animales inmaduros, Arias, *et al*, (1992)⁵⁸ describieron que la actividad de la enzima GAD se encuentra disminuida en animales de 2 y 5 días de edad sometidos a crisis hipertérmicas. Sin embargo, no encontraron cambios en la actividad de dicha enzima en animales de 10 y 15 días de edad. La relevancia del estudio de Arias, *et al*, (1992)⁵⁸ consiste en que los cambios observados están dados por las crisis más que por la hipertermia. Al respecto se sabe que es necesario un incremento de la temperatura cerebral para que se induzcan las crisis⁵⁹. Por su parte, Orozco, *et al*, (2000)⁶⁰ reportaron que en ratas inmaduras no se detectan cambios en el transportador GAT-1 a nivel del hipocampo 24 hs después de la producción de crisis hipertérmicas. Por lo tanto, al momento se desconoce si con este modelo experimental se producen cambios en otro tipo de transportadores o áreas cerebrales, varios días después de las crisis hipertérmicas.

Los niveles elevados de glutamato 20 días después de las crisis hipertérmicas, pudieran modificar la excitabilidad neuronal e inducir alteraciones neurotóxicas. Previamente se demostró que las crisis hipertérmicas recurrentes se asocian a un aumento de excitabilidad neuronal, y a largo plazo con la producción de epileptogénesis, situación que al parecer depende de la recurrencia de las crisis¹³. De hecho, se reporta que un sólo evento de crisis hipertérmicas puede aumentar la excitabilidad neuronal^{10,11,45}.

En el presente estudio encontramos que las crisis hipertérmicas producen un incremento de glutamato a largo plazo, efecto que puede estar asociado a crisis espontáneas y muerte neuronal detectadas después de la producción de crisis hipertérmicas repetidas^{13,61}. En el caso de las crisis hipertérmicas, un aumento de glutamato asociado a neurodegeneración pudiera facilitar un proceso de epileptogénesis. Nuestros resultados no nos permiten correlacionar la producción de eventos neurotóxicos y alteraciones de excitabilidad neuronal, ya que sólo se evaluó el efecto de una sola crisis hipertérmica. En estudios futuros será interesante investigar los efectos de crisis hipertérmicas recurrentes asociadas a lesiones cerebrales en el sistema glutamatérgico, con el propósito de determinar su influencia en la producción de crisis espontáneas.

Estas evidencias experimentales nos sugieren que las crisis hipertérmicas en animales inmaduros conllevan a cambios en el contenido tisular de aminoácidos que no son semejantes a los producidos por la epilepsia del lóbulo temporal de sujetos adultos, tanto en humanos como en ratas.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por un donativo de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (donativo # FP-2002/103).

REFERENCIAS

- Consensus development conference on febrile seizures, National Institutes of Health, May 19-21, 1980. *Epilepsia* 1981;22(3):377-81.
- Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1989; 30(4):389-99.
- Barr WB, Ashtari M, Schaul N. Bilateral reductions in hippocampal volume in adults with epilepsy and a history of febrile seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63(4):461-7.
- VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 1998;43(4):413-26.
- Provenzale JM, Barboriak DP, VanLandingham K, MacFall J, Delong D, Lewis DV. Hippocampal MRI signal hyperintensity after febrile status epilepticus is predictive of subsequent mesial temporal sclerosis. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190(4):976-83.
- Merkenschlager A, Todt H, Pfluger T, Bernhard MK. Development of hippocampal sclerosis after a complex febrile seizure. *Eur J Pediatr* 2009; 168(4):487-90.
- Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med* 1976; 295(19):1029-33.
- Bower SP, Kilpatrick CJ, Vogrin SJ, Morris K, Cook MJ. Degree of hippocampal atrophy is not related to a history of febrile seizures in patients with proved hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69(6):733-8.
- Baram TZ, Gerth A, Schultz L. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 98(2):265-70.
- Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nat Med* 1999; 5(8):888-94.
- Dube C, Brunson KL, Eghbal-Ahmadi M, Gonzalez-Vega R, Baram TZ. Endogenous neuropeptide Y prevents recurrence of experimental febrile seizures by increasing seizure threshold. *J Mol Neurosci* 2005; 25(3):275-84.
- González-Ramírez M, Orozco S, Salgado H, Feria A, Rocha L. Hyperthermia-induced seizures modify the GABAA and benzodiazepine receptor binding in immature rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25(6):955-71.
- Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol* 2000;47(3):336-44.
- Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 2002; 22(11):4591-9.
- Lupica CR, Bell JA, Hoffman AF, Watson PL. Contribution of the hyperpolarization-activated current (I_h) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 2001; 86(1):261-8.
- Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Carboni G, Frau V, Giorgi O. Pentylentetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40(2):329-33.
- McNamara JO, Rigsbee LC, Butler LS, Shin C. Intravenous phenytoin is an effective anticonvulsant in the kindling model. *Ann Neurol* 1989; 26(5):675-8.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 1991; 7(1):91-100.
- Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19(12):500-5.
- Pasantes-Morales H. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis* 1996;11(3):187-204.
- Saransaari P, Oja SS. Taurine and neural cell damage. *Amino Acids* 2000; 19(3-4):509-26.
- Shin HK, Linkswiler HM. Tryptophan and methionine metabolism of adult females as affected by vitamin B-6 deficiency. *J Nutr* 1974; 104(10):1348-55.
- Gundersen RY, Vaagenes P, Breivik T, Fonnum F, Opstad PK. Glycine-an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49(8):1108-16.
- Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S109-S119.
- Gusev EI, Skvortsova VI, Dambinova SA, Raevskiy KS, Alekseev AA, Bashkatova VG, et al. Neuroprotective effects of glycine for therapy of acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10(1):49-60.
- Pow DV, Crook DK. Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience* 1996; 70(1):295-302.
- Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 1989; 41(2):143-210.
- Eskandari S, Kreman M, Kavanaugh MP, Wright EM, Zampighi GA. Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(15):8641-6.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 1994; 14(9):5559-69.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol* 2002;157(3):349-55.
- Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Broer A, McQuillan JA, et al. Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem* 2003; 85(2):503-14.
- Fleck MW, Henze DA, Barrionuevo G, Palmer AM. Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1993; 13(9):3944-55.
- Lowry OH, RNFARRJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C, Baldwin BA. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gamma-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. *Brain Res* 1988; 442(1):171-4.
- Bear J, Lothman EW. An *in vitro* study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices. *Epilepsy Res* 1993; 14(3):183-93.
- Veliskova J, Velisek L, Nunes ML, Moshe SL. Developmental regulation of regional functionality of substantial nigra GABAA receptors involved in seizures. *Eur J Pharmacol* 1996; 309(2):167-73.
- Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Endogenous control of epilepsy: the nigral inhibitory system. *Prog Neurobiol* 1994; 42(1):33-52.
- Rocha L, Ackermann RF, Chugani HT, Engel J, Jr. Chronic pretreatment with naloxone modifies benzodiazepine receptor binding in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Res* 1994; 17(2):135-43.
- Rocha L, Ackermann RF, Engel J, Jr. Chronic and single administration of pentylentetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Res* 1996;

- 24(2):65-72.
40. Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* 1995; 269 (5226):977-81.
 41. Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Nambu A, Takada M. Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 2003; 119(1):265-75.
 42. Liebrechts MT, McLachlan RS, Leung LS. Hyperthermia induces age-dependent changes in rat hippocampal excitability. *Ann Neurol* 2002; 52(3):318-26.
 43. Moshe SL. Seizures early in life. *Neurology* 2000; 55(5 Suppl 1): S15-S20.
 44. Dzhala VI, Staley KJ. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23(5):1840-6.
 45. Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 2001; 7(3):331-7.
 46. Kornelsen RA, Boon F, Leung LS, Cain DP. The effects of a single neonatally induced convulsion on spatial navigation, locomotor activity and convulsion susceptibility in the adult rat. *Brain Res* 1996; 706(1):155-9.
 47. Ding R, Asada H, Obata K. Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Res* 1998;800(1):105-13.
 48. Ueda Y, Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* 1995; 20(3):213-9.
 49. Caldecott-Hazard S, Engel J Jr. Limbic postictal events: anatomical substrates and opioid receptor involvement. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1987; 11(4):389-418.
 50. Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 1989; 61(4):747-58.
 51. Chervin RD, Pierce PA, Connors BW. Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. *J Neurophysiol* 1988; 60(5):1695-713.
 52. Yonekawa WD, Kupferberg HJ, Woodbury DM. Relationship between pentylenetetrazol-induced seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214(3):589-93.
 53. McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C. Role of the substantia nigra in the kindling model of limbic epilepsy. *Adv Exp Med Biol* 1986; 203:139-46.
 54. Cooper IS, Amin I, Riklan M, Waltz JM, Poon TP. Chronic cerebellar stimulation in epilepsy. Clinical and anatomical studies. *Arch Neurol* 1976; 33(8):559-70.
 55. Fisher RS, MMKGL. Brain stimulation. In: Engel J PA, editor. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia. Lippincott-Raven 1997.
 56. Bender RA, Dube C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ. Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 2003; 13(3):399-412.
 57. Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, et al. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain* 2005; 128(Pt 1):158-73.
 58. Arias C, Valero H, Tapia R. Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups. *J Neurochem* 1992; 58(1):369-73.
 59. Yang XF, Chang JH, Rothman SM. Intracerebral temperature alterations associated with focal seizures. *Epilepsy Res* 2002; 52(2):97-105.
 60. Orozco-Suárez S, Brunson KL, Feria-Velasco A, Ribak CE. Increased expression of gamma-aminobutyric acid transporter-1 in the forebrain of infant rats with corticotropin-releasing hormone-induced seizures but not in those with hyperthermia-induced seizures. *Epilepsy Res* 2000; 42(2-3):141-57.
 61. Orozco-Suárez S, F-VA. Febrile seizures induce neuronal death in the developing brain. *Epilepsia* 2001;42(57)222.