

***UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID***

***FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA***



**EFFECTO DE LA ALBÚMINA SOBRE ASTROCITOS  
EN CULTIVO PROCEDENTES DE CORTEZA  
TEMPORAL DE PACIENTES EPILÉPTICOS  
FÁRMACO-RESISTENTES**

***IVAN HERRERA PECO***

***Madrid, 2011***

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**EFFECTO DE LA ALBÚMINA SOBRE ASTROCITOS  
EN CULTIVO PROCEDENTES DE CORTEZA  
TEMPORAL DE PACIENTES EPILÉPTICOS  
FÁRMACO-RESISTENTES**

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Doctorando: Ivan Herrera Peco

Director: Prof. Dr. D. Rafael García de Sola

**Madrid, 2011**



## **RELACIÓN DE ABREVIATURAS**

- 2-APB: 2 aminoetoxidifenil borato
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMPA: a-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
- ATP: Adenosina trifosfato
- HSA: Albúmina sérica humana, del inglés Human Serum Albumin
- BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés Bovine Serum Albumin
- BHE: Barrera Hemato-Encefálica
- Ca<sup>2+</sup>: Ión calcio
- Canales Kir (en inglés *inward rectifier*): Canales de potasio rectificadores de la corriente de entrada.
- CICR: Salida de calcio inducida por calcio, del inglés Calcium Induce Calcium Release.
- Cx: Corteza
- ECoG: Electroencefalograma
- EFO: Electrodo de foramen oval
- ELT: Epilepsia del lóbulo temporal
- ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico
- GFAP: Proteína gliofibrilar ácida
- GFP: Proteína fluorescente verde, del inglés Green Fluorescent Protein.
- GLT: Transportadores de glutamato, en inglés Glutamate Transporters.
- HS: Suero humano, en inglés Human Serum.
- HUP: Hospital Universitario de la Princesa.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

- IL: Interleucinas
- IP<sub>3</sub>: Inositol tri-fosfato
- K<sup>+</sup>: Ión potasio
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad, del inglés Low Density Lipoproteins.
- LTP: Potenciación a largo plazo, del inglés Long Term Potentiation.
- Mg<sup>2+</sup>: Ión magnesio
- mM: Mili Molar
- MRP: Proteínas de resistencia a multifármacos, del inglés Multidrug Resistant Protein
- Na<sup>+</sup>: Ión sodio
- NCX: Intercambiador de sodio/calcio
- NeuN: Proteína nuclear de neuronas
- NMDA: N-Metil-D-Aspartato
- nm; Nanómetro
- no-spik: "no-spiking", se refiere a la zona de la corteza sin actividad irritativa pero que debe ser reseca durante la intervención quirúrgica.
- PLC: Fosfolipasa C, en inglés Phospho-Lipase C.
- PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática, del inglés Plasmatic Membrane Calcium ATPase.
- Rc IP<sub>3</sub>: Receptor de inositol tri-fosfato.
- Rc TGF-β: Receptor para el factor de crecimiento transformante β.
- RE: Retículo endoplásmico
- SBF: Suero bovino fetal
- SERCA: ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, del inglés Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

- SNC: Sistema nervioso central
- spk: "spiking", se refiere a la zona de la corteza con actividad irritativa que debe ser resecada durante la intervención quirúrgica.
- UCE: Unidad de Cirugía de la Epilepsia.
- VGCC: Canales de calcio voltaje dependientes, del inglés Voltage Gated Calcium Channels.
- VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés Very Low Density Lipoproteins.



# **ÍNDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>1. EPILEPSIA</b>	<b>10</b>
1.1 CONSIDERACIONES GENERALES	10
1.2 EPILEPSIA FÁRMACO-RESISTENTE	12
1.2.1 HIPÓTESIS DE FÁRMACO-RESISTENCIA	14
1.2.1.1. Modificación de los transportadores multifármaco ATP dependientes	14
1.2.1.2. Cambios moleculares en canales iónicos	16
1.2.1.3. Alteración en los transportadores de glutamato	19
1.2.1.4. Alteración en receptores	20
1.3 CIRUGÍA DE LA EPILEPSIA	22
1.4 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	23
<b>2. ASTROCITOS</b>	<b>27</b>
2.1 FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL SNC	27
2.1.1. Formación de la barrera hematoencefálica	27
2.1.2. Captación de nutrientes a través de los capilares sanguíneos	29
2.1.3. Participación en la formación de sinapsis	29
2.1.4. Regulación de la actividad antioxidante cerebral	30
2.1.5. Liberación de citocinas, factores de crecimiento	30
2.1.6. Síntesis de proteínas transportadoras	31
2.1.7. Captación de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica	32
2.1.8. Recaptación del K <sup>+</sup> desde el medio extracelular	33
2.1.9. Equilibrio de la concentración de sodio intracelular	33
2.2 IMPORTANCIA DEL Ca <sup>2+</sup> EN ASTROCITOS	34
2.2.1. El Ca <sup>2+</sup> como segundo mensajero	35
2.2.2. Mecanismos de entrada de Ca <sup>2+</sup> en astrocitos	36
2.2.2.1. Canales de Ca <sup>2+</sup> voltaje-dependientes	37
2.2.2.2. Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por ligando	38
2.2.2.3. Receptores acoplados a segundos mensajeros	39



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

2.2.2.4. Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ desde los depósitos intracelulares	40
2.2.3 Mecanismos de extrusión del $\text{Ca}^{2+}$	42
2.3. ASTROCITOS Y SU PAPEL EN EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN	42
2.4. ASTROCITOS Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES DEL SNC	45
3. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	47
4. ALBÚMINA	48
5. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA EPILEPTOGÉNESIS	51
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
1. PACIENTES	59
2. CULTIVOS CELULARES	63
3. MEDIDAS DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{Ca}^{2+}$	65
3.1. USO DE LA SONDA FLUORESCENTE Fura2-AM	66
3.2. UTILIZACIÓN DE CONSTRUCTOS DE PERICAM DIRIGIDOS A LA MITOCONDRIA Y NÚCLEO	69
4. EXPERIMENTOS DE SÍNTESIS DE ADN	71
5. INMUNOTINCIÓN	72
6. COMPROBACIÓN DE PERMEABILIDAD DE LAS UNIONES TIPO COMUNICANTES	75
7. ANÁLISIS EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	76
8. SOLUCIONES Y REACTIVOS	78
8.1. CULTIVOS CELULARES	78
8.2. EXPERIMENTOS DE FLUORESCENCIA	78
8.3. EXPERIMENTOS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	79
8.4. EXPERIMENTOS DE SÍNTESIS DE ADN	79
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>81</b>



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS</b>	<b>82</b>
1.1. VIABILIDAD CELULAR DE LOS ASTROCITOS EN CULTIVO	85
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA, EN ASTROCITOS EN CULTIVO, A LA ALBÚMINA</b>	<b>87</b>
2.1 RESPUESTA MEDIADA POR LA BSA FRENTE A LA MEDIADA POR HSA	87
2.2 ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS RESPONSABLES DE LAS OSCILACIONES DEL Ca <sup>2+</sup> INTRACELULAR	91
<b>3. SINCRONIZACIÓN DE LA RESPUESTA ASTROCITARIA EN RESPUESTA LA ALBÚMINA</b>	<b>100</b>
<b>4. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ADN</b>	<b>105</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>110</b>
1. CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO RESECADO Y REALIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	111
2. EFECTOS DE LA ALBÚMINA SOBRE ASTROCITOS	114
2.1 ACCIÓN DE LA ALBÚMINA SOBRE EL RE, NÚCLEO Y RED MITOCONDRIAL	116
2.2 ACCIÓN DE LA ALBÚMINA SOBRE LAS ONDAS DE Ca <sup>2+</sup>	118
2.3 SÍNTESIS DE ADN MEDIADA POR LA ALBÚMINA	121
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>130</b>



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

# I. INTRODUCCIÓN



# **1. EPILEPSIA**

## **1.1 CONSIDERACIONES GENERALES**

El término epilepsia se entiende como la manifestación de una alteración crónica (Porter y col., 1987) del cerebro con varias etiologías, caracterizadas por crisis recurrentes, debidas a excesivas descargas de las neuronas (Gastaut, 1973). Por otro lado se considera que una crisis epiléptica es el resultado clínico de la descarga brusca, anormal por su intensidad e hipersincrónica de un grupo de neuronas (Herrera-Peco y col., 2011), que produce síntomas sensoriales, sensitivos, motores con o sin pérdida de conciencia de breve duración (Dichter y col., 1994; Zarranz y col., 2000).

En términos generales, conviene tener en cuenta los siguientes principios (Adams y col., 1997):

- No toda descarga paroxística del cerebro, aunque sea detectable en el electroencefalograma (EEG), es una crisis epiléptica si no tiene traducción clínica.
- Las disfunciones paroxísticas cerebrales cuya base no sea una descarga neuronal hipersincrónica sino de otro tipo, no deben ser consideradas crisis epilépticas, aunque pueden dar lugar a manifestaciones clínicas parecidas.
- Las descargas hipersincrónicas de otros agregados neuronales fuera de la corteza cerebral que pueden dar lugar a manifestaciones clínicas paroxísticas como neuralgias, vértigo,



mioclonías, ataxia o espasmos musculares, tampoco son crisis epilépticas, aunque respondan a los mismos fármacos.

Una crisis epiléptica es un síntoma y por sí sola y ocurre de forma aislada, no define a un síndrome o enfermedad epiléptica. Aproximadamente entre el 2-3% de la población tiene, en algún momento de su vida, una crisis convulsiva y no se les considera pacientes epilépticos.

Es importante destacar el hecho de que a la epilepsia se la considera como uno de los trastornos neurológicos más comunes, que afecta entre el 0.5-2% de la población mundial aproximadamente (Hauser, 1998; Herrera-Peco y col., 2009). La epilepsia se caracteriza por la presencia de crisis espontáneas y recurrentes, que pueden cursar con signos y síntomas motores, sensoriales, cognitivos, psíquicos e incluso autónomos.

De acuerdo con la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, 1981), la epilepsia puede dividirse en:

1) **Parcial o focal**, cuando las crisis tienen su origen en una región acotada de la corteza cerebral. Se considera que las crisis en las epilepsias focales comienzan en un grupo neuronal más o menos definido y que se propagan a otras estructuras, afectando a todo un circuito neuronal (Löscher y col., 2004). En las neuronas que integran dichos circuitos se producen cambios en la fisiología de la membrana plasmática, como pueden ser modificaciones en los receptores de membrana expresados, en los canales iónicos o en los transportadores de membrana (Arion y col., 2006), alteraciones que en



conjunto condicionan los cambios en la excitabilidad y capacidad de sincronización neuronal (Pastor y col., 2006).

2) **Generalizada**, cuando las crisis tienen su origen en distintas áreas corticales o en toda la corteza y un lugar específico de inicio no puede ser identificado.

## **1.2 EPILEPSIA FÁRMACO-RESISTENTE**

Aproximadamente el 20 % de todos los pacientes epilépticos son fármaco-resistentes (Sander y col., 2002). La fármaco-resistencia supone un importante problema para el paciente, que incluye persistencia de las crisis y morbilidad derivada de la epilepsia y de la medicación, aislamiento social, desempleo y disminución de la calidad de vida (Herranz y col., 1997; Arroyo y col., 2002), así como un importante coste sanitario que se deriva del uso de nuevos y múltiples medicamentos y de una mayor necesidad de atención sanitaria (Argumosa y Herranz, 2000; Argumosa y Herranz, 2001).

Se considera que la epilepsia fármaco-resistente es aquella que no se logra controlar utilizando los fármacos antiepilépticos a dosis adecuadas. Así mismo se debe diferenciar entre dos tipos de fármaco-resistencia; aquella que aparece desde el primer momento o primaria, y aquella que aparece en pacientes que al principio son sensibles al tratamiento o secundaria. Desde el punto de vista clínico se ha propuesto que se considere a un paciente fármaco-resistente, cuando:



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

i) La epilepsia no logra controlarse usando uno o varios antiepilépticos de primera línea en monoterapia en un periodo comprendido entre uno y dos años (Engel, 2002; Kwan y Brodie, 2002).

ii) La epilepsia no logra controlarse usando fármacos antiepilépticos en politerapia entre uno y dos años (Brodie y Kwan, 2002).

No se comprenden del todo los mecanismos por los que puede aparecer esta resistencia farmacológica en los pacientes con epilepsia, aunque bien es cierto que los mecanismos serán de origen farmacocinético o farmacodinámico (Zambrano y col., 2007).

Los mecanismo fármacocinéticos son aquellos que no permiten que se alcancen las concentraciones de fármaco antiepiléptico en el sitio de acción. y están determinados por factores que influyen en la absorción, metabolismo y eliminación del fármaco antiepiléptico y sus metabolitos (Kwan y col., 2005).

Algunos ejemplos de esto serán:

- Que la dosis de fármaco antiepiléptico administrada sea insuficiente para las características del paciente.
- Que siendo una dosis adecuada produzca niveles séricos insuficientes, por ejemplo, en politerapia con inductores del metabolismo o cuando hay una sobreexpresión de la glucoproteína P. Los inductores del metabolismo pueden aumentar el aclaramiento del fármaco y, en algunos casos, la expresión de la



glucoproteína P.

- Que existiendo niveles séricos normales, estos sean insuficientes en el cerebro.
- Que ante niveles cerebrales normales estos sean insuficientes en el foco epiléptico (por ejemplo, por sobreexpresión de glucoproteína P u otras proteínas, provocada por la propia causa o como consecuencia de la epilepsia).

Por otro lado, los mecanismos farmacodinámicos de fármaco-resistencia vienen determinados por la alteración de los sitios de unión donde ejercerán su acción los fármacos antiepilépticos, a pesar de que las concentraciones de fármaco sean las adecuadas (Glauser , 2001).

### **1.2.1 HIPÓTESIS DE FÁRMACO-RESISTENCIA**

Existen varias hipótesis que explican los mecanismos de fármaco-resistencia en pacientes epilépticos, dichas hipótesis son:

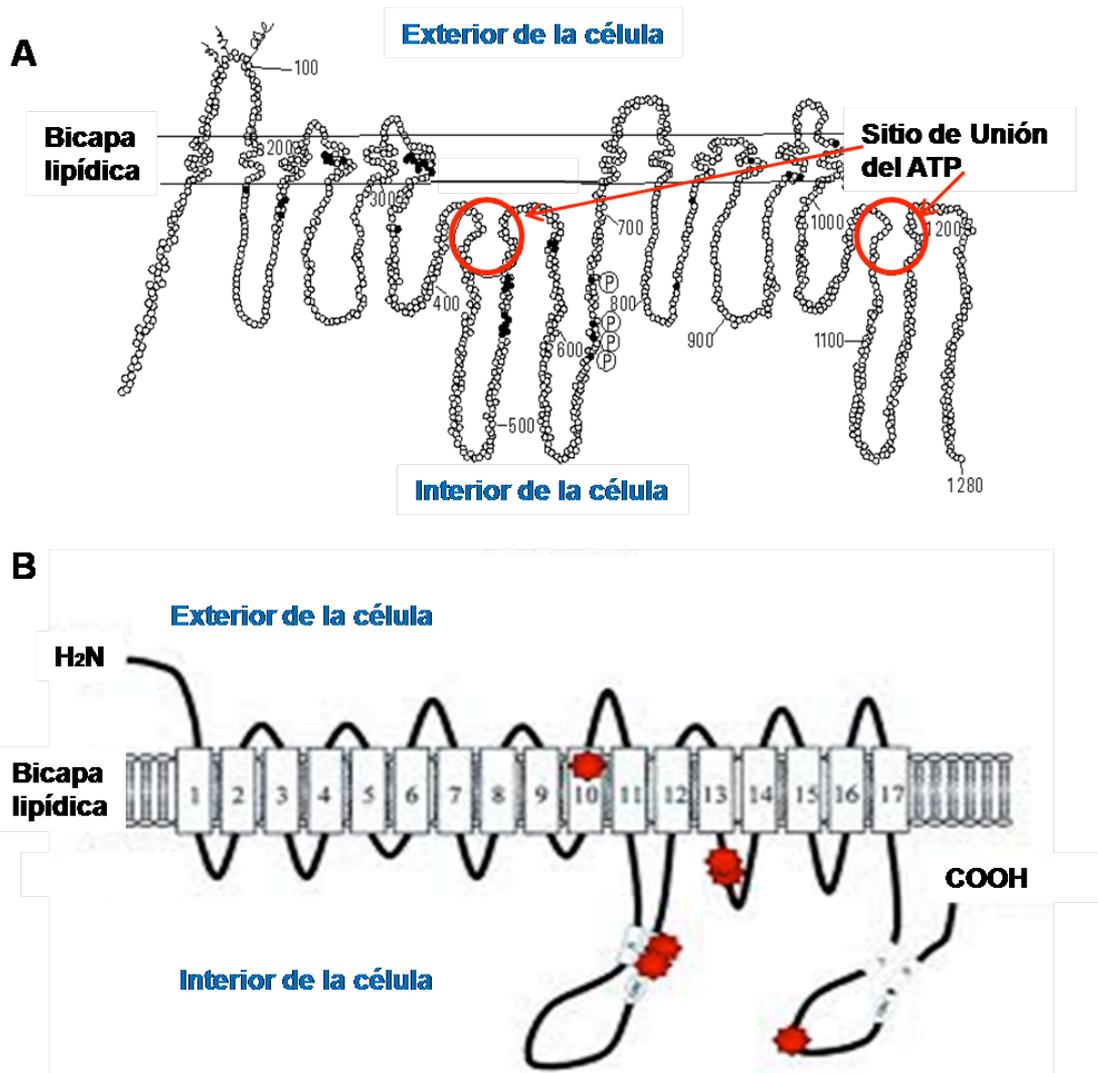
#### **1.2.1.1. Modificación de los transportadores multifármaco ATP dependientes**

Son proteínas trans-membrana encargadas de retirar sustancias del interior de la célula para preservar la integridad de la misma. Son proteínas con función de bomba, pertenecientes a la superfamilia de proteínas ATP dependientes, ya que requieren de energía para cumplir su función. Se han descubierto varias



proteínas de este tipo, las que principalmente se han asociado con potencial resistencia farmacológica son la glicoproteína P y la familia de proteínas de resistencia a multi-fármacos (MRP, del inglés Multidrug Resistant Proteins). En numerosos estudios se ha descrito una regulación al alza de estos transportadores tanto en seres humanos como en modelos animales (Avoli y col., 2005)

- Glicoproteína P; es una proteína constituida por 12 subunidades que están codificadas por el gen ABC-B1 (o MRP-1) (Sisodiya y col., 2001; Sisodiya y col., 2002). Se encuentra principalmente en las células endoteliales que forman parte de la barrera hematoencefálica, en astrocitos y neuronas del área CA3 del hipocampo. (Löscher, 2007). Existe una expresión al alza de esta proteína, de modo que se produce una disminución de la concentración de los fármacos antiepilépticos en el sitio diana (Löscher y col., 2005).
  
- Proteínas de resistencia a múltiples fármacos; es una proteína constituida por 17 subunidades que están codificadas por el gen ABC-C, en seres humanos se han MRP2 (Dombrowski y col., 2001). Se encuentran principalmente en las células endoteliales que forman parte de la barrera hematoencefálica y en astrocitos. Existen evidencias de una sobre-expresión de estas proteínas, de modo que se produce una disminución de la concentración de los fármacos antiepilépticos en el sitio diana (Beck, 2007)



**Figura 1.** A) Esquema de glicoproteína P, compuesta por una cadena de aproximadamente 1280 y 12 dominios trans-membrana. Presenta 2 zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática, un sitio de glicosilación entre el primero y el segundo dominio trans-membrana y varios sitios de fosforilación. B) Esquema de MRP-2, proteína con 17 dominios trans-membrana y presenta varios sitios de fosforilación.

### 1.2.1.2. Cambios moleculares en canales iónicos

- Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje (o VGCC, del inglés Voltage Gated Calcium Channels);



- Canales de bajo umbral o canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T. La alteración en estos canales conllevaría una apertura de dicho canal por más tiempo del habitual, produciéndose una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  que desencadenaría una liberación continuada de aminoácidos excitadores, como glutamato, al espacio pre-sináptico (Mediante la activación del sistema SNAP-SNARE). Esto provocaría la despolarización de las neuronas vecinas y por tanto la propagación y sincronización de la descarga de un grupo de neuronas (DeLorenzo y col., 2005).
  - Otro tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje relacionados con mecanismos de resistencia son lo de tipo L. Se ha observado que existe una sobre-expresión de estos canales en astrocitos en modelos de epilepsia en animales (Chung y col., 2001; Xu y col., 2007), estos canales al estar asociados a los procesos secretores de vesículas se considera que están implicados en la liberación de aminoácidos excitadores, de forma continua, a la hendidura sináptica.
- **Canales iónicos de  $\text{Na}^+$** ; El canal de sodio está constituido por una subunidad  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . Es el sitio diana de múltiples antiepilépticos de primera línea (Carbamazepina, fenitoína, lamotrigina, topiramato y ácido valproico) (Löscher y Schmidt, 2004). Se han descrito dos tipos de canales de sodio: los canales rápidos y transitorios (denominados INaT) responsables de la primera fase del potencial de acción y, los canales lentos y persistentes (INaP), cuya función no está



totalmente esclarecida. Se han demostrado alteraciones en los canales INaT como causas de farmacoresistencia (Catterall, 1999).

- **Canales iónicos de K<sup>+</sup>**; en concreto se han encontrado evidencias de que en modelos animales de fármaco-resistencia, los canales de K<sup>+</sup> tipo Kir4.1 (potassium inward rectifier 4.1) están implicados en la fármaco-resistencia (Ivens y col., 2007). Dichos canales están codificados en el gen KCNJ10 y parece que alteraciones en éste hacen que un paciente pueda ser más susceptible a sufrir ataques epilépticos (Buono y col., 2004; Olsen y Sontheimer 2008). Durante una crisis epiléptica, la concentración extracelular de K<sup>+</sup> puede incrementarse en la hendidura sináptica desde los 3 mM hasta los 10-12 mM, estos canales Kir4.1 parece que están relacionados con el tamponamiento del K<sup>+</sup> liberado durante la neurotransmisión (Binder y Steinhauser, 2006) dándose la situación de un aumento de la concentración de K<sup>+</sup> en la hendidura, lo que a su vez parece inducir una sobreexpresión de los canales de glutamato tipo NMDA. Esta situación explicaría un incremento en la hiperexcitabilidad neuronal (Ivens y col., 2007).
- **Canales iónicos para hidrogeniones (H<sup>+</sup>)**; a través de estos canales pasan corrientes catiónicas. Estos canales poseen una función marcapasos, regulando la resistencia de la membrana celular, la integración dendrítica y la estabilización del potencial de membrana en reposo. Se localizan generalmente en las dendritas. Existen evidencias de que algunos fármacos, lamotrigina y gabapentina, ejercen su acción



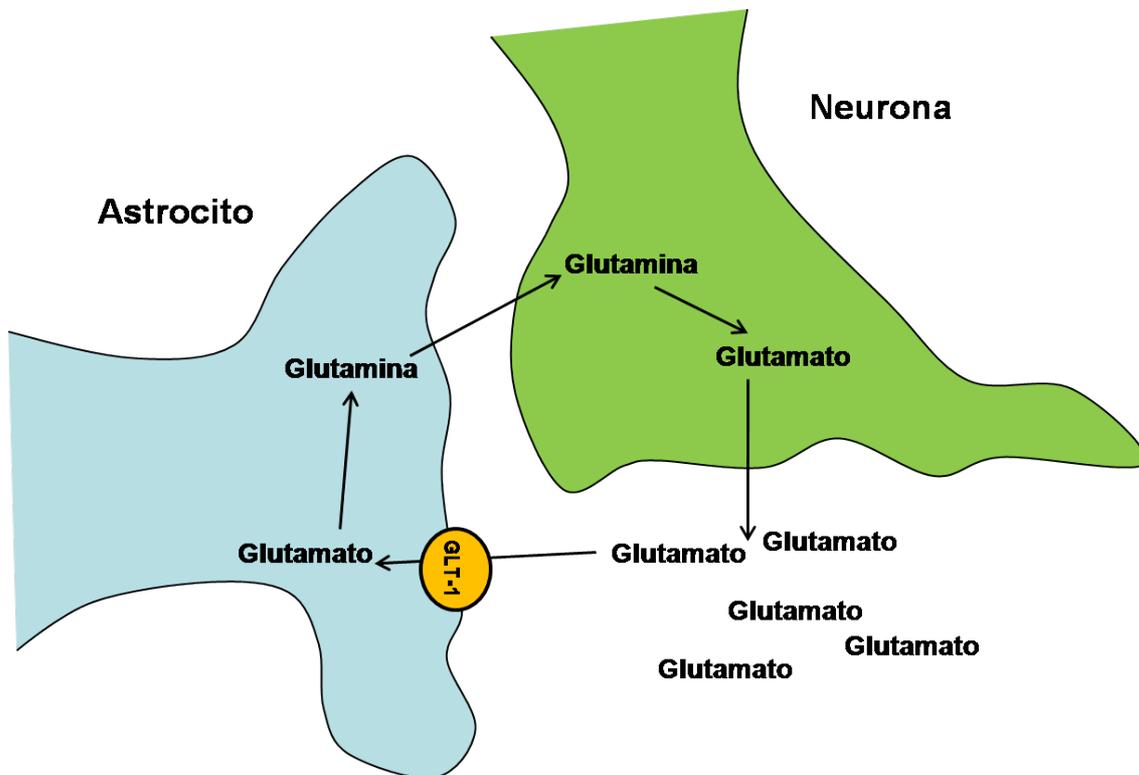
a través de estos canales por lo que cualquier alteración de los mismos produciría una resistencia al efecto de ambos fármacos (Remy y Beck, 2006)

#### 1.2.1.3. **Alteración en los transportadores de glutamato**

La alteración de los transportadores de glutamato en la epilepsia, se relaciona con una regulación a la baja de la expresión de dichos transportadores. Dicha disminución de transportadores provoca un incremento en los niveles de glutamato en la hendidura sináptica, así como un aumento del tiempo que éste permanece en dicha hendidura. Favoreciendo el aumento de la duración en la estimulación.

En la epilepsia se han descrito alteraciones en los transportadores de glutamato del tipo EAATs (transportadores de glutamato dependientes de  $\text{Na}^+$ ), también denominados GLT (del inglés Glutamate Transporters). En seres humanos observamos la siguiente clasificación:

- **EAAT1 / GLT-1**; expresado en células gliales (Daunbolt, 2001).
- **EAAT2/GLT-2**; expresado mayoritariamente en células gliales (Daunbolt, 2001; Shigeri y col., 2004).
- **EAAT3/ GLT-3**; expresado en neuronas (Shigeri y col., 2004).
- **EAAT4/GLT-4**; transportador de glutamato que se expresa mayoritariamente en las células de Purkinje del cerebelo (Shigeri y col., 2004).



**Figura 2.-** Proceso que sigue el glutamato desde que es liberado a la hendidura sináptica por las neuronas. El glutamato es introducido en los astrocitos a través del transportador GLT-1 y una vez dentro del astrocitos es convertido en Glutamina y devuelto de este modo a las neuronas. Allí será procesada la glutamina para obtener de nuevo glutamato.

- **EAAT5/ GLT-5;** transportador de glutamato que se expresa mayoritariamente en la retina (Shigeri y col., 2004).

#### 1.2.1.4. Alteración en receptores

- **Receptor GABA<sub>A</sub>**; está formado por diecinueve subunidades. La activación de este receptor causa entrada de cloro en la célula.



Cualquier alteración en las subunidades que forman el receptor pueden influir en propiedades del receptor, como; i) afinidad por el GABA, ii) modulación alostérica o iii) alteración de las características biofísicas del canal (Olsen y col., 2004; Avoli y col., 2005).

De las subunidades que forman el receptor, seis de ellas son subunidades  $\alpha$  y cualquier alteración en éstas está asociada al desarrollo de fármaco-resistencia, se ha comprobado que existe fármaco-resistencia cuando existe una baja expresión de la subunidad  $\alpha 1$  y un aumento en la subunidad  $\alpha 4$  (Brooks-Kayal, 1998; Zambrano y col., 2007). También existen evidencias de alteraciones en las subunidades  $\delta$  de estos receptores que pueden inducir fármaco-resistencia (Peng y col., 2004).

- **Receptores de glutamato**; los receptores que se asocian a la aparición de fármaco-resistencia a fármacos como el felbamato o el topiramato son tanto el receptor de glutamato tipo NMDA, para el primero, como el receptor de glutamato tipo AMPA para el segundo. En concreto estos fármacos ejercen su acción a través de la modulación del sitio de unión de la glicina y cualquier modificación en estos receptores provocarán la inacción de los fármacos antiepilépticos (Harty y col., 2000)



### **1.3. CIRUGÍA DE LA EPILEPSIA**

El concepto de *cirugía de la epilepsia* debe quedar reservado para aquellas intervenciones quirúrgicas realizadas sobre el sistema nervioso con el fin de tratar la epilepsia en pacientes que cumplen con los criterios de fármaco-resistencia (Villanueva y Sola, 2009). En las últimas décadas, la cirugía de la epilepsia ha ido cobrando mayor relevancia haciendo que tenga un papel cada vez más importante como recurso terapéutico (Wyler y Hermann, 1994; Tuxhorn y col., 1997).

El objetivo del tratamiento quirúrgico es disminuir o eliminar la tendencia del cerebro a presentar crisis epilépticas de forma recurrente, a la vez que evitar el deterioro de las funciones cerebrales, con la condición añadida de que la cirugía no implique la producción de déficits neurológicos en el paciente (Villanueva y Sola, 2009).

Los candidatos idóneos para este tipo de cirugía serán aquellos que hayan sido diagnosticados con epilepsia del lóbulo temporal, siendo este tipo de epilepsia la que mejor responde al tratamiento quirúrgico (Salanova y col., 1999; Wiebe y col., 2001).

Los tipos de procedimientos quirúrgicos admitidos internacionalmente son: resecciones corticales temporales, resecciones corticales frontales, parietales, rolándicas, occipitales o zonas de transición entre las anteriores (Villanueva y Sola, 2009).

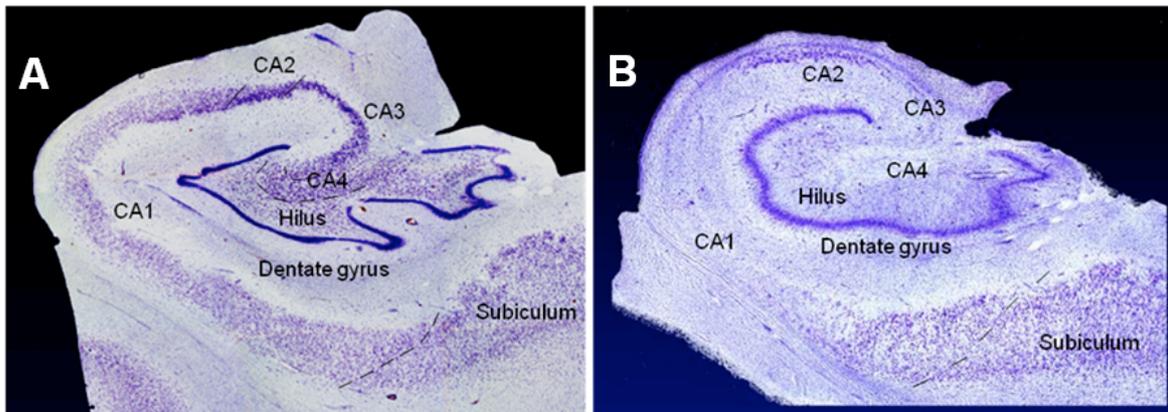


Con la resección cortical; lo que se pretende es extirpar solamente el suficiente tejido neuronal para eliminar las crisis sin producir déficit neurológico. Los límites de la corteza cerebral a resecar van a venir dados por la evaluación prequirúrgica del paciente y por los estudios intraoperatorios realizados, sin estar necesariamente asociada el área a resecar con una lesión cerebral visible en la RM. Entre el 60-70% de los pacientes a los que se le practica una resección temporal anterior quedan libres de crisis con un seguimiento durante 2 años (Schuele y Lüders, 2008). Los resultados funcionales obtenidos en nuestro centro, han sido excelentes, y el 100% de los pacientes están en grados I y II de Engel a los 2 años de seguimiento (Pastor y col., 2005).

El objetivo por tanto, es conseguir una extirpación completa de lesión y zona epileptógena. La convergencia de los hallazgos neurofisiológicos (necesarios para definir correctamente la zona epileptógena) y de imagen (necesarios para definir bien la zona lesiva) proporcionan los mejores resultados (Cascino y col., 1993).

## **1.4 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL**

En La epilepsia del lóbulo temporal constituye una de las formas más frecuentes de epilepsia fármaco-resistente (Engel, 1996). En paciente con epilepsia del lóbulo temporal, la región epileptógena por lo general se encuentra en estructuras temporales como el hipocampo y la región parahipocámpal que están afectados por la esclerosis mesial,



**Figura 3.-** Cortes histológicas de hipocampos. A) Hipocampo normal con sus capas (CA1, CA2, CA3, CA4) el hilus, gyrus dentado y subiculum. B) Hipocampo de un paciente con esclerosis temporal mesial, obsérvese la reducción de tamaño y la pérdida de las capas CA1 y CA3.

representando ambas zonas el sustrato histológico más común en la epilepsia del lóbulo temporal (Babb y Brown, 1987). La esclerosis se caracteriza por una reducción del volumen del hipocampo junto con una pérdida selectiva de las neuronas en la corteza entorrinal, el hilus del giro dentado y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (ver figura 3). Estas alteraciones van acompañadas de un proceso de alteración de los axones de las fibras musgosas conocidos como “sprouting” (Sutula y col., 1989).

El potencial epileptógeno de este trastorno resulta de la pérdida de neuronas específicas en el hipocampo y la reorganización sináptica de los elementos celulares, que desembocan en hiper-sincronización e hiper-excitabilidad. Así, disponemos de cuantiosa información referente a la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELTM), establecida gracias a los estudios realizados en las unidades de cirugía de la epilepsia y a modelos de



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

experimentación animal (De Felipe, 1999), aún se desconocen los acontecimientos que inician el proceso. A pesar de la intensa investigación sobre los mecanismos básicos de la ELTM, aún no está claro cuál es el verdadero papel del hipocampo esclerótico en este tipo de epilepsia (Engel, 1996). Una cuestión que se plantea en los estudios actuales sobre ELTM es ¿hasta qué punto el hipocampo esclerótico constituye la región responsable de las crisis epilépticas? Los resultados quirúrgicos, con un elevado porcentaje de casos libres de crisis, parecen avalar la hipótesis de una participación clave del hipocampo (Lüders, 1992). Sin embargo las investigaciones llevadas a cabo en pacientes con ELTM, ofrecen resultados que permiten inclinarse por la idea de la existencia de numerosos focos epileptógenos en las crisis epilépticas, afectando a regiones relativamente extensas del lóbulo temporal, la amígdala y la zona para-hipocampal, estructuras que son resecaadas habitualmente durante la cirugía (Zumsteg y col., 2006; Pastor y col., 2006). Por tanto, parece que la participación del hipocampo en las crisis epilépticas podría constituir un fenómeno relacionado con su mayor tendencia a la hiper-excitabilidad refleja (Menéndez de la Prida, 2006). De hecho los estudios electrofisiológicos en modelos animales de kindling, sugieren que son otras las estructuras claves en el inicio de las crisis parciales de tipo tónico-clónico antes de que aparezcan las manifestaciones de esclerosis (Piredda y Gale, 1985). Existe la idea de que algunas crisis de fenotipo límbico pueden ser originadas por descargas originadas en la corteza piriforme y perirrinal, así como en otras estructuras de la región temporal antes de invadir el hipocampo (Piredda y Gale, 1985). Estos niveles patológicos de actividad se traducirían posteriormente, en mecanismos moleculares y celulares desencadenantes de un proceso de epileptogénesis en



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

el propio hipocampo y en toda la región para-hipocampal, demostrando que los mecanismos subyacentes de las crisis y la epileptogénesis constituyen procesos diferentes (Menéndez de la Prida, 2006). Estudios recientes (Köhling y Avoli, 2006) están dirigiendo su atención hacia otras regiones del cerebro como el subiculum, analizando la función GABAérgica y las corrientes persistentes de Na<sup>+</sup>.



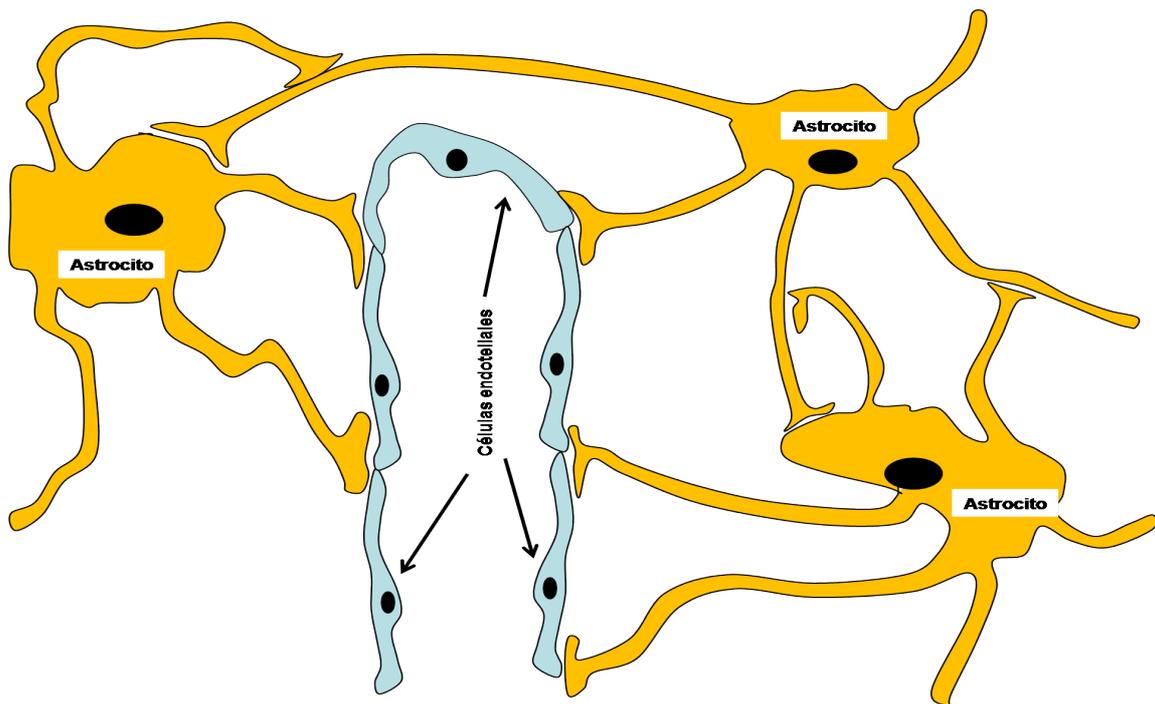
## **2. ASTROCITOS**

### **2.1. FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

El sistema nervioso central (SNC) está formado por distintos tipos de células: las neuronas y las células de la glía. Las neuronas son las células responsables de la transmisión de la información gracias a su capacidad de transmitir el impulso nervioso. Aunque ésta constituye, sin duda, la función más relevante del SNC, las células no neuronales, es decir, las células de la glía, desempeñan también una función muy importante. Las células de la glía son de diferentes clases, distinguiéndose: células ependimarias, células macrogliales y células microgliales. Las células macrogliales se pueden subdividir, a su vez, en dos grupos: astrocitos y oligodendrocitos. Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC. Ejercen importantes funciones en el cerebro tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto, algunas de las funciones que desempeñan son:

#### ***2.1.1. Formación de la barrera hematoencefálica***

Probablemente una de las funciones más conocidas de los astrocitos es su participación en la formación de la BHE. En este caso, los pies terminales de los astrocitos entran en contacto con las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, estableciendo uniones que dan lugar a una barrera altamente selectiva (Tamayo-Orrego y Duque-Parra, 2007).



**Figura 4.** Se muestra un pequeño ejemplo de cómo los astrocitos se conectan entre ellos, de modo que formarán una red grande y compleja. Así mismo se puede observar como los astrocitos entran en contacto con las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Las células endoteliales se encuentran unidas entre sí por uniones estrechas y a su vez, mediante uniones intracelulares, a los pies terminales de los astrocitos (Ballabh y col., 2004).

Esto hace que la BHE formada sea prácticamente impermeable a una gran cantidad de moléculas, que no pueden acceder directamente al cerebro (con la excepción de los órganos circunventriculares) desde el plasma sanguíneo, sino que deben atravesar las células endoteliales por difusión pasiva (moléculas altamente lipofílicas y de pequeño tamaño) o transporte activo, y a través de los astrocitos llegar a las neuronas.



### **2.1.2. Captación de nutrientes a través de los capilares sanguíneos**

La glucosa es captada y convertida en piruvato en una serie de reacciones enzimáticas. Éste, a su vez, gracias a la lactato deshidrogenasa, se convierte en lactato, que se libera al espacio extracelular donde es captado a su vez por las neuronas, que lo usarán como sustrato para producir ATP (Frade y col., 2008).

### **2.1.3. Participación en la formación de sinapsis**

Prácticamente en la totalidad de las sinapsis que se establecen en el SNC están implicados los astrocitos, de modo que se podría hablar de que la función cerebral se lleva a cabo no sólo gracias a las neuronas sino con la implicación directa de los astrocitos.

Las prolongaciones astrocitarias envuelven las sinapsis permitiendo así la regulación de un micro-entorno sináptico (Araque y col., 1999; Araque, 2008), es decir los astrocitos pasan a convertirse en verdaderos elementos moduladores y que están a su vez integrados en las propias sinapsis.

Los participación de los astrocitos en las sinapsis, no sólo se limita a la eliminación de neurotransmisores o iones de la hendidura sináptica sino que estaría relacionados con la formación, maduración y estabilización de las conexiones sinápticas entre neuronas.

Así mismo se ha descrito que los astrocitos poseen un papel muy importante en la plasticidad sináptica, en concreto participan muy activamente en la



generación de la potenciación de larga duración (o LTP, del inglés Long-Term Potentiation) (Perea y col., 2009).

#### **2.1.4. Regulación de la actividad antioxidante cerebral**

Los astrocitos presentan una gran concentración de elementos antioxidantes, como el glutatión, además de que pueden proporcionarlos a las neuronas (Frade y col., 2008; Dringen y col., 2002). El glutatión es un elemento importante en la actividad antioxidante celular: actúa como un elemento que elimina las especies reactivas de oxígeno directamente y como un elemento básico para la síntesis de varias peroxidasas.

#### **2.1.5. Liberación de citocinas, factores de crecimiento**

Los astrocitos sintetizan numerosas moléculas que liberan al medio extracelular; dichas moléculas tienen naturalezas tan diversas como factores solubles, factores de crecimiento, citocinas, proteínas de transporte apolipoproteína E, , etc.

- **Factores de crecimiento;** son una amplia variedad que incluye el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento nervioso o el factor neurotrófico ciliar. Éstos influyen en gran cantidad de funciones, como el crecimiento de neuritas, la formación de sinapsis o la migración celular, ya que se liberan en la zona de unión del pie terminal del astrocito que está en contacto con las células endoteliales.



- **Citocinas;** son moléculas que pueden inducir la activación de la microglía presente en el cerebro (Vesce y col., 2007) o actuar sobre neuronas o incluso otros astrocitos, influyendo sobre otras funciones. Algunos ejemplos de citocinas son las interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6) (Lui y col., 2000; Lynch y col., 2001) el factor de necrosis tumoral y algunos miembros de la familia de los interferones. En función del tipo celular al que afecten, pueden incrementar la extensión de las neuritas, aumentar el número de canales de sodio voltaje dependientes en neuronas, estimular la secreción del factor de crecimiento nervioso (Gee y Keller, 2005) o incluso actuar sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (Rothwell y Luheshi, 2000).

#### ***2.1.6. Síntesis de proteínas transportadoras***

Un claro ejemplo de esta característica es la síntesis de la proteína transportadora apolipoproteína E. Esta proteína pertenece al grupo de las lipoproteínas y posee, en el cerebro, un papel esencial en el metabolismo del colesterol. La ApoE es sintetizada en el cerebro ya que no existe un intercambio entre la ApoE plasmática, sintetizada en el hígado, con la ApoE cerebral debido a la existencia de la barrera hematoencefálica (Posse de Chaves y Narayanaswami, 2008). En el cerebro, la ApoE es sintetizada principalmente por los astrocitos y microglia (Cedazo-Mínguez, 2007).

Parece que la ApoE cerebral juega un papel importante en la redistribución de lípidos y colesterol durante los procesos de reparación de las membranas plasmáticas, durante la plasticidad sináptica, mantenimiento de la mielina,



transporte de lipoproteínas a través del líquido cefalorraquídeo (Giray y col., 2008). Así mismo, la ApoE parece estar relacionada con la capacidad cognitiva del individuo y también en procesos de aprendizaje y memoria (Giray y col., 2008).

### ***2.1.7. Captación de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica***

El ejemplo más claro en este sentido es el del glutamato. Este mecanismo de captura de glutamato mediado por astrocitos es uno de los métodos más importantes para evitar la excitotoxicidad mediada por el glutamato que está presente en el medio extracelular (Pekny y Nilsson, 2005; Hertz y Zielke, 2004). En la superficie de la membrana plasmática existe una multitud de transportadores de glutamato, lo que los convierte en el principal mecanismo de recaptación del glutamato existente en la hendidura sináptica después de la transmisión sináptica (Vesce y col., 2007). En concreto, el transportador que se da en mayor proporción en los astrocitos es el de glutamato del subtipo 1 (GLT-1), siendo éste el responsable del aclaramiento del glutamato extracelular (Daunbolt, 2001).

Este glutamato, una vez en el interior de los astrocitos, es degradado por la glutamina sintasa, obteniéndose glutamina, la cual podrá usarse de dos modos distintos: siendo almacenada para que más tarde el propio astrocito sintetice de nuevo glutamato, o bien dicha glutamina es liberada al espacio extracelular, donde será captada por las neuronas, que la utilizarán para sintetizar glutamato de nuevo gracias a una glutaminasa específica.



### **2.1.8. Recaptación del potasio desde el medio extracelular**

Después de la transmisión sináptica, queda en el medio extracelular una elevada concentración de iones potasio; éstos deben retirarse del medio debido a que pueden provocar despolarizaciones en las neuronas y eventualmente generar un bloqueo de los potenciales de acción (Daunbolt, 2001; Newman, 1993).

La captura de ese potasio en el espacio extracelular se realiza gracias a una combinación de varios elementos:

- Difusión pasiva: sería la entrada de potasio al interior celular mediada por los transportadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$ .
- Transporte activo: por la activación de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  (Walz, 2000).

Esta capacidad para realizar tamponar el exceso de potasio de forma efectiva es un proceso muy característico de los astrocitos, ya que la conexión existente entre ellos, vía uniones comunicantes o *gap junctions*, hace que pueda existir un intercambio iónico entre distintos grupos de células dentro de un mismo campo astrocitario. Incluso los astrocitos pueden liberar el potasio que han capturado desde el medio extracelular, directamente al torrente sanguíneo a través de los procesos que están ligados de manera íntima a las células endoteliales (formando la BHE) (Gee y Keller, 2005).

### **2.1.9. Equilibrio de la concentración de $\text{Na}^+$ intracelular**

Las uniones comunicantes de los astrocitos participan en el intercambio de iones y pequeñas moléculas. Se ha estudiado la influencia del acoplamiento de



las uniones comunicantes en los astrocitos sobre la concentración de sodio intracelular. De hecho cuando estas uniones se encuentran abiertas la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular es la misma en todos los astrocitos pero si se bloquean dichas uniones, entonces se producirá un cambio en la distribución de la concentración de sodio en todos los astrocitos (Rose y Ransom, 1997).

## **2.2. IMPORTANCIA DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN ASTROCITOS**

Actualmente se sabe que los astrocitos si son células excitables y que su excitabilidad se basa en variaciones en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cornell y col., 1990; Cornell y col., 1991; Pasti y col., 1997; Nedergaard y col., 2003). Estas variaciones en la concentración de Calcio pueden ocurrir de forma espontánea e independientes de la actividad neuronal (Parri y Crunelli, 2001; Parri y col., 2001; Nett y col., 2002) o bien puede desencadenarse por la actividad neuronal debido a los neurotransmisores liberados desde los terminales sinápticos (Perea y Araque, 2003).

En astrocitos se han observado dos tipos de actividades dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$ ; i) un incremento en el transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que queda restringido al citoplasma astrocitario (Zonta y Carmignoto, 2002; Goldberg y col., 2010), ii) un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se propaga a los astrocitos adyacentes formando lo que se denomina "*ondas de  $\text{Ca}^{2+}$* " (Dani y col., 1992; Perea y Araque, 2003; Goldberg y col., 2010). Este último comportamiento representa un modo muy efectivo de señalización intercelular en el SNC (Hirase y col., 2004).



### **2.2.1. El $\text{Ca}^{2+}$ como segundo mensajero**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es una señal intracelular muy versátil que puede originar gran cantidad de respuestas por parte de las células, respuestas tan diversas como la exocitosis de un neurotransmisor en el sistema nervioso, la contracción de músculos o la activación de la transcripción génica (Berridge y col., 2003).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) depende en cada momento de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula, principalmente desde el exterior celular, y de la cantidad del mismo que es retirado por los mecanismos de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  de que dispone la célula, ya sea por el aporte de los depósitos intracelulares o por el aporte del exterior celular (Berridge y col., 2003). Los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  oscilan entre el 100 nM de la célula en reposo y 1  $\mu\text{M}$  cuando la célula está activada. El tipo de respuesta no está condicionado únicamente por la intensidad del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  sino que también son factores importantes la forma de la señal, su duración y su distribución temporal. No generan iguales respuestas una señal con una duración de microsegundos que una señal que dura minutos u horas.

La señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es por tanto un potente estímulo para las células y al estar implicado en gran cantidad de procesos tan distintos entre sí, ha de estar también finamente regulado con el fin de no provocar efectos indeseados. Dentro de los procesos en los que puede estar implicado un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  encontramos desde una activación de proteínas quinasas, como la proteína quinasa C, que pueden provocar modificaciones a través de la fosforilación de canales iónicos, proteínas del citoesqueleto o enzimas (Carmignoto, 2000). Además este incremento en la concentración de



$\text{Ca}^{2+}$  puede tener como efecto el que aparezca un cambio en la expresión génica (Bagaglio y col., 1993; Carmignoto, 2000). Para que se mantengan los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  en los márgenes considerados como fisiológicos, es decir para mantener la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$ , la célula dispone de una compleja maquinaria (Berridge y col., 2003).

### **2.2.2. Mecanismos de entrada de calcio en astrocitos**

El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol celular, puede producirse a través de dos vías; i) la membrana plasmática ( $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) o ii) desde los depósitos intracelulares.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior se produce a favor de gradiente electroquímico a través de la activación de distintos tipos de canales o receptores de membrana.

i) Incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la entrada de este ión desde el espacio extracelular, puede ser a través de:

- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes
- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por ligando
- Receptores acoplados a proteína G, cuya activación provocará un incremento en la síntesis de  $\text{IP}_3$  (Carmignoto, 2000; Perea y Araque, 2003).

ii) incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la liberación de este ión desde los depósitos intracelulares



### **2.2.2.1. Canales de $Ca^{2+}$ voltaje-dependientes**

Los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes son una familia de complejos proteicos que se encuentran en las membranas de células. Están formados por una subunidad  $\alpha 1$  y por otras subunidades auxiliares o reguladoras de la actividad del canal, llamadas  $\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Curtis y Catterall, 1984; Garcia y col., 2006).

La subunidad  $\alpha 1$  es la encargada de formar el poro iónico a través del cual pasa el ión calcio, así como el lugar de unión de los diferentes fármacos agonistas y antagonistas conocidos. El resto de subunidades que forman el canal ( $\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) son subunidades auxiliares y/o reguladoras de la actividad del canal (Curtis y Catterall, 1984; García y col., 2000).

Aunque en un primer momento la presencia de este tipo de canales en los astrocitos producía gran controversia, hoy día está ampliamente aceptado (Burgos y col., 2007). Estos canales fueron descritos por vez primera en cultivos primarios de astrocitos, siendo identificados mediante técnicas de electrofisiología dos subtipos de canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje, el subtipo L y el subtipo T (Verkhartsky y col., 1990; Carmignoto, 2000; Burgos y col., 2007).

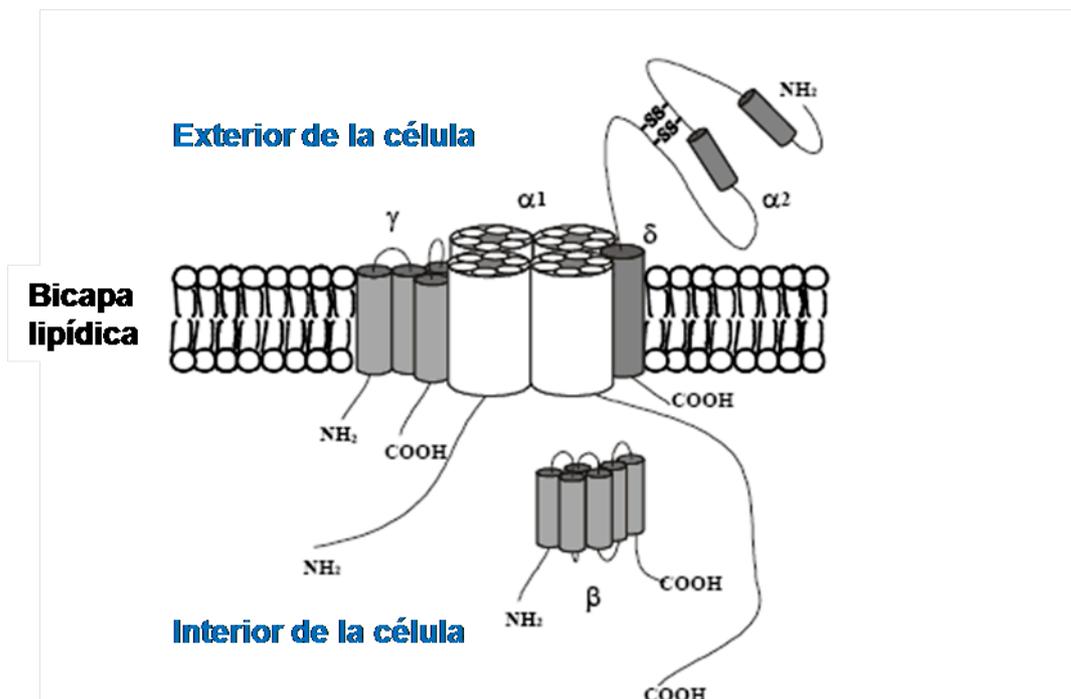


Figura 5. Estructura típica de un canal de calcio operado por voltaje

#### 2.2.2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por ligando

En los astrocitos se expresan al menos dos tipos de estos canales:

- **Receptores de glutamato**; divididos a su vez en receptores tipo AMPA (Carmignoto, 2000; Perea y Araque, 2003) y tipo NMDA (Araque y col., 1998; Perea y Araque, 2003). La acción del primero se realiza mediante una entrada de  $\text{Na}^+$  al interior del astrocito de modo que bloquea las corrientes de  $\text{K}^+$ , mientras que el segundo tipo permita la entrada directa de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- **Receptores purinérgicos del tipo P2x**, que están asociados a receptores catiónicos inespecíficos (Carmignoto, 2000).

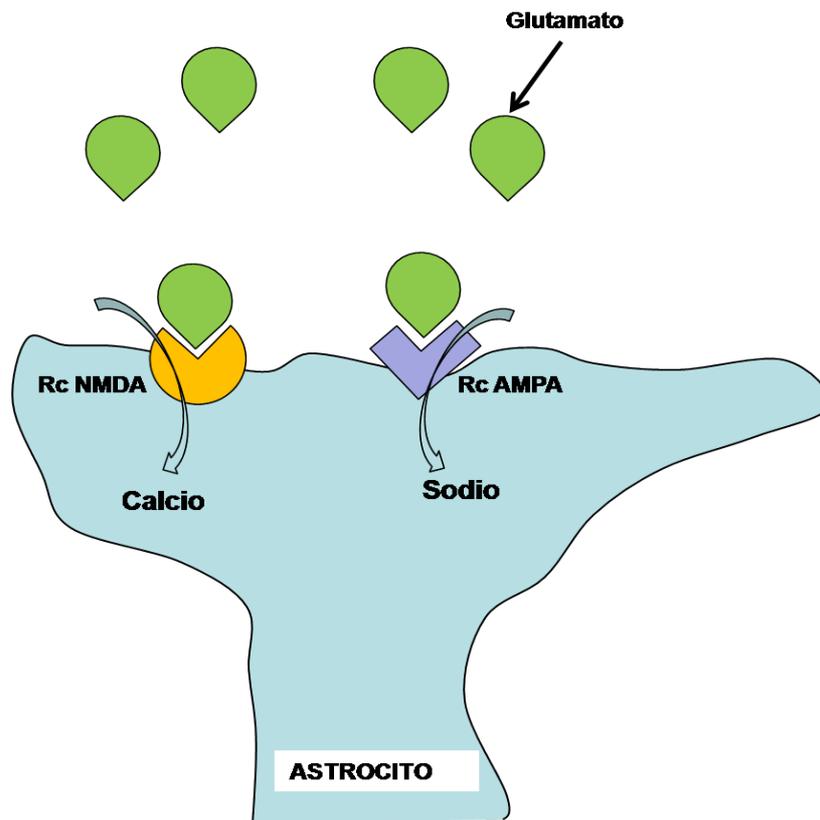


Figura 6. Canales de calcio operado por ligando.

### 2.2.2.3. Receptores acoplados a segundos mensajeros

Los astrocitos expresan en su membrana gran variedad de receptores metabotrópicos para diferentes neurotransmisores, como por ejemplo glutamato o ATP. Estos neurotransmisores actúan a través de la activación de proteínas G, que a su vez activaran a la fosfolipasa C lo que provocará la producción de segundos mensajeros, en este caso  $IP_3$ . (Carmignoto, 2000; Burgos y col., 2007)

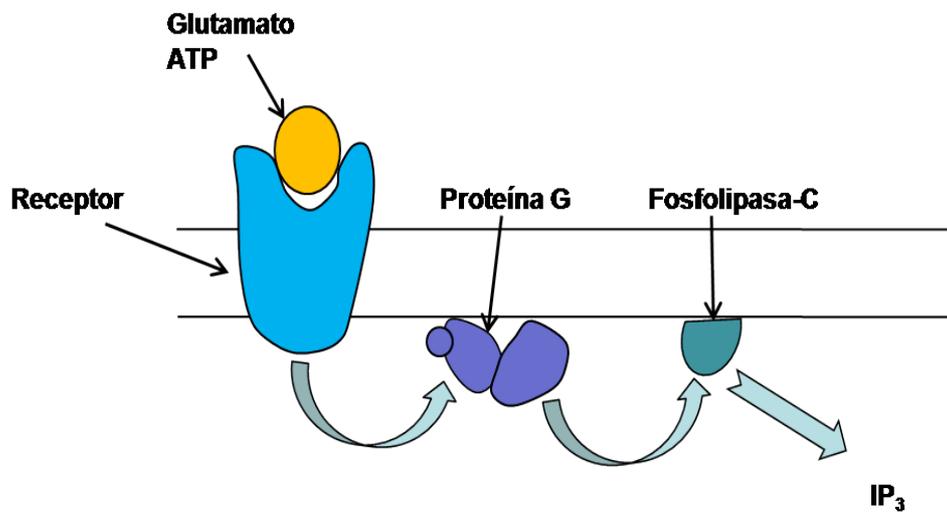
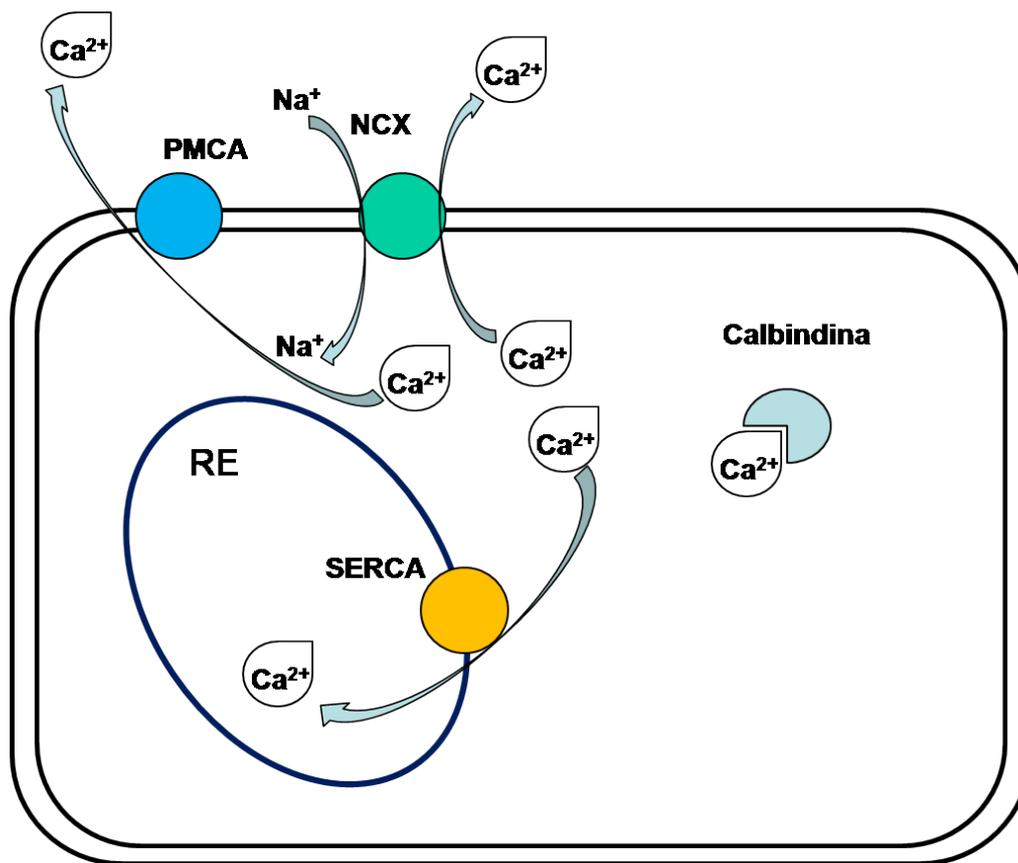


Figura 7. Canales de calcio acoplados a proteína G, producción de segundos mensajeros como el IP<sub>3</sub>.

#### 2.2.2.4. Liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares

El incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> debido a la liberación de este ión desde los depósitos intracelulares, el principal depósito intracelular de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos es el retículo endoplásmico (Beck y col., 2004) aunque también actúan como de este modo el núcleo y la mitocondria (Carmignoto, 2000). En este punto se debe destacar que el comportamiento de los astrocitos difiere del comportamiento del resto de células, puesto que como norma general la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde estos depósitos intracelulares está mediada por dos tipos de receptores; i) receptores de IP<sub>3</sub> y ii) receptores de rianodina.

En el caso de los astrocitos, los receptores de rianodina no son funcionales o se encuentran en un número tan pequeño que no representan un mecanismo importante en la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el RE (Beck y col., 2004; Perea y col., 2009).



**Figura 8.** Representación esquemática de los mecanismos de extrusión de  $Ca^{2+}$  del que disponen los astrocitos. PMCA=  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, NCX= intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , SERCA=  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico, RE= retículo endoplásmico.

Sin embargo los receptores de  $IP_3$  tiene un papel muy importante en la salida de  $Ca^{2+}$  desde el RE. Además es importante destacar que los canales formados por este tipo de receptores, son muy sensibles a la concentración de calcio de modo que pueden producirse un incremento en la liberación de calcio en presencia de  $Ca^{2+}$ , cuya liberación ha sido mediada por la presencia de  $IP_3$ . Este mecanismo se conoce como *liberación de Calcio inducida por Calcio* (o CICR, del inglés, Calcium Induce Calcium Release) dependiente de  $IP_3$  (De Pittà y col., 2009).



### **2.2.3. Mecanismos de extrusión del $\text{Ca}^{2+}$**

Para disipar los aumentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  la célula dispone de diversos mecanismos, entre los cuales están:

- Proteínas tamponadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ ; en el citosol, la célula dispone de proteínas secuestradoras de  $\text{Ca}^{2+}$  como la calbindina-D28K (Berridge y col., 2003).
- Las proteínas de la membrana plasmática son la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA) y los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Guerini y col., 2005).
- En el retículo endoplasmico se encuentra la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico (SERCA, del inglés Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase).

## **2.3. ASTROCITOS Y SU PAPEL EN EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN**

Hasta hace muy pocos años se pensaba que los astrocitos eran células de soporte en el sistema nervioso, cuyas funciones principales eran estructurales y tróficas, aunque ya Ramón y Cajal había advertido de que tal visión sería un obstáculo para entender el papel de la neuroglía (Ramón y Cajal, 1913). Esta visión tiene como principal característica el hecho de que los astrocitos se consideran células no excitables, a pesar de poseer canales iónicos en su membrana plasmática (Barres, 1991). De hecho, la posible participación de los



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

astrocitos en un proceso de excitación neuronal no sináptico fue propuesta por Konnerth y colaboradores en 1986, aunque hasta 2005 no se obtuvieron resultados que mostraban una excitación neuronal evocada por la actividad astrocitaria (Tian y col., 2005).

En la actualidad se considera que los astrocitos pueden responder a distintos estímulos, como puede ser el aumento de concentración extracelular de potasio o glutamato, produciéndose como respuesta a éstos una variación de la concentración intracelular de calcio (Cornell-Bell y Finkbeiner, 1991). Por tanto puede decirse que si poseen una forma de excitabilidad, pero está basada en variaciones de la concentración citosólica del ión  $Ca^{2+}$ , en lugar de estructurarse en cambios eléctricos en la membrana plasmática (Perea y col., 2005; Cornell-Bell y col., 1990). El aumento en la concentración de calcio presente en el citosol activa un proceso de exocitosis calcio dependiente (complejo SNAP-SNARE), que concluirá con la liberación de gliotransmisores como glutamato, ATP, D-serina, taurina y aspartato (Wetherington y col., 2008; Halassa y col., 2007) al espacio peri-sináptico. Esta acción modulará la actividad neuronal y la transmisión sináptica (Tian y col., 2005; Volterra y col., 2005; Fellin y col., 2005). Esta íntima asociación entre neuronas y astrocitos llevo a acuñar el término de sinapsis tripartita (Araque y col., 1999), momento en el cual comenzó a cambiar radicalmente la imagen que se tenía acerca de la interacción entre astrocitos y neuronas (Araque y col., 2001).

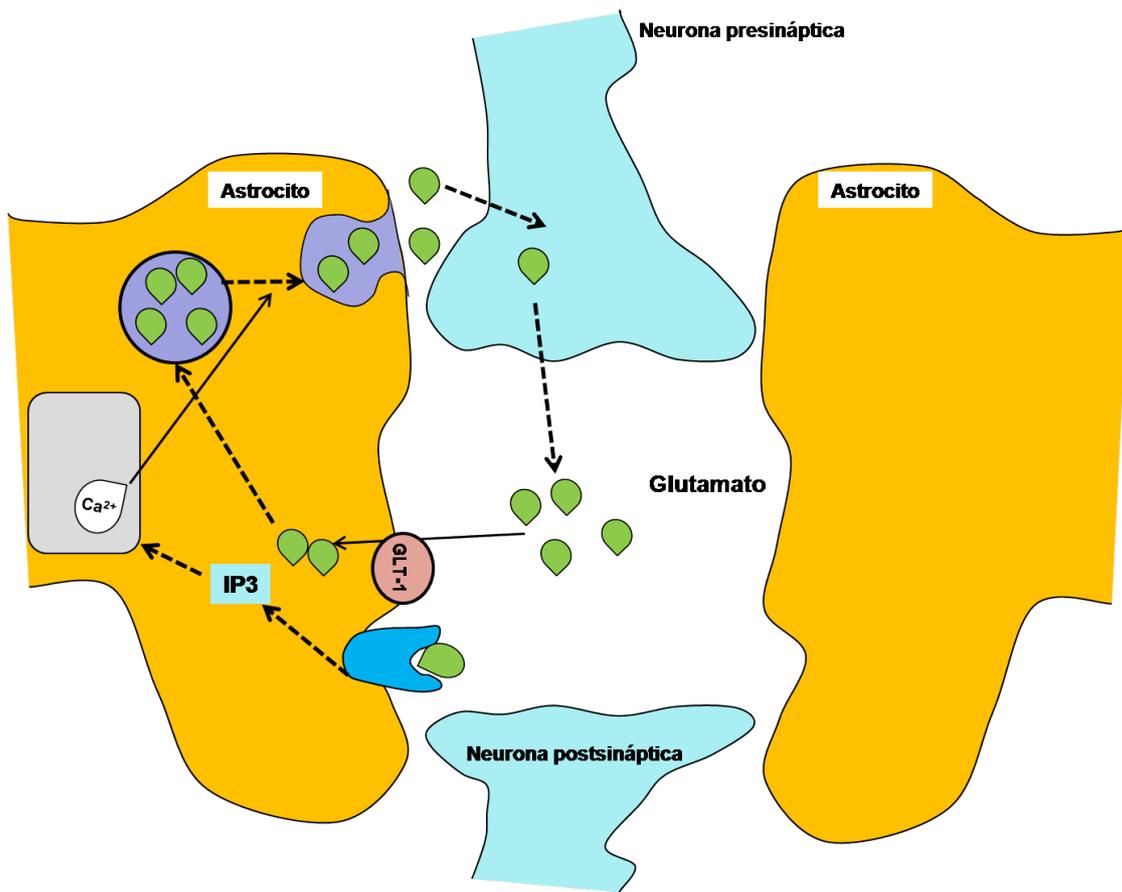
Aunando los conocimientos actuales sobre los astrocitos, en la actualidad se considera que los astrocitos son elementos fundamentales en el procesamiento de información (Perea y Araque, 2003; Herrera-Peco y col., 2008; Sofroniew y Vinters, 2010)



Por la implicación en la epilepsia, nos centraremos especialmente en el papel del glutamato. Numerosos autores han demostrado que en cultivos puros de astrocitos se observa liberación de glutamato (Bezzi y col., 1998; Chen y col., 2006).

La teoría más extendida acerca del mecanismo que media dicha liberación es la de la excitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de las vesículas que contienen glutamato. El acercamiento de dichas vesículas a la membrana plasmática y su posterior liberación estará mediado, entre otras proteínas, por el complejo formado por las proteínas SNAP-SNARE, liberándose el contenido de las vesículas al espacio sináptico (Tian y col., 2005; Volterra y Meldolesi, 2005; Fellin y Haydon, 2005). La liberación de glutamato presenta acciones moduladoras presinápticas al actuar sobre los receptores metabotrópicos de glutamato o sobre los receptores de cainato (Halassa y col., 2007; Fiacco y McCarthy, 2004).

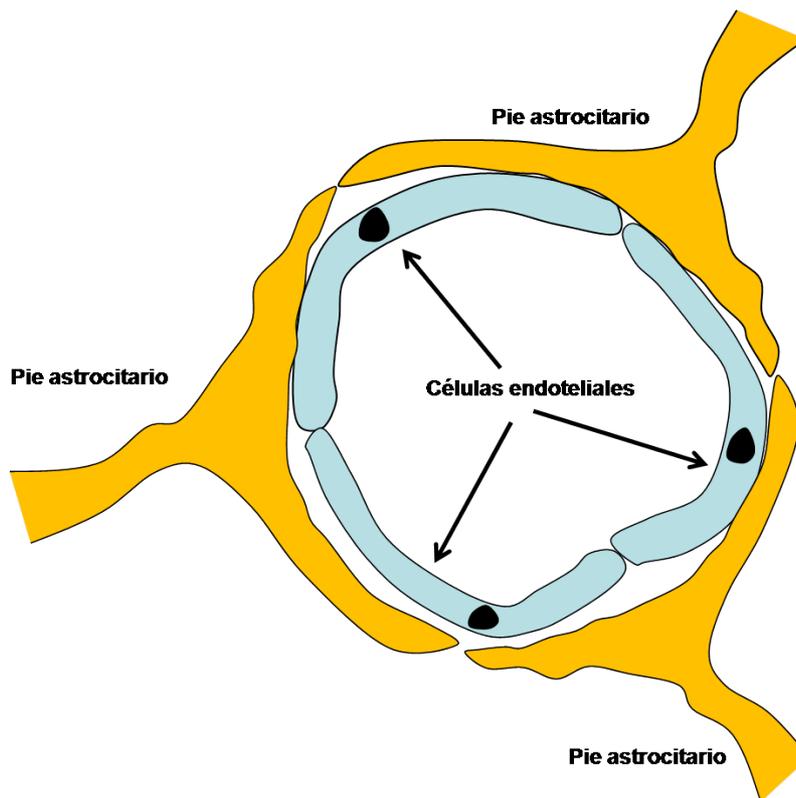
El glutamato liberado por los astrocitos provoca en las neuronas las denominadas "corrientes lentas de entrada" (slow inward currents), que representan un importante mecanismo de sincronización neuronal (Carmignoto y col., 2006). Dicha sincronización sólo se da en distancias cortas, de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (Wetherington y col., 2008; Angulo y col., 2004; Tian y col., 2005), lo que probablemente incluya entre dos y cuatro neuronas adyacentes. Aunque no esté muy clara su relación con la epilepsia, es indudable el interés de este efecto sobre la micro-sincronización.



**Figura 9.** Representación esquemática de una sinapsis tripartita. Se puede observar como el glutamato entra a los astrocitos a través de transportador de glutamato GLT-1 y este glutamato será almacenado en vesículas. Así mismo la unión de glutamato a receptores metabotrópicos produce IP<sub>3</sub> y éste libera Ca<sup>2+</sup> desde el RE, este Ca<sup>2+</sup> mediará mediante el sistema SNAP-SNARE la aproximación de la vesículas con glutamato a la membrana plasmática. Finalmente se producirá una liberación de glutamato, desde el astrocito, a la hendidura sináptica y una vez allí si es recaptado por la neurona presináptica se producirá el fenómeno de las corrientes lentas de entrada, que representa un mecanismo importante de sincronización neuronal.

## 2.4. ASTROCITOS Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Cada vez son más los investigadores que coinciden en que el papel desempeñado por los astrocitos en el control y mantenimiento del sistema



**Figura 10.** Representación esquemática de los elementos celulares que forman la barrera hematoencefálica.

nervioso central es muy importante. Los astrocitos son unas 50 veces más numerosos que las neuronas y en condiciones normales intervienen en una multitud de tareas, como pueden ser la coordinación de una correcta transmisión nerviosa (Araque y col., 2001), control del aporte de nutrientes a las neuronas y oligodendrocitos, producción de sustancias pro o antiinflamatorias (Sofroniew & Vinters, 2010) o reducción de la excitotoxicidad (Wetherington y col., 2008; Pekny & Nilsson, 2005), entre otras muchas funciones. El que intervengan de forma tan importante en estos procesos hace de ellos piezas clave en el correcto funcionamiento del sistema nervioso y



cualquier cambio que haga anómalo su funcionamiento provocará alteraciones que pueden relacionarse con enfermedades del sistema nervioso central.

En esta línea se han descrito alteraciones en los astrocitos relacionadas con determinadas enfermedades del SNC, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Lepore y col., 2008; Jean-Pierre, 2007), esclerosis múltiple y enfermedades autoinmunes (Sofroniew, 2009), la enfermedad de Alzheimer (Sofroniew y Vinters, 2010; Nagele, 2004; Wyss-Coray y col., 2003; Veerhuis y col., 1998), la enfermedad de Parkinson (Mirza y col., 2000; Vermeulen y col., 1994), la enfermedad de Huntington (Sofroniew & Vinters, 2010) y por supuesto también existen evidencia de que están involucrados en la epilepsia (Sofroniew y Vinters, 2010; Wetherington y col., 2008; Seiffert y col., 2006; Eid y col., 2005).

### **3. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA**

La BHE es una barrera para la libre difusión de iones y moléculas orgánicas hacia el tejido cerebral desde el plasma sanguíneo, siendo esta estructura esencial para el normal funcionamiento del SNC (Ballabh y col., 2004; Pascual-Garvı y col., 2004). Es importante destacar que en ciertas áreas del cerebro, los órganos circumventriculares (área postrema, eminencia media, neuro-hipófisis, glándula pineal, órgano sub-fornical y la lámina terminal), no presentan esta BHE constituyéndose como lugares específicos donde se producen intercambios entre el cerebro y el exterior (Weiss y col., 2009).



La BHE está constituida por células endoteliales, que constituyen los vasos sanguíneos cerebrales y los astrocitos, en concreto la estructura denominada pie astrocitario (Herrera-Peco y col., 2008). Estos elementos presentan una permeabilidad muy restringida del endotelio vascular del SNC al paso de solutos plasmáticos, de modo que, excepto el agua, el oxígeno y el dióxido de carbono y determinadas moléculas liposolubles con tamaños entre 400 y 600 Daltons de peso molecular. Las moléculas orgánicas no pueden atravesar libremente dicho endotelio, sino que deben hacerlo a través de sistemas de transporte específicos (Pascual-Garvı y col., 2004).

Existe una íntima relación entre algunos trastornos neurológicos y alteraciones en la barrera hemato-encefılica (BHE) o inclusive microfisuras en la BHE, que permitirın el paso de sustancias al tejido cerebral. En concreto la albımina podrı acceder al espacio extracelular cerebral y entrar en contacto, entre otras cıelulas, con los astrocitos.

Algunos de los trastornos neurológicos en los que se han descrito alteraciones en la BHE son; la migraıa, esclerosis mıltiple, síndrome de post-contusiın así como en la epilepsia (Carmignoto y col., 2006; Angulo y col., 2004; Oby y Janigro, 2006).

## **4. ALBÚMINA**

La albımina es la proteína mıs abundante del plasma y es producida exclusivamente por el hígado. En el organismo hay aproximadamente 500 g de



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

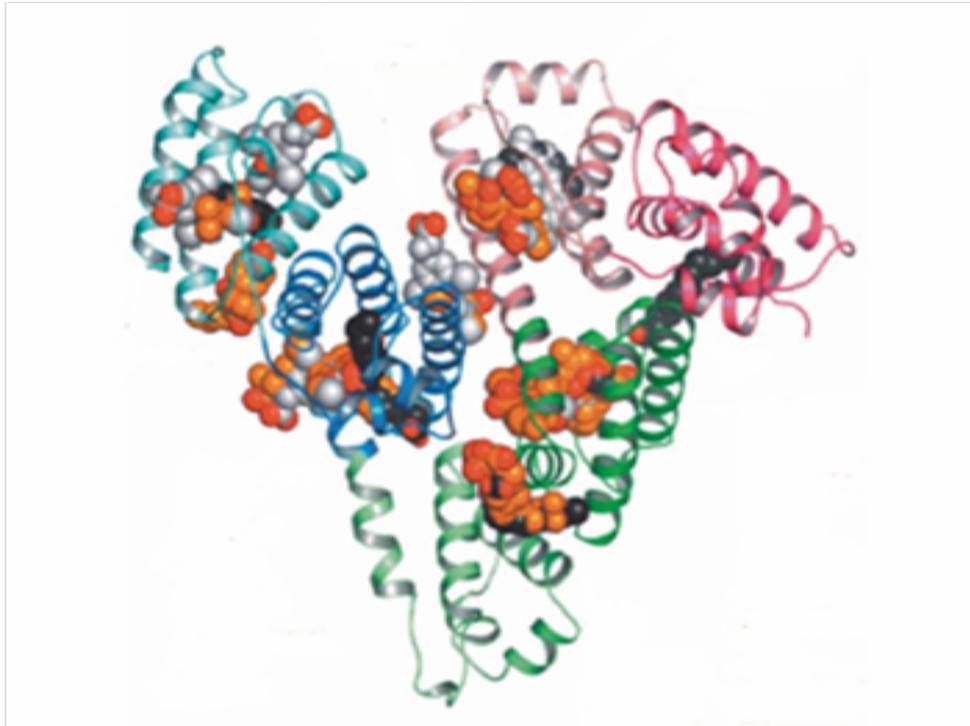
albúmina, con una producción diaria de 15 g, que puede aumentar al doble cuando hay pérdidas y el hígado funciona normalmente. La vida media de la albúmina es de 20 días.

La albúmina tiene un peso molecular de 66.200 kDa y un pH de 8 aproximadamente, es la proteína más abundante de la sangre y constituye entre el 50-60% de las proteínas plasmáticas. Su concentración en plasma está entre 35-50 mg/dl (Peters, 1996). Esta proteína está virtualmente ausente del medio extracelular cerebral, donde su concentración es de 35-50  $\mu\text{g/ml}$  dado que su elevado peso molecular impide el paso a través de la BHE (Nadal y col., 2001).

De entre todas las funciones que realiza la albúmina, se pueden destacar las siguientes:

- Mantenimiento y regulación de la presión oncótica, necesaria para la correcta distribución de los fluidos corporales entre los vasos sanguíneos y los tejidos.
- Transporte de ácidos grasos, hormonas tiroideas, bilirubina no conjugada e incluso fármacos.
- Se une a cationes, como;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .
- Interviene en el tamponamiento del pH

En condiciones fisiológicas, la albúmina existente en la sangre no está presente en el espacio extracelular del cerebro en concentraciones significativas y los astrocitos, por tanto, no tienen contacto con ella. Sin embargo, esta situación puede darse si existe algún tipo de debilitamiento en la BHE.



**Figura 11.** Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana. Está constituida por 585 aminoácidos y contiene seis ácidos palmíticos, presenta una gran afinidad por pequeñas moléculas hidrofóbicas cargadas negativamente.

---

Recientemente se ha descrito que estas alteraciones de la permeabilidad permitirían el paso de proteínas plasmáticas, como la albúmina, que podría ser captada por los astrocitos existentes en las zonas próximas a estas fisuras (Ivens y col., 2007). Se han descrito numerosos efectos de la albúmina sérica sobre los astrocitos en cultivos procedentes de especies murinas. Entre otros, se han observado oscilaciones de calcio en el citosol de los astrocitos, que dan lugar a una inducción de síntesis de ADN (Nadal y col., 1997), regulación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (Tabernero y col., 1997) e inducción de la formación de fibras de estrés de actina (Moser y Humpel, 2007).



En cuanto al modo en que la albúmina puede afectar a los astrocitos, encontramos varias hipótesis. Recientemente se ha mostrado que la albúmina sérica, tras unirse a los receptores de membrana del tipo TGF- $\beta$ , se introduce en la célula (Ivens y col., 2007). Una vez dentro, se traslada al núcleo, donde daría lugar a modificaciones en la expresión génica. Esta regulación puede aumentar el número de receptores del tipo TGF- $\beta$ , disminuir la expresión de canales de K<sup>+</sup> rectificadores de entrada (inward rectifier) del subtipo Kir 4, disminuir a la baja la expresión del canal de agua del tipo aquaporina 4 (AQP4) (Eid y col., 2005) o estimular la proliferación celular (Herrera-Peco y col., 2008). Por otro lado, trabajando en cultivo de astrocitos de rata se demostró que la albúmina actúa de forma directa sobre receptores situados en la membrana plasmática de los astrocitos. El grupo de Bento-Abreu y colaboradores en 2008, describieron que la megalina actúa de receptor para la albúmina. Una vez que la albúmina se une a la megalina se media una internalización de la albúmina pudiendo inducir síntesis de ADN (Bento-Abreu y col., 2008). Esta unión de la albúmina a estos receptores induce la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico vía IP<sub>3</sub>, este incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> es responsable del incremento en la expresión de, por ejemplo, factores tróficos.

## **5. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA EPILEPTOGÉNESIS**

Recientemente se han publicado diversos trabajos que apuntan a la participación de la albúmina en la epileptogénesis. Aunque tradicionalmente no



se le ha asignado una función de señalización, algunos autores ya han descrito que la albúmina sérica, es decir, aquella obtenida después de un proceso de coagulación, es capaz de desencadenar oscilaciones de la concentración del calcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ) en oocitos de *Xenopus* (Tigyi y col., 1991), células PC12 (Tigyi y col., 1992) o en fibroblastos (Nadal y col., 1995), mientras que la albúmina plasmática (Alb-p), la forma obtenida de sangre sin coagular, induce cambios en la  $[Ca^{2+}]_c$  y síntesis de ADN en astrocitos (Nadal y col., 1995; Nadal y col., 1997). Para que la albúmina penetre en el cerebro y entre en contacto con los astrocitos, la BHE deberá verse comprometida ya sea por traumatismo, isquemia o infección (Ivens y col., 2007; Tomkins y col., 2007). Cuando esto ocurre la albúmina es capaz de generar movilizaciones de  $Ca^{2+}$  en el citosol (Nadal y col., 1997; Nadal y col., 2001) o bien puede internalizarse a través de los receptores del factor de crecimiento transformante del subtipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o de la megalina (Ivens y col., 2007; Bento-Abreu, 2008).

Los cambios, mediados por la albúmina, sobre la expresión génica pueden ser los responsables de la regulación a la baja en la expresión de los canales de  $K^+$  de tipo Kir4 (Ivens y col., 2007), la disminución a la baja de canales de agua del tipo AQP4 (Eid y col., 2005) y la alteración en la expresión de los transportadores de glutamato, aunque en este punto hay diferencias entre distintos autores. Mientras que algunos han percibido un aumento en la expresión de los transportadores de glutamato del tipo GLT-1, GLT-2 y GLT-3 (Proper y col., 2002), otros no han hallado diferencias significativas con respecto a astrocitos normales (Tessler y col., 1999). La disminución y la redistribución de los canales del tipo AQP4 hace que el flujo de agua se modifique, lo que a su vez altera el taponamiento del  $K^+$  (Wetherington y col.,



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

2008). Además, la disminución de los canales de  $K^+$  del tipo Kir4 puede provocar una disminución en las corrientes Kir (conductancia de entrada rectificadas de  $K^+$ ), dando lugar al aumento anómalo del  $K^+$  extracelular y provocando una plasticidad anormal de los receptores de glutamato del subtipo NMDA (Ivens y col., 2007). Como resultado de este conjunto de procesos puede aparecer un fenómeno de la hiperexcitabilidad neuronal, que podría cronificarse y ser el sustrato primario para la aparición de epilepsia focal (Crippa y col., 2006).



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La epilepsia fármaco-resistente afecta a 20-30% de los pacientes epilépticos (Picot y col., 2008) y provoca una enorme carga tanto para el paciente como para su familia: el 44% de los pacientes no trabajan a causa de su enfermedad y el 37.5% de las familias ven afectada de forma considerable su economía necesitando en un 32.9% un cuidador. En cuanto a impacto socioeconómico, la epilepsia supone enormes costes para el sistema sanitario público y para el propio afectado y su familia. El coste medio anual de los recursos sociosanitarios dedicados a cada paciente además de los asociados a la productividad laboral es de 6.935 € (visitas al médico, hospitalización, medicación, etc.). Aparte de los aspectos socioeconómicos, la epilepsia fármaco-resistente está asociada con incremento en la tasa de muerte súbita en estos pacientes. Todos estos datos muestran que un conocimiento más profundo sobre la enfermedad y los mecanismos celulares involucrados revertirían potencialmente no sólo en el diagnóstico, opción terapéutica y calidad de vida de estos pacientes sino que tendrían un extraordinario impacto económico. En muchos de estos pacientes, la opción terapéutica más aconsejable es la extirpación quirúrgica del foco epileptógeno, consiguiéndose entre un 70 y 90% de resultados satisfactorios (Sola y col., 2005; Pastor y col., 2005). Por tanto, el estudio del tejido extirpado en estos pacientes representa una oportunidad inigualable de profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados

Aunque bien es cierto que, aún hoy día el conocimiento de los mecanismos implicados en la epileptogénesis no son bien conocidos, se sabe sin embargo que la rotura de la barrera hematoencefálica está asociada a la



aparición de epilepsia focal (Herman, 2002; Oby y Janigro, 2006; van Vliet y col., 2007). En concreto la extravasación de albúmina desde el torrente sanguíneo por la rotura de la BHE, así como el efecto que dicha albúmina tiene sobre los astrocitos, hacen que sea interesante estudiar qué mecanismos hacen que la albúmina tenga ese efecto sobre los astrocitos. Células con una característica muy importante, que no es otra que la de haber sido obtenidos de tejido cerebral resecado de pacientes epilépticos sometidos a cirugía, representando un recurso muy valioso para el estudio de los mecanismos relacionados con la aparición de la epilepsia focal humana.

El presente trabajo tiene por objetivo principal estudiar el efecto de la albúmina sérica sobre los astrocitos procedentes de piezas quirúrgicas resecaadas de la corteza temporal de pacientes epilépticos sometidos a cirugía. Para ellos nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos sometidos a cirugía.
2. Estudio de la modificación, mediada por la aplicación de albúmina, en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos en cultivo.
  - 2.1. Efecto de la albúmina sobre el transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de los astrocitos.
  - 2.2. Estudio de la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los distintos reservorios intracelulares.
  - 2.3. Efecto de la albúmina sobre la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  entre astrocitos.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

3. Estudio del efecto mediado por la aplicación a largo plazo de albúmina sérica, sobre la síntesis de ADN en los astrocitos en cultivo.

3.1. Estudio de los posibles mecanismos de internalización de la albúmina sérica y su relación con la síntesis de ADN en astrocitos en cultivo.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. PACIENTES**

Las piezas de tejido humano resecaadas durante la intervención quirúrgica fueron obtenidas de 20 pacientes (11 mujeres y 9 hombres), a los que se les diagnosticó epilepsia intratable del lóbulo temporal. La edad media de los pacientes era de  $33.8 \pm 3,44$  años para hombres y  $36.2 \pm 2,4$  años para mujeres, con un historial de epilepsia de  $24.4 \pm 5.1$  años y  $24,2 \pm 4.32$  años respectivamente (ver tabla I).

Estos pacientes fueron estudiados según el protocolo habitual de la Unidad de Cirugía de la Epilepsia (UCE) del Hospital Universitario de La Princesa (Sola y col., 2005; Pastor y col., 2005) y fueron evaluados usando las siguiente pruebas prequirúrgicas:

- EEG de superficie (“scalp”) de 19 canales siguiendo el sistema internacional 10-20 (Pastor y col., 2008; Herrera-Peco y col., 2010).
- Tomografía simple por emisión de fotón único (SPECT) interictal, usando  $^{99m}\text{Tc}$ -HmPAO (Pastor y col., 2008; Herrera-Peco y col., 2010)..
- Resonancia magnética de 1.5 Teslas (Pastor y col., 2008; Herrera-Peco y col., 2010).

Paciente	Sexo	Edad (años)	Historial (años)	Crisis	SPECT	RM	v-EEG	Cirugía/ Engel
1	V	24	23	Parcial compleja	Izq-T mesial	Hemangioma lateral Dch	Dch-T mesial	Dch RTMA/I
2	V	43	40	Parcial compleja	Izq-T mesial	EM Izq	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
3	M	35	33	Parcial compleja	Izq-T mesial	EM Izq	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
4	V	25	9	Parcial simple	Izq-T mesial	EM Izq	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
5	V	22	5	Secund. General.	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
6	V	38	37	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
7	M	27	19	Parcial compleja	Izq-F-P	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
8	V	30	11	Parcial compleja	Bi-T (Izq>Dch)	EM Izq	Bi-T (I>D)	Izq RTMA/IV
9	M	48	7	Parcial compleja	Izq-T mesial	EM Izq	Dch-T mesial	Izq RTMA/I
10	M	36	35	Parcial compleja	Dch-T mesial	EM Izq	Izq-T mesial	Dch RTMA/I
11	M	32	31	Parcial compleja	Dch-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
12	M	30	21	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Dch RTMA/I
13	M	52	49	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
14	V	51	40	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Dch RTMA/I
15	M	37	6	Secund. General.	Izq-T mesial	Normal	Dch-T mesial	Dch RTMA/I
16	M	30	10	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
17	V	34	26	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
18	V	28	27	Parcial compleja	Izq-T mesial	Normal	Dch-T mesial	Dch RTMA/I
19	M	41	40	Secund. General.	Izq-T mesial	EM Izq	Izq-T mesial	Izq RTMA/I
20	M	30	15	Parcial simple	Izq-T mesial	Normal	Izq-T mesial	Izq RTMA/I

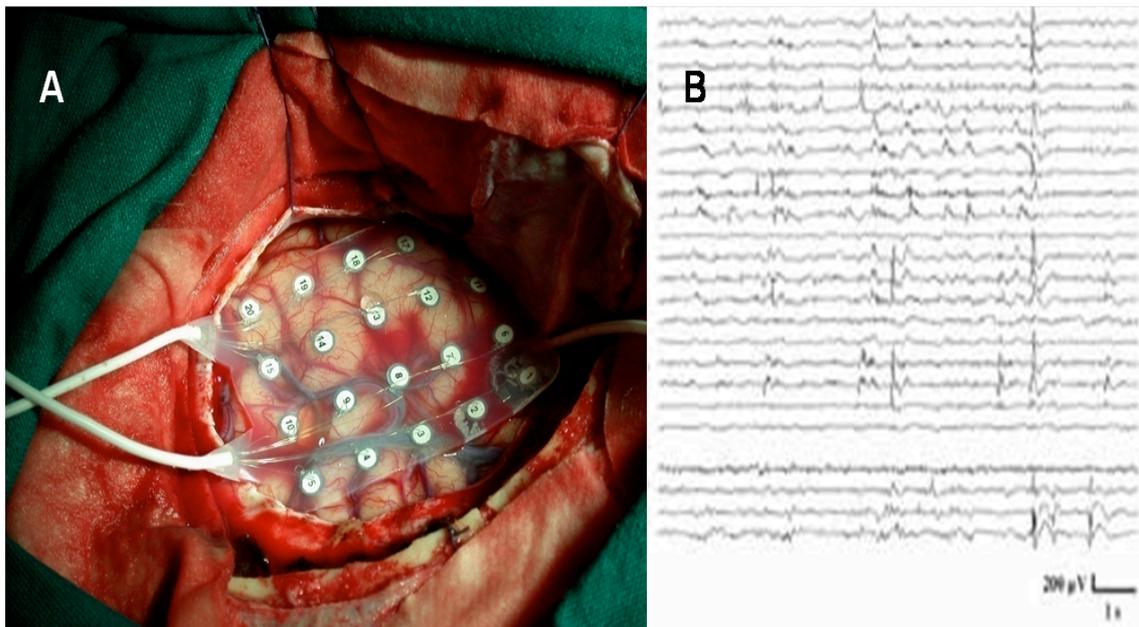
**Tabla 1.** Datos clínicos y epidemiológicos de la muestra de pacientes estudiados. Donde vemos que, Dch: derecho; EM: esclerosis mesial; F: lóbulo frontal; Izq: izquierdo; T: lóbulo temporal; Bi-T: Bi-temporal; P: lóbulo parietal; RTMA: Resección Temporal Mesial Anterior. El grado Engel proporcionado para cada paciente se obtiene de un seguimiento igual o superior a un año. Su valor va de I a IV, donde los pacientes con grado I se encuentran prácticamente libres de crisis y con grado IV pueden llegar a padecer varias crisis diarias.



- Videoelectroencefalografía (video-EEG) de 19 canales en scalp siguiendo el sistema internacional 10-20, complementado con electrodos de foramen oval (EFO) (Wieser y col., 2001; Herrera-Peco y col., 2011)

Además de estas pruebas prequirúrgicas se realizó una evaluación neuropsicológica de cada paciente que fue llevada a cabo por el servicio de Psiquiatría del Hospital Universitario de La Princesa. Las operaciones de lobectomía fueron realizadas por el Dr. García de Sola (Hospital de La Princesa).

La región epileptógena incluye la zona irritativa, que se definió según la clasificación de Lüders de 1993 como el área en la cual aparecían las descargas epileptógenas interictales y podía incluir o no la zona de inicio ictal. A la hora de identificar esta región epileptógena se definió en primer lugar de forma prequirúrgica de acuerdo con la región dónde aparecieron las crisis según el v-EEG + EFO. Ya de forma intraoperatoria, la localización específica de las regiones que presentaban actividad irritativa fue realizada por un especialista en neurofisiología clínica, los registros fueron obtenidos de forma intraoperatoria mediante la colocación de una manta de 20 electrodos, subdurales, sobre la superficie del lóbulo temporal (ver figura 12). La manta de electrodos es colocada sobre la corteza temporal lateral, con el borde paralelo a la fisura de Silvio y cubriendo el giro T1-T3. La orientación de la manta de electrodos, ya sea paralela o perpendicular al eje antero-posterior del lóbulo temporal, será diferente entre los distintos pacientes debido a las necesidades



**Figura 12.** Registro electrocortigráfico (ECoG) durante una de las resecciones: A) Localización de una manta de 20 electrodos sobre la región temporal lateral. La flecha muestra el conductor de la tira de cuatro electrodos situada en la región mesial; B) Actividad bioeléctrica registrada que muestra la presencia de grandes puntas en la región lateral (1-20) y de puntas-onda en la región mesial (1-4).

de la cirugía (el tamaño de la craneotomía, localización de vasos sanguíneos, etc.). Según el registro ECoG se definen en la región temporal lateral dos regiones funcionalmente diferentes para la obtención de cultivo: zonas con actividad irritativa (denominadas spk, por spiking), denotada por la presencia significativa de puntas, ondas agudas, polipuntas o cualquier combinación de ellas (> 5 elementos/minuto) y zonas sin actividad patológica significativa, que podemos considerar como “normal” caracterizadas por la ausencia de grafoelementos

irritativos o lesivos (actividad delta/theta) que denominamos no-spk (por non-spiking).



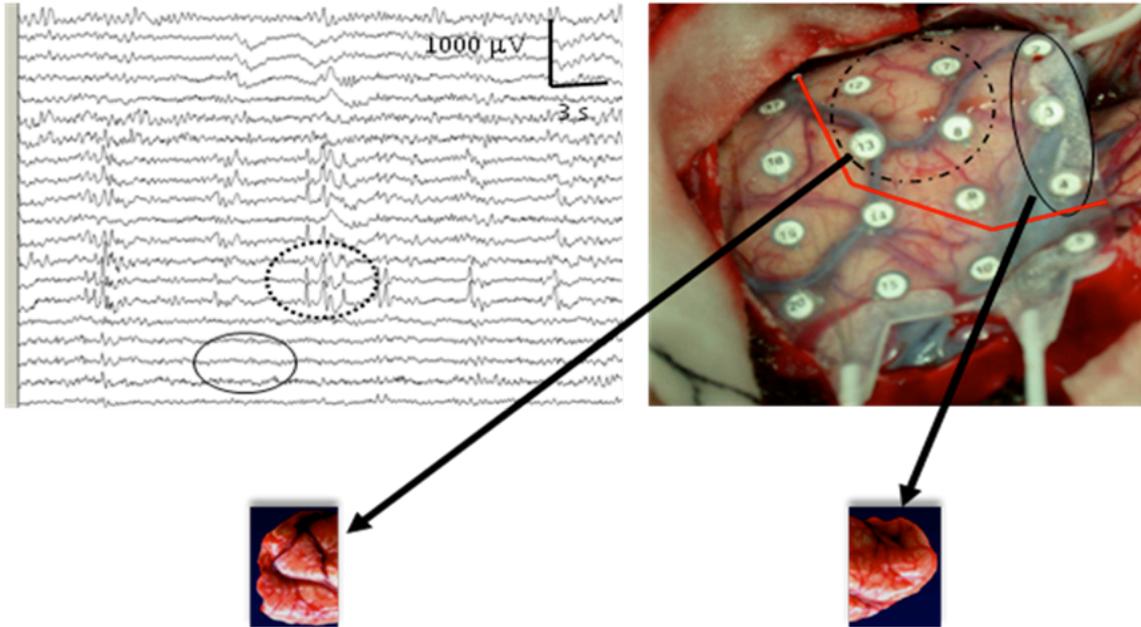
## Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes

Todos los protocolos usados en este estudio fueron aprobados por el comité ético para la investigación con seres humanos del Hospital Universitario de La Princesa, y el consentimiento informado fue presentado y firmado por todos los pacientes.

## 2. CULTIVOS CELULARES

Los experimentos que aparecen reflejados en el presente trabajo han sido realizados en astrocitos humanos obtenidos mediante la realización de un cultivo primario, usando el protocolo descrito por Vreugdenhil y colaboradores de 2004 con algunas modificaciones.

Se obtuvo una pieza de tejido cerebral procedentes del giro temporal medial, de unos 3 gramos de peso (figura 13), ésta pieza quirúrgica fue introducida en una solución de disociación previamente oxigenada, cuya composición en mM es; 120 NaCl, 10 HEPES, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2 y D-glucosa 25, con un pH 7. La pieza de tejido es cortada en pequeños trozos y después se introducen en una solución con estéril, a 4°C, por filtración que contiene tripsina XI (1 mg/ml). Tras el disociado enzimático de 1 hora de duración a una temperatura de 32°C, se realizará el disociado mecánico del tejido. Éste se realiza usando pipetas Pasteur de vidrio de distintos diámetros en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 25 mM de HEPES y 25 mM de D-glucosa (Cano-Abad y col., 2011).



**Figura 13.** En esta figura puede observarse un ejemplo tipo de la pieza quirúrgica extraída, en concreto se obtienen dos piezas correspondientes a dos zonas diferenciadas. Para la este proceso de diferenciación de zonas se utiliza la electrocorticografía (ECoG) que consiste en el registro de la actividad bioeléctrica de la corteza cerebral mediante mantas de electrodos situadas directamente sobre la misma. El objetivo de esta técnica es el de obtener una identificación de las regiones irritativas que deben ser resecaadas. La presencia de estas regiones se indica por la existencia de puntas epileptógenas, como las indicadas en la región punteada (denominada spk). En el mismo registro se pueden observar áreas con características bioeléctricas dentro de la normalidad (área de línea continua denominada no-spk) estas regiones marcan la región que debe ser resecaada (línea continua roja) La identificación de ambas regiones funcionalmente distintas dentro de la pieza resecaada permite la selección del tejido que se va a cultivar con una gran certeza.

La suspensión celular es centrifugada y el pellet será re-suspendido en medio de cultivo Neurobasal A (complementado con L-Glutamina 0.5 mM, estreptomicina/penicilina 5 µg/ml, 10% de HS). Las células son sembradas en botellas de cultivo (Nunc), e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas 6 horas se añade medio de cultivo a



una temperatura de 4°C, para eliminar las neuronas. Pasadas 12 horas, se procede a realizar una agitación suave de la botella de cultivo para eliminar la mayor cantidad posible de microglía y oligodendrocitos, se retirará la mitad del medio de cultivo, cambiándolo por medio fresco. Las células son cultivadas aproximadamente 3-4 semanas, en ese momento son levantadas usando 0,25%/volumen de tripsina y EDTA (1mM), los astrocitos se resuspenden en medio de cultivo fresco. Las células utilizadas en los experimentos del presente trabajo fueron sembradas en placas de 24 pocillos, con una densidad de  $10^4$  células por cubreobjetos de 13 mm recubiertos de poli-L-lisina. El medio de cultivo fue reemplazado 2 veces a la semana.

### **3. MEDIDAS DE LA CONCENTRACIÓN DE $Ca^{2+}$**

Para la realización las medidas de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el interior celular, se procedía a realizar los diferentes procesos; i) carga con la sonda fluorescente Fura2-AM y ii) utilización de constructos de pericam dirigidos a la mitocondria y al núcleo.

Las sondas fluorescentes son detectadas con la ayuda del microscopio de fluorescencia. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra



atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

Encontramos varios elementos que son básicos en un microscopio de fluorescencia;

- i. Filtro de excitación, deja pasar la luz de la longitud de onda incidente.
- ii. Espejo dicróico, que posee la capacidad de reflejar o dejar pasar la luz de determinadas longitudes de onda.
- iii. Filtro de emisión, selecciona la luz de longitud de onda fluorescente.

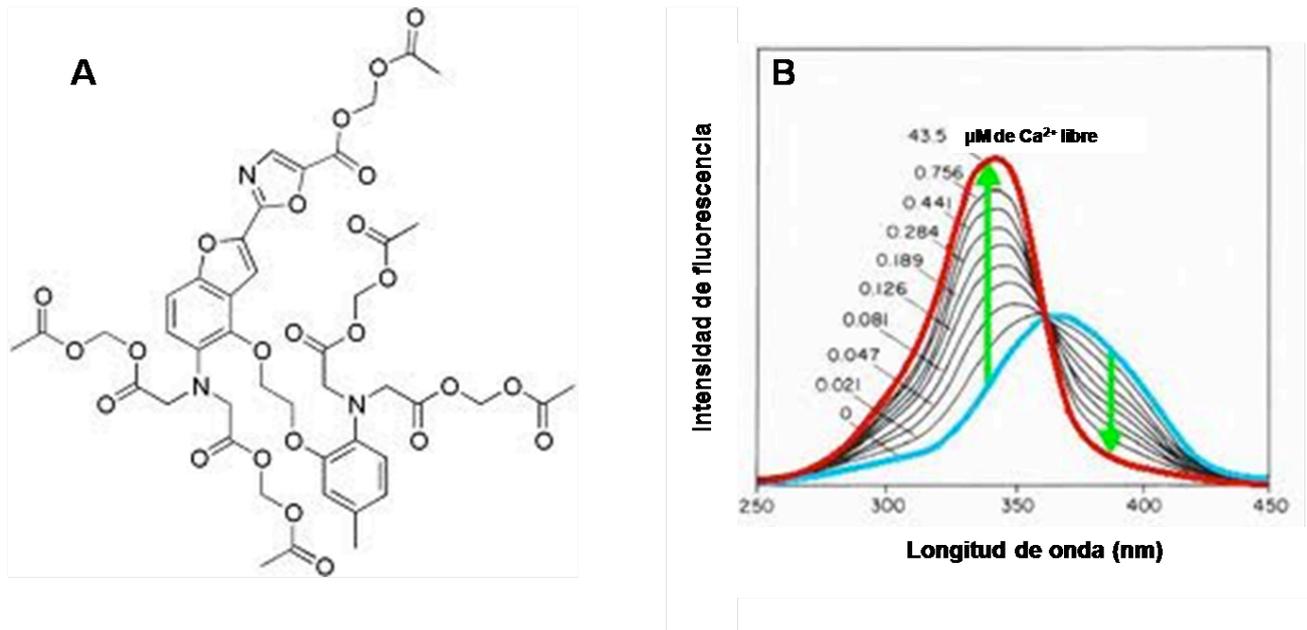
En estos experimentos se utilizó un microscopio de fluorescencia modelo BX51WI de Olympus, con un objetivo de inmersión en agua (LUMPlanFI 60X/0.90 W; Olympus, JAPAN). Microscopio al que se le adaptó una cámara Warner de pequeño volumen, modelo JG-23W/LP, que resulta ideal para el intercambio de soluciones. Esta cámara tiene la capacidad de propiciar un rápido intercambio de soluciones y una distancia de trabajo menor.

El flujo de entrada de las distintas soluciones en esta cámara Warner se realizó mediante una bomba peristáltica de flujo continuo, modelo DINKO D21F.

Los experimentos fueron realizados a una temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **3.1. USO DE SONDA FLUORESCENTE FURA2-AM**

La sonda fluorescente Fura2-AM o Fura 2-acetoximetilester (ver figura 14). Esta sonda fluorescente atraviesa las membranas celulares ya que los grupos acetoximetilos dan derivados lipofílicos que cruzan la membrana plasmática. Una vez dentro de las células, las esterasas presentes en el citosol de la célula



**Figura 14.** A) Estructura de la sonda fluorescente FURA 2-AM. B) Espectro de excitación de la sonda fluorescente FURA 2-AM, en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

eliminan los grupos acetoximetilester de modo que regenerarán el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2 AM.

Este compuesto posee una selectividad al  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto al  $\text{Mg}^{2+}$  de 10:1, característica importante ya que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre en el citosol de la célula es de aproximadamente 1mM, mientras que la de  $\text{Ca}^{2+}$  es de 100 nM.

Cuando el Fura-2 entra en contacto con  $\text{Ca}^{2+}$ , se produce un desplazamiento en su espectro de excitación. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  esta sonda tiene un máximo espectro de excitación de 380 nm, mientras que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es de 340 nm, esto se observa porque cuando existe un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior celular se da un aumento de la fluorescencia cuando se emite a 340 nm y un descenso en la fluorescencia cuando se emite a 380 nm.

Cuando el Fura2 se une al  $\text{Ca}^{2+}$  se produce una variación en las amplitudes de los picos de excitación, las de emisión y en la longitud de onda, lo que permite



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

calcular la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la razón de las amplitudes del par de longitudes de onda de excitación. Esta razón de amplitudes permite eliminar el error que pueda introducirse por variaciones en la concentración intracelular del indicador, intensidad total de la iluminación, etc.

El uso de esta sonda fluorescente representa un método óptico de medición de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la célula, requiriendo concentraciones muy bajas de la sonda para realizar estas mediciones de tal modo que el posible efecto tampón sobre el transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula se ve disminuido. Además permite realizar mediciones en menor tiempo y con menor volumen de tejido.

En cuanto al protocolo seguido con los astrocitos en cultivo, éstos fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente  $10^4$  células por cubreobjetos de 13 mm recubiertos de poli-L-lisina, pasadas unos 21 días aproximadamente desde la realización del cultivo primario, fueron incubados en una solución cuya composición es la siguiente; sonda fluorescente Fura-2 AM (a una concentración de  $1 \mu\text{M}$ ), ácido plurónico (0.05% del volumen total) y probenecid (1 mM/ml), disueltos en la solución Krebs-HEPES (pH 7,4). Esta solución de Krebs-HEPES contiene, en mM: NaCl 145, KCl 5,9 ,  $\text{MgCl}_2$  1,2 ,  $\text{CaCl}_2$  2,5 , HEPES 10, glucosa 10. La carga de los astrocitos se realiza durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Las células fueron lavadas con Krebs-HEPES fresco 5 minutos antes del experimento.



La luz de excitación emitía a una longitud de onda de 340 nm, filtro 340AF15EX 548-0410, y de 380 nm, con un filtro de 380AF15EX 547-0411.

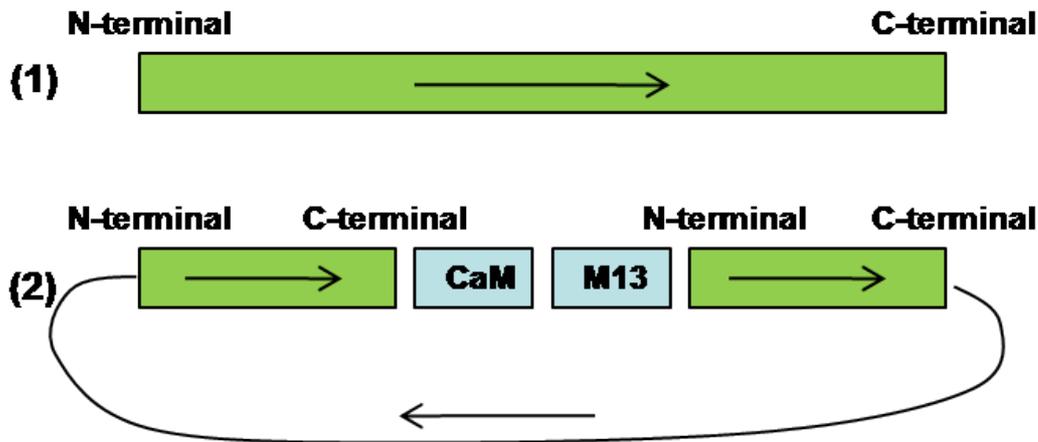
Las células fueron iluminadas alternativamente con unas longitudes de onda de 340 y 380 nanómetros y la luz emitida a una longitud de onda de 520 nanómetros fue procesada por el software Cell-R®, suministrado por Olympus®, denominado 2.6. Dicroico divisor de haz UM2FUR.

Las imágenes fueron adquiridas usando una cámara CCD, Sony, Japón.

Los cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  fueron calculados utilizando el cociente entre la fluorescencia a 340nm y la fluorescencia a 380 nm (F340/F380). El dato medio fue normalizado utilizando para ello el valor obtenido de calcular la media de los valores basales de fluorescencia de los primeros 3 minutos de cada experimento. Después, esos valores basales fueron sustraídos en el análisis consiguiente.

### **3.2. UTILIZACIÓN DE CONSTRUCTOS DE PERICAM DIRIGIDOS A LA MITOCONDRIA Y AL NÚCLEO.**

Para estudiar las variaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria y el núcleo de los astrocitos en cultivo. Se utilizaron los constructos dirigidos a las dianas comentadas anteriormente, denominados pericam ratiométricos (RT pericam).



**Figura 15.** Construcción del pericam. Las flechas indican el sentido de la transcripción. (1) Es la GFP en estado nativo. (2) Es la GFP permutada, CaM es la calmodulina.

Los pericam son indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  derivados de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein) que tienen un tamaño pequeño de 12 kDa. Los extremos C y N de la GFP original, son conectados mediante un linker a los nuevos extremos C y N que son generados en medio de lo que era la secuencia original de la GFP. La calmodulina y el péptido M13 se conectan con el nuevo extremo C-terminal y N-terminal, respectivamente (Nagai y col., 2001) (ver figura 15).

Al poder ser expresados en organelas específicas, los astrocitos permiten medir los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una de las variedades es el llamado pericam ratiométrico, cuyo espectro de excitación varía en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de tal manera que resulta posible hacer medidas ratiométricas de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Las medidas se realizarán excitando sucesivamente a los astrocitos con luces con una longitud de onda de excitación de 415 y 490 nm, mientras que la longitud de onda de emisión es de 535 nm.

Los constructos de RT pericam dirigidos a la mitocondria y al núcleo fueron amablemente cedidos por el Dr. Pozzan.

Para la introducción de los constructos en los astrocitos, se utilizó un agente de transfección llamado Lipofectamina (Invitrogen). Para el proceso de transfección deben prepararse dos soluciones diferenciadas:

1. Solución A; compuesta por 1.25 µg de ADN (plásmido dirigido a mitocondria o núcleo) y medio de cultivo (48.75 µl).
2. Solución B; Lipofectamina (6 µl) y medio de cultivo (44 µl).

Se mezclan ambas soluciones y se añade el medio de cultivo hasta llegar a un volumen de 500 µl. Se retira el medio de cultivo anterior y se añade la solución resultante al pocillo donde se sembraron los astrocitos. A continuación se incuban las células a 37°C durante 6 horas en un incubador de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 6 horas se procede a retirar el medio de cultivo con la solución de transfección y se añade medio de cultivo fresco.

Se introducen los vectores en los astrocitos en cultivo y pasadas unas 48-72 horas desde la transfección se procede a realizar los experimentos.

## **4. EXPERIMENTOS DE SÍNTESIS DE ADN**

Los astrocitos fueron sembrados sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina, creciendo hasta alcanzar el 50% de confluencia. En ese momento



fueron expuestos a 24 horas de medio sin SBF para inhibir la división celular, a continuación se conformaron los distintos grupos del experimento, en todos ellos se complementó con 10  $\mu$ M de bromodeoxyuridina (BrdU):

- Medio sin SBF
- Medio con 10% de SBF.
- Grupos con SBF y las diferentes concentraciones de Albúmina (entre 1 mg/ml y 40 mg/ml).
- Grupo con SBF, Albúmina (20 mg/ml) y un inhibidor específico para al TGF- $\beta$ .
- Grupo con SBF, Albúmina (20 mg/ml) y un inhibidor específico para la Megalina.
- Grupo con SBF, Albúmina (20 mg/ml), un inhibidor específico para al TGF- $\beta$  y un inhibidor específico para la Megalina.

Todos los grupos fueron mantenidos de este modo durante 24 horas (Nadal y col., 1995).

## **5. INMUNOTINCIÓN**

Se realizaron experimentos de inmunotinción con anticuerpos primarios y secundarios marcados por fluoróforos siguiendo el método utilizado por Alés y colaboradores (Alés y col., 2000).

Dentro de este apartado se deben diferenciar dos tipos de inmunotinciones, aquellas realizadas con el objetivo de evaluar el procedimiento de cultivo

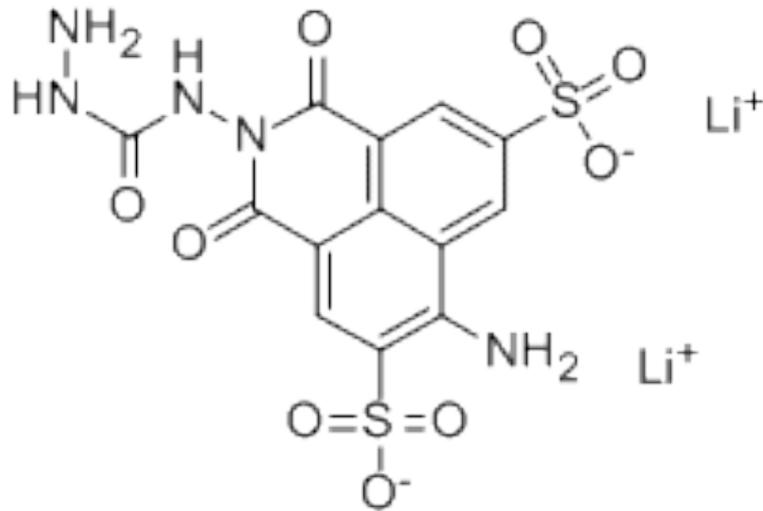


celular y aquellas tinciones realizadas con el objetivo de estudiar la síntesis de ADN en los astrocitos.

En cuanto al primer tipo de tinciones inmunocitoquímicas, las células fueron lavadas utilizando PBS para a continuación ser fijadas utilizando paraformaldehído al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizó durante 15 minutos utilizando el agente denominado Tritón X-100 al 0,1%. Tras este proceso se procedió a la incubación durante 1 hora de los anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma-Aldrich, 1:100) y anti-NeuN (Chemicon International, 1:100). Estos anticuerpos primarios permiten, en el primer caso un marcaje específico de la proteína gliofibrilar ácida de astrocitos, y el anticuerpo anti-NeuN permite un marcaje de una proteína nuclear de neurona. Después se procede a la incubación de los anticuerpos secundarios, ALEXA Fluor® 488 y ALEXA Fluor® 594 (ambos de Molecular Probes, 1:500), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras con PBS, éstas son montadas para su visualización, utilizando el agente denominado Moviol de DakoCytomation.

Se siguió el mismo proceso pero utilizando los anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma-Aldrich, 1:100) y anti-MAB1580 (Chemicon International, 1:100). El anticuerpo anti-MAB1580 permite un marcaje específico de los oligodendrocitos, tanto tempranos como maduros.

En cuanto al segundo tipo de tinciones inmunocitoquímicas realizadas. El protocolo para la realización de inmunotinciones después de realizar los



**Figura 16.** Estructura química del colorante fluorescente amarillo lucifer. Es una sal de litio. La longitud de onda de excitación es de 380 nm y la longitud de onda en la que se da la máxima emisión de este colorante fluorescente es de 520 nm.

experimentos de síntesis de ADN, es el que se expone a continuación (Nadal y col., 1995). Las células fueron fijadas a continuación con paraformaldehído al 3.7% y posteriormente tratadas con ácido clorhídrico (HCl) a una concentración de 2 M durante 20 minutos, siendo éste neutralizado por la aplicación de 0,1 M de Borax. A continuación se permeabilizaron las células con 1% de Tritón X-100. Se incuban las células con anticuerpo primario anti-BrdU durante 2 horas (Merck, 1:45) en cámara húmeda. Posteriormente los astrocitos son incubados con el anticuerpo secundario ALEXA Fluor® 488 (Molecular Probes, 1:400). Todos los núcleos fueron marcados con 4',6-diamino-2-fenilindol (1 µg/ml). Los núcleos que presentan marcaje a la BrdU, o BrdU positivos, fueron expresados cómo porcentaje del total.



Se contabilizaron, al menos, 200 núcleos por cubreobjetos utilizando como mínimo 6 cubreobjetos por variable analizada. Se usaron los cultivos procedentes de al menos 5 pacientes distintos.

Las preparaciones fueron analizadas usando un microscopio confocal equipado con láser de argón, Leica AOBS, con un objetivo de inmersión planapo 63X/1,32.

## **6. COMPROBACIÓN DE PERMEABILIDAD DE LAS UNIONES TIPO COMUNICANTES**

La permeabilidad de las uniones comunicantes o gap junctions se determinó mediante la técnica descrita por Tabernero y colaboradores en 2001 (Tabernero y col., 2001). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se realizaron varios lavados con una solución a pH 7.2 con una composición en mM: NaCl 130, KCl 2.8, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1 y HEPES 10. Se incubaron los astrocitos, durante 10 minutos, con la solución utilizada para el último. Después se procedió a lavar los astrocitos varias veces con una solución cuya composición en mM: NaCl 130, KCl 2.8, MgCl<sub>2</sub> 1 y HEPES 10. Después del último lavado se procede a realizar una incubación con la anterior solución pero con el colorante fluorescente amarillo Lucifer a una concentración de 1 mg/ml durante 2 minutos. Durante estos 2 minutos se procede a realizar un corte aproximadamente en el centro del cubreobjetos, mediante bisturí, con el objetivo de romper la monocapa celular.



El anterior procedimiento permitirá que el colorante fluorescente, amarillo Lucifer, penetre en el interior de los astrocitos debido a que tras la ruptura de los astrocitos se inicia una rápida vesiculación de la membrana plasmática.

El realizar esta técnica con el colorante amarillo Lucifer se debe a que es una molécula de pequeño tamaño, 457 Daltons, de modo que es lo suficientemente pequeña como para difundir a través de las uniones comunicantes. Además posee otra cualidad imprescindible para este experimentos, que no es otra que la imposibilidad de difundir a través de la membrana plasmática (El-Fouly y col., 1987). De tal modo que una vez haya penetrado en el astrocito el colorante amarillo Lucifer difundirá hacia los astrocitos adyacentes sólo a través de las uniones comunicantes.

## **7. ANÁLISIS EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

El análisis de la expresión de proteínas por transferencia tipo Western se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Se realizó un lisado de los astrocitos en cultivo y para ello se utilizó un tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% DOC) en presencia de inhibidores de proteasas (“complete cocktail tablets”, Roche). Se incubaron los extractos 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a 13000xg en una microcentrífuga durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas y se conservaron a -80°C. La concentración se



determinó por el método de Lowry (BCA “protein Assay kit”, Pierce) usando BSA como referencia.

Para realizar la electroforesis se siguió un método ampliamente descrito (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles de acrilamida al 4% y al 12% para concentrar y separar las proteínas respectivamente. Cada carril se cargó con 50 µg de proteína total con tampón de carga de Laemmli (Glicerol 10%, SDS 10%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, azul de bromofenol). Como marcador de peso molecular se utilizó el SeeBlue®Plus2 Prestained Standard (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a lo largo de la noche a una membrana de nitrocelulosa (Roche), a un voltaje de 30 mV. Tras visualizar las proteínas transferidas en la membrana por tinción con rojo Ponceau de composición: 0,2% (p/v) rojo Ponceau, 3% (p/v) ácido tricloroacético, 3% (p/v) ácido sulfosalicílico). Se bloqueó la membrana con un 5% de leche desnatada en TBS-T (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH=7.2, 0,1% Tween 20) Las membranas se incubaron durante la noche en solución de bloqueo con los anticuerpos anti-megalina (Chemicon International, 1:1000), anti-receptor de TGF-β (abcam, 1:1000) y anti-β tubulina (Santa Cruz, 1:2500) Tras lavar tres veces con TBS-T, el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (Pierce) se incubó a una dilución 1:2500. Las membranas se revelaron con el método quimioluminiscente de Supersignal (Pierce). El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software Kodak Image Station 2000MM System.

Como control negativo una de las membranas fue sometida al mismo protocolo experimental, exceptuando la incubación con el anticuerpo primario.



## **8. SOLUCIONES Y REACTIVOS**

### **8.1. CULTIVOS CELULARES**

El medio de cultivo Neurobasal A, el DMEM, la L-Glutamina, la estreptomicina/penicilina y el suero bovino fetal, fueron obtenidos de Invitrogen (España).

El anticuerpo anti-NeuN y anti-MAB1580 fueron obtenidos de Calbiochem International (España). El anticuerpo anti-GFAP ha sido obtenido de Sigma Aldrich (España). Los anticuerpos secundarios fluorescentes ALEXA Fluor® 594 y ALEXA Fluor® 488, fueron obtenidos de Molecular Probes (España).

El agente de montaje Moviol fue adquirido a DakoCytomation.

### **8.2. EXPERIMENTOS DE FLUORESCENCIA**

La rianodina, 2-APB, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, la tripsina XI y la sonda fluorescente Fura-2 AM fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (España).

El agente transfectante Lipofectamina2000® fue adquirido a Invitrogen (España).



### **8.3. EXPERIMENTOS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

El anticuerpo anti-megalina fue adquirido a la empresa Chemicon International (España). El anticuerpo anti-receptor de TGF- $\beta$  fue adquirido a la empresa Abcam (España). El anticuerpo anti- $\beta$  tubulina fue adquirido a la empresa Santa Cruz (EEUU). El marcador de peso molecular, SeeBlue®Plus2 Prestained Standard, fue adquirido de Invitrogen (España).

El anestésico etomidato fue adquirido de Janssen-Cilag (España).

### **8.4. EXPERIMENTOS DE SÍNTESIS DE ADN**

El inhibidor específico para el receptor TGF- $\beta$  del subtipo I fue obtenido de Calbiochem (España). El anticuerpo anti-BrdU fue obtenido de Merck (España). Los anticuerpos secundarios fluorescentes ALEXA Fluor® 594 y ALEXA Fluor® 488, fueron obtenidos de Molecular Probes (España). El agente de montaje Moviol fue adquirido a DakoCytomation (España).

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos representativos son mostrados como la media más el error estándar. Los experimentos fueron realizados como mínimo por triplicado. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el análisis t de Student o ANOVA



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

(muestras paramétricas) o el test de Mann-Whitney (muestras no paramétricas). El análisis estadístico se realizó utilizando el software SigmaStat 3.5 (Point Richmond, USA).

Las diferencias entre grupos experimentales, se consideraron significativas con un valor  $p < 0.05$ .

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia, así como el conteo de los tipos celulares mostrados, fue realizado por el método de doble ciego con campos seleccionados al azar. Todos los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), salvo que se indique otra cosa.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

## **IV. RESULTADOS**

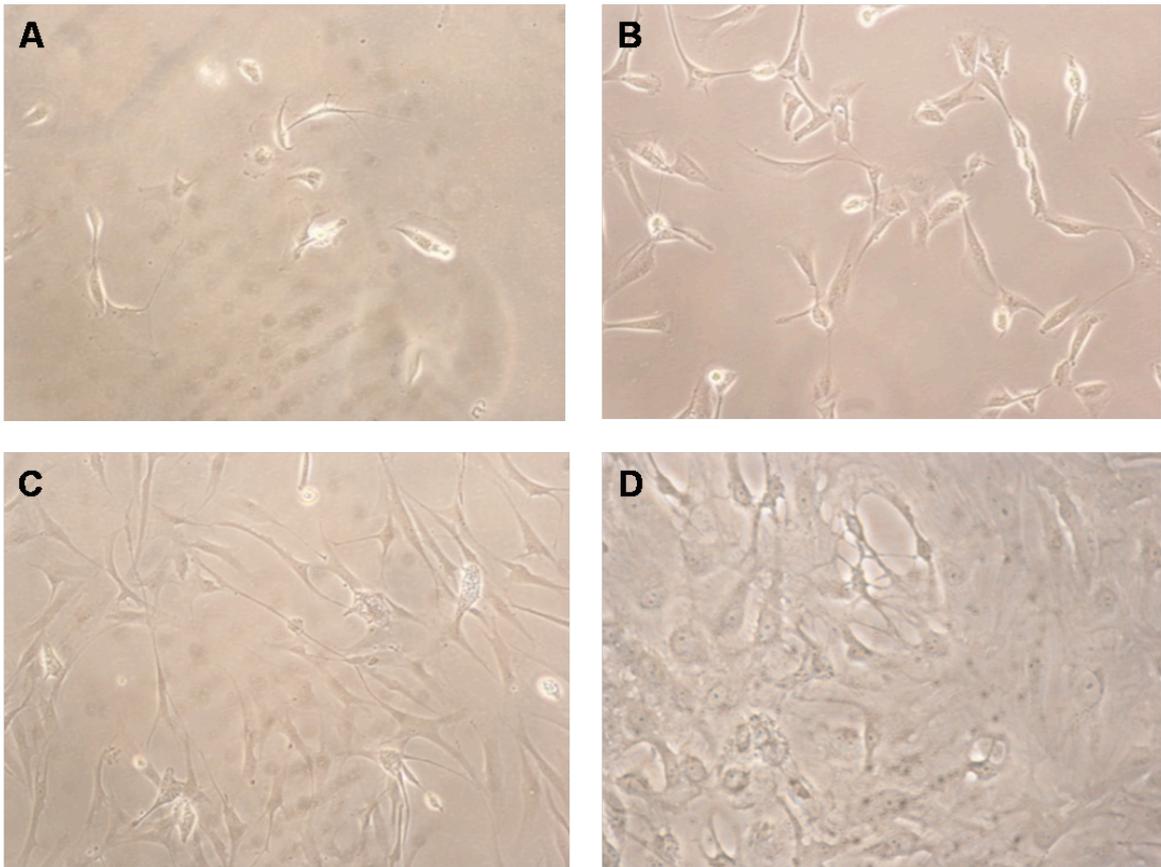


## **1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS**

Las células obtenidas del cultivo del tejido resecado de los pacientes sometidos a cirugía crecieron como un cultivo monocapa. Los cultivos primarios alcanzaron la confluencia entre la tercera y cuarta semana.

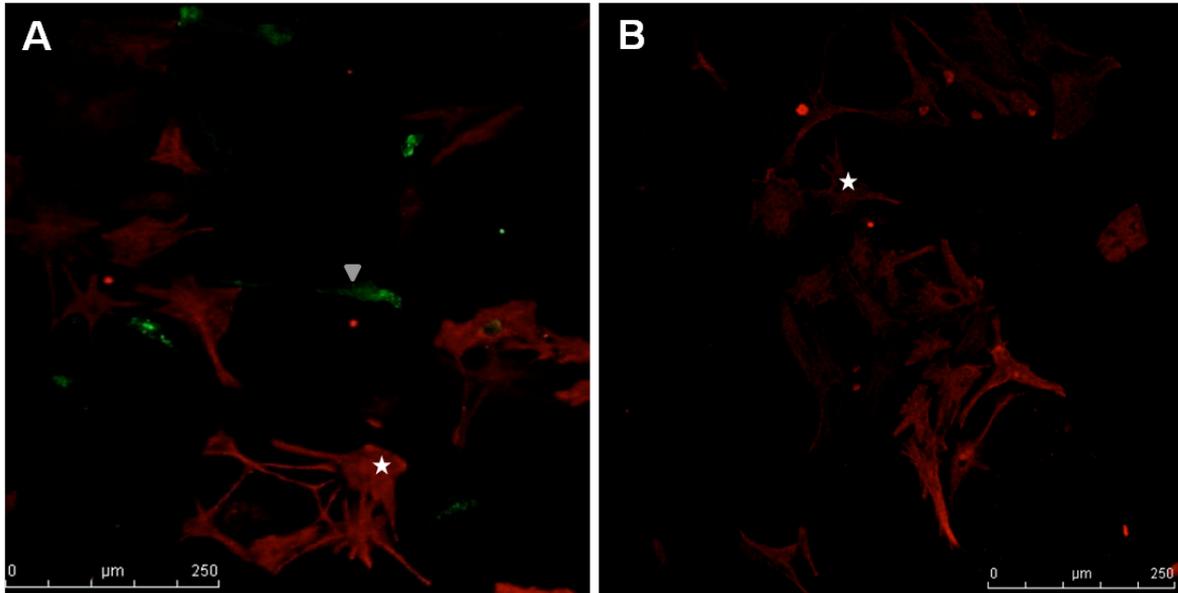
En la figura 17, pueden observarse imágenes representativas de los cultivos en diferentes momentos del cultivo esto es a los 7, 14, 21 y 28 días desde la realización del cultivo primario de astrocitos (figura 17 A-D, respectivamente).

En un principio las células en cultivo son pequeñas y redondeadas aunque durante los primeros 4 días comienzan a apreciarse ciertas diferencias morfológicas. Es importante destacar el que en el inicio las células en cultivo son morfológicamente heterogéneas, observándose células de pequeño tamaño, unipolares o bipolares, células con vacuolas en el soma celular, células con somas pequeños y multitud de prolongaciones. Estas diferencias morfológicas van disminuyendo hasta que los astrocitos en cultivo presentan un aspecto de células estrelladas más común a los astrocitos. Este mismo control se repitió para los cultivos realizados de las piezas quirúrgicas procedentes de la zona denominada "spk", y no se pudo observar ninguna diferencia morfológica entre los astrocitos en cultivo procedentes Cx "no-spk" frente a aquellos que procedían de la Cx spk.



**Figura 17.** *Análisis morfológico de cultivo primario de células gliales humanas. Imágenes representativas realizadas en luz transmitida, realizadas en; A) 7 días, B) 14 días, C) 21 días, y D) 30 días.*

Con el fin de determinar si los cultivos utilizados en el presente trabajo tenían una población celular mayoritaria de astrocitos, se procedió a realizar tinciones inmunocitoquímicas de los cultivos. Se procedió a aplicar un anticuerpo específico contra las proteínas específicas de astrocitos, como es la GFAP o gliofibrilar acidic protein, pero también se utilizó el marcaje específico de proteínas de núcleo de neuronas con el anticuerpo anti-NeuN (ver figura xxx, a y b). Así mismo se procedió a utilizar un anticuerpo contra oligodendrocitos,



**Figura 18.** Análisis de cultivo primario de células gliales humanas. Imágenes obtenidas mediante marcaje inmunológico. A) se puede observar el cultivo primario procedente del tejido humano resecado, sin haber sido realizadas las modificaciones pertinentes para reducir el número de neuronas. Los astrocitos aparecen marcados en rojo (\*), mientras que las neuronas aparecerán marcadas en verde (▼). B) Cultivo procedente de tejido humano resecado, siguiendo las modificaciones para eliminar las neuronas, observándose únicamente astrocitos.

anit-mab1580, para cuantificar el porcentaje de este tipo de células que aparecen en cultivo (datos no mostrados).

Después de la realización de las tinciones se puede observar que encontramos alrededor de un 80% de las células que se observan son astrocitos mientras que alrededor de un 15% son oligodendrocitos.

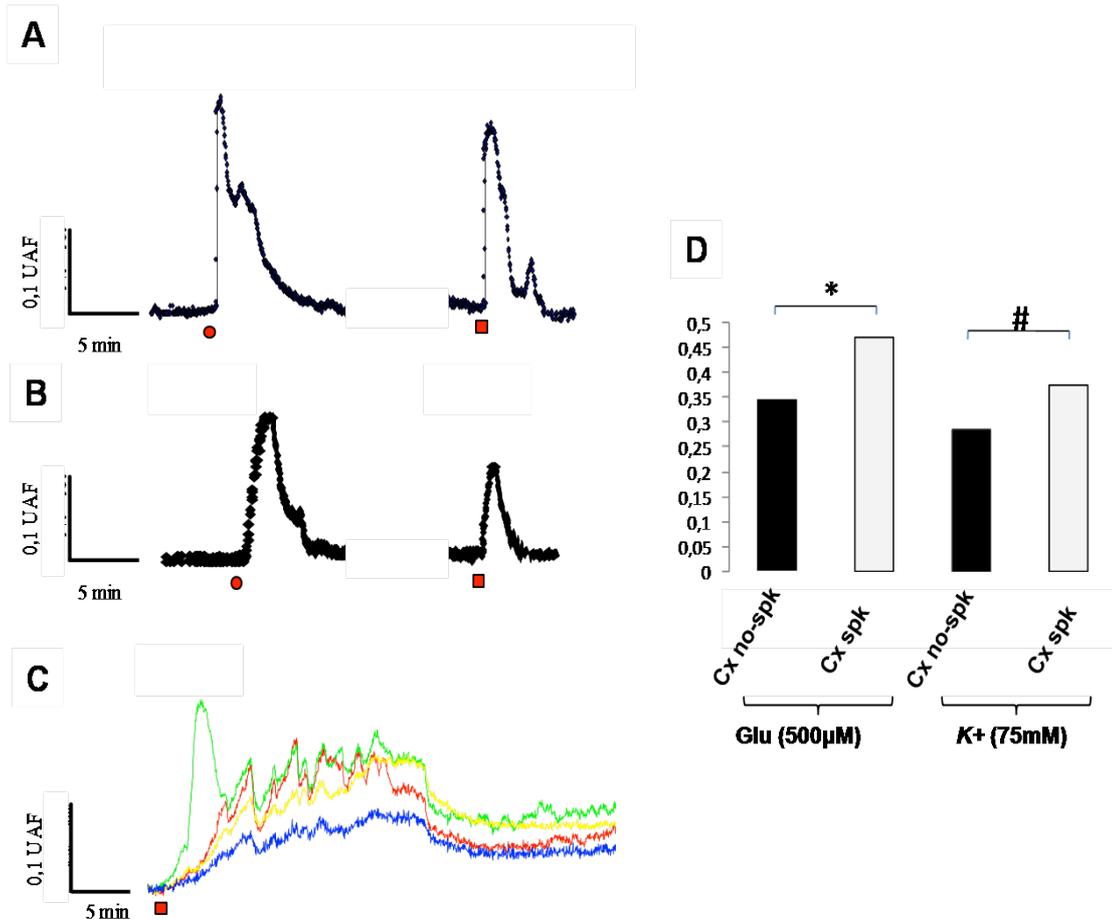
Por tanto parece que las modificaciones incluidas en este trabajo sobre el protocolo de cultivo propuesto por Cano-Abad y colaboradores en el 2011, son viables.



## **1.1 VIABILIDAD CELULAR DE LOS ASTROCITOS EN CULTIVO**

Una vez comprobado el hecho de que se estaba trabajando con un cultivo primario enriquecido en astrocitos humanos, se realizaron experimentos para controlar la viabilidad de dichos cultivos. Fueron experimentos sencillos, en los que se perfundían soluciones con alto contenido en  $K^+$  (75 mM) o bien con glutamato (glu 500  $\mu$ M) para comprobar la respuesta de las células en cultivo. En efecto, una concentración elevada de  $K^+$  extracelular debe modificar el potencial de reposo ( $E_m$ ) de los astrocitos, de acuerdo con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hodgkin y Katz, 1949). La aplicación de glu pretende comprobar la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de receptores glutamatérgicos que se sabe están presentes en estas células (Eid y col., 2008).

Como ya se ha indicado, resulta indispensable diferenciar aquellas muestras de tejido; con actividad irritativa y sin ella. En la figura 19-D se muestran los resultados obtenidos en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  en respuesta a los estímulos fisiológicos para ambos tipos de tejidos. Estos resultados muestran que, la aplicación de soluciones de alto  $K^+$  en los tejidos procedentes de Cx spk tiene un valor de  $0.36 \pm 0.06$  y para tejidos procedentes de Cx no-spk tiene un valor de  $0.28 \pm 0.04$ . Los valores obtenidos a la hora de aplicar glutamato (500  $\mu$ M) en los cultivos procedentes de Cx spk tiene un valor de  $0.47 \pm 0.08$  y para tejidos procedentes de Cx no-spk tiene un valor de  $0.34 \pm 0.05$ . Se observa que existe un mayor incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  en aquellos astrocitos



**Figura 19.** Comprobación de la viabilidad celular de los astrocitos en cultivo. Se utilizan para estos experimentos, los siguientes estímulos; K<sup>+</sup> (75mM), marcado en la figura como ■ y glutamato (500µM), marcado en la figura como ●. **A)** Se representa un registro obtenido de cultivos de astrocitos procedentes de tejido irritativo o spk. **B)** Se muestran registros obtenidos a partir de tejido identificado como no irritativo o no-spk. **C)** Se muestra un registro original donde después de un estímulo despolarizante se desencadenan oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>. Es interesante reseñar el hecho de que en algún experimento puntual realizado con células procedentes de tejido irritativo, se observen oscilaciones en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tras la aplicación de un estímulo despolarizante, en este caso 75mM de K<sup>+</sup>. **E)** Diferencia entre los picos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> al aplicar Glu- y soluciones de alto K<sup>+</sup> a astrocitos procedentes de corteza irritativa (barras grises) y no irritativa (barras negras) son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,001$  para el test t de Student). (n=20 en ambos casos).

procedentes de Cx spk para ambos estímulos, existe una diferencia con significancia estadística entre los grupos Cx spk y Cx no-spk. Al comparar los



dos estímulos utilizados, se observa en el glutamato provoca un mayor incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  en los astrocitos en cultivo que el potasio.

Es interesante reseñar el hecho de que en algún experimento aislado realizado con células procedentes de tejido irritativo, se observen oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_c$  tras la aplicación de un estímulo despolarizante, como es en este caso 75 mM de  $K^+$  (figura 19-C). Dichas oscilaciones tienen una duración de 15 minutos y al finalizar, dejan la línea basal más elevada que al comienzo del experimento. Aunque no se han estudiado de forma sistemática, estas oscilaciones no se han observado en aquellos astrocitos obtenidos de tejido no-spik.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA, EN ASTROCITOS EN CULTIVO, A LA ALBÚMINA**

### **2.1 RESPUESTA MEDIADA POR LA BSA FRENTE A LA MEDIADA POR HSA**

Como se ha comentado previamente, existen datos previos que muestran que la albúmina sérica bovina, BSA, producía un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol de astrocitos en cultivo procedentes de ratas neonatas. Con el objeto de comprobar si en el modelo celular utilizado en el presente trabajo también obteníamos resultados en esa línea, y basándose en datos facilitados



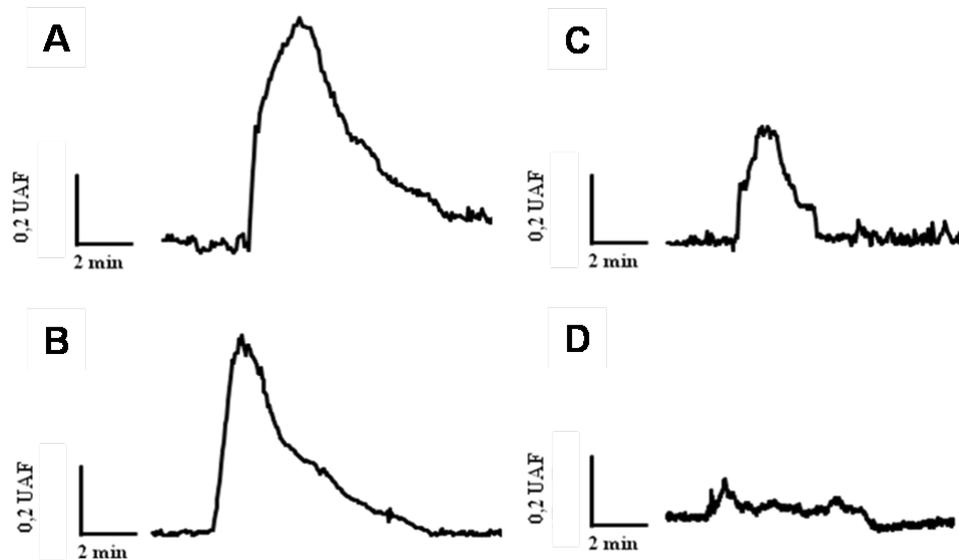
por anteriores investigadores como Nadal y col., 1995, se procedió a aplicar BSA 20 mg/ml .

Se comprobó que, efectivamente, existía una respuesta en cuanto a que se mediaba una variación en el transiente de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos. Se propuso comparar este efecto, mediado por la aplicación de BSA, con el que pudiera obtenerse de la aplicación de albúmina sérica humana (HSA, del inglés Human Serum Albumin). Como puede observarse en la figura 20 existe tanto para la BSA como para la HSA una respuesta muy semejante, tanto para la concentración de  $Ca^{2+}$  máxima alcanzada por los pulsos de 20 mg/ml como al calcular las áreas debajo de la curva que se obtienen al aplicar BSA o HSA. No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar las respuestas que median ambos tipos de estímulos.

### **2.1.1. Caracterización de la respuesta a HSA**

A continuación se planteó el que en trabajos anteriores se había demostrado que los astrocitos en cultivo procedentes de especies murinas, responden de manera dosis-dependiente a la aplicación de albúmina (Nadal y col., 1995), lo que planteó la pregunta de si esta misma situación se daba en los astrocitos en cultivo procedentes de tejido humano.

En base a la concentración de albúmina que se utilizó en trabajos anteriores, sobre astrocitos en cultivo procedentes de especies murinas, se aplicó HSA a una concentración de 20 mg/ml en los astrocitos en cultivo procedentes de



**Figura 21.** Diferentes tipos de respuestas tras la aplicación de HSA, 20 mg/ml, en los astrocitos en cultivo.

muestras de corteza obtenidas de pacientes epilépticos sometidos a cirugía, tanto de zonas "spk" como "no-spk". Se observó la aparición de distintos tipos de respuesta en cuanto al incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  (figura 21). Los transientes de  $Ca^{2+}$  fueron seguidos por una bajada hasta el nivel basal sin otros efectos (figura 21-A y 21-B), por oscilaciones una vez alcanzado el nivel basal (figura 21-C) o por oscilaciones ocurridas en una meseta (figura 21-D). De los 150 estudios realizados, la frecuencia con que se han podido observar estos distintos tipos de respuesta son:

- Las respuestas reseñadas en la figura 21-A apareció en un 34% de ocasiones



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

- Las respuestas reseñadas en la figura 21-B, apareció en un 46% de las ocasiones.
- Las respuestas reseñadas en la figura 21-C, apareció en un 14% de ocasiones.
- Las respuestas reseñadas en la figura 21-D, apareció en un 6% de ocasiones.

A continuación se realizan experimentos en los que se aplican dosis crecientes de HSA, entre 0.1 mg/dl y 80 mg/dl, durante periodos de 2 minutos, da lugar a incrementos de la  $[Ca^{2+}]_c$  dependientes del incremento en la concentración de albúmina aplicada (figura 22), de forma similar al modelo murino (Nadal y col., 1995).

A continuación se estudió la capacidad de respuesta de los astrocitos humanos en cultivo a concentraciones crecientes de albúmina. Para ello se aplicaron concentraciones crecientes de HSA entre 0,1 y 80 mg/dl durante periodos de 2 minutos. Como se puede observar en la figura 22, la HSA da lugar a un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  dosis-dependiente a concentraciones superiores a 1 mg/dl, mientras que la concentración de 0,1 mg/dl no ejerce ningún efecto apreciable sobre la movilización del  $Ca^{2+}$  en el citosol.

La respuesta obtenida para una concentración de 20 mg/dl induce un incremento del  $Ca^{2+}$  citosólico mayor que a 10 mg/ml y no mucho menor que la inducida por 40 mg/dl. Esto hizo que consideráramos adecuado el trabajar con dicha concentración.



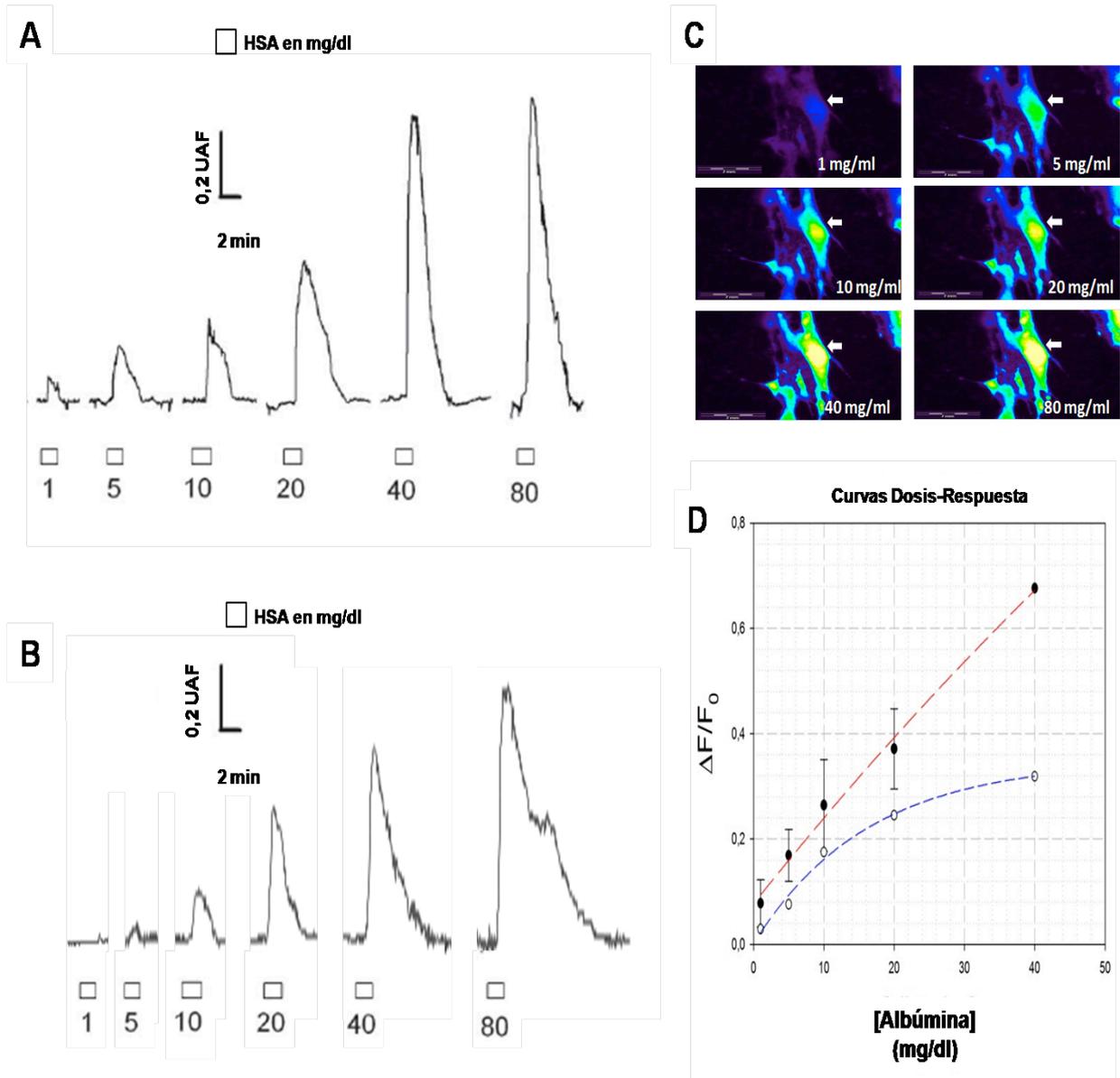
Por otro lado, se aplicaron varios pulsos consecutivos de HSA a los astrocitos en cultivo con el objetivo de estudiar la posible existencia de una desensibilización del sistema o alguna adaptación significativa de la respuesta observada. Como puede observarse en la figura 23, continúa observándose incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por la aplicación de pulsos de HSA, los valores obtenidos son:

- Estímulo 1 obtiene un valor medio de  $0,58 \pm 0,02$  UAF.
- Estímulo 2, obtiene un valor medio de  $0,55 \pm 0,1$  UAF.
- Estímulo 3, obtiene un valor medio de  $0,59 \pm 0,08$  UAF.

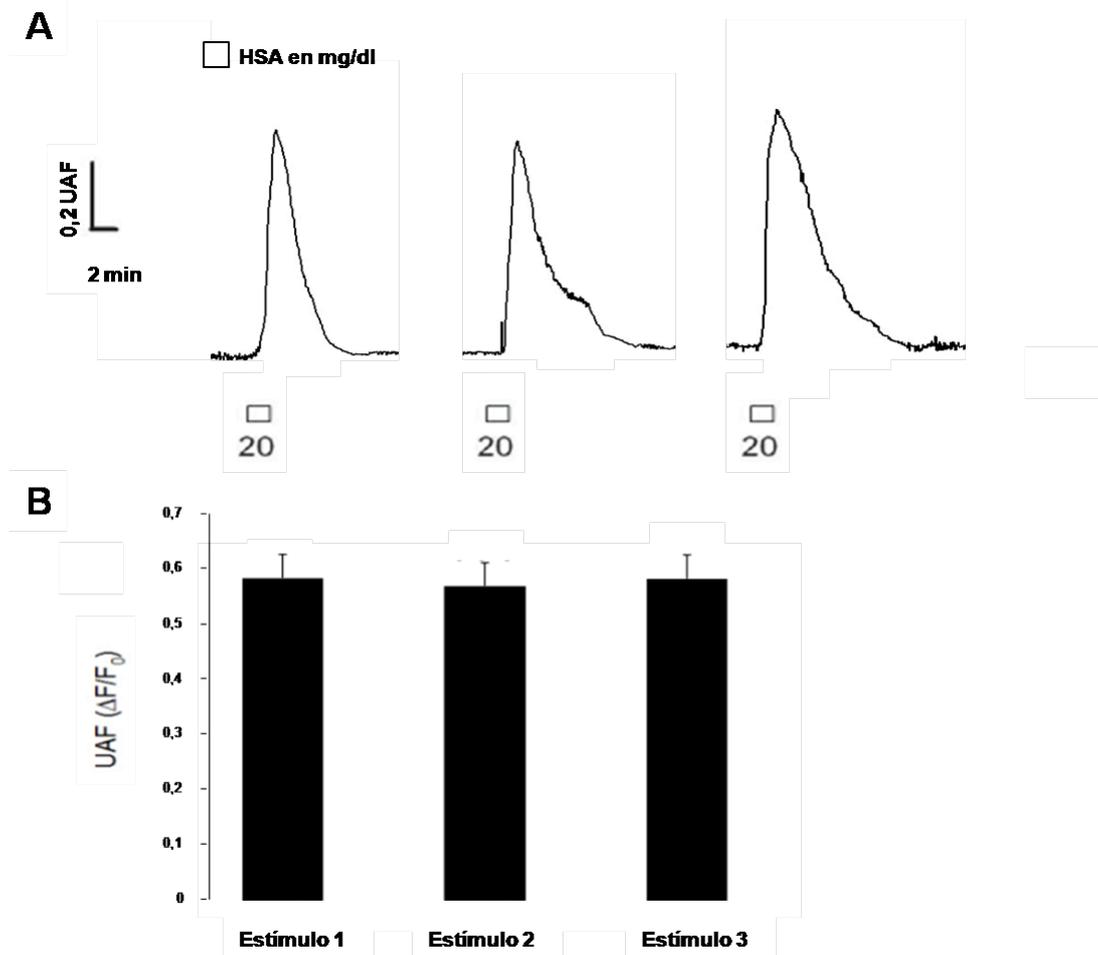
No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la respuesta mediada por los diferentes estímulos.

## **2.2 ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS RESPONSABLES DE LAS OSCILACIONES DEL $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR**

Resultados obtenidos en otros modelos animales demostraron que la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediada por la albúmina, se produce a partir de la liberación desde almacenes intracelulares (Nadal y col., 1997; Manning y col., 1997).



**Figura 22.** Registros originales que muestran la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_c$  a diferentes concentraciones de HSA. A) tanto en cultivos de astrocitos procedentes de foco no irritativo, B) como en cultivos procedentes de focos irritativos. En C) Se puede ver la respuesta de un astrocyto en cultivo a estímulos repetidos de HSA (20 mg/dl) de 2 minutos de duración. El periodo entre pulsos consecutivos fue de 6 y 9 min respectivamente. D) Curvas dosis-respuesta para astrocitos spk (círculos negros, n=16) y no-spk (círculos blancos, n=16). Las líneas discontinuas muestran funciones de regresión exponenciales.



**Figura 23.** Ausencia de sensibilización por la HSA. A) Incrementos de  $[Ca^{2+}]_c$  en respuesta a cuatro pulsos consecutivos de HSA (20 mg/dl) separados por intervalos de 9 minutos. B) No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos estímulos de HSA 20 mg/dl aplicados. (n=19)

Con el objetivo de estudiar los posibles mecanismos relacionados con este incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico mediado por la albúmina, se estudió en primer lugar la posibilidad de que dichos incrementos se debiesen a la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales de membrana.

Para ello, se procedió a realizar una serie de experimentos donde se perfundía una solución con una concentración de 0 mM de  $Ca^{2+}$  y EGTA 1 mM (quelante



de  $\text{Ca}^{2+}$ ). En estas condiciones experimentales se aplica glutamato ( $500\mu\text{M}$ ), para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE de los astrocitos, liberación que está mediada por los receptores metabotrópicos de glutamato que existen en la membrana del astrocito (Jensen & Chiu, 1991).

A la hora de proceder con la experimentación, en primer lugar y en presencia de la solución normal de trabajo, es decir con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 1 mM y en ausencia de EGTA, se procede a la aplicación del glutamato  $500\mu\text{M}$  observándose un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Ver figura 24-A). A continuación se cambia la solución de perfusión y se aplica una solución con 0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 1 mM de EGTA, pasados unos minutos se procede a introducir el estímulo de HSA (20 mg/dl) y se observa un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Pero al aplicar un segundo estímulo de HSA (20 mg/dl), pasados 7 minutos en presencia de la solución con 0 mM y EGTA 1 mM, en condiciones en las que no se ha podido rellenar los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  al no existir aporte externo de este ión, no eleva la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (ver figura 24-B).

Pasados 5 minutos desde ese último estímulo se introduce de nuevo una solución de trabajo que contiene 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y en estas nuevas condiciones se procede a aplicar un estímulo de glutamato ( $500\mu\text{M}$ ) y pasados 5 minutos un estímulo de HSA (20 mg/dl), en ambos casos se puede observar el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (ver figura 24-C).

Por tanto, una vez comprobado que el mecanismo por el que se produce el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, no es a través del paso por canales de la membrana, se procedió a estudiar la posibilidad de que la



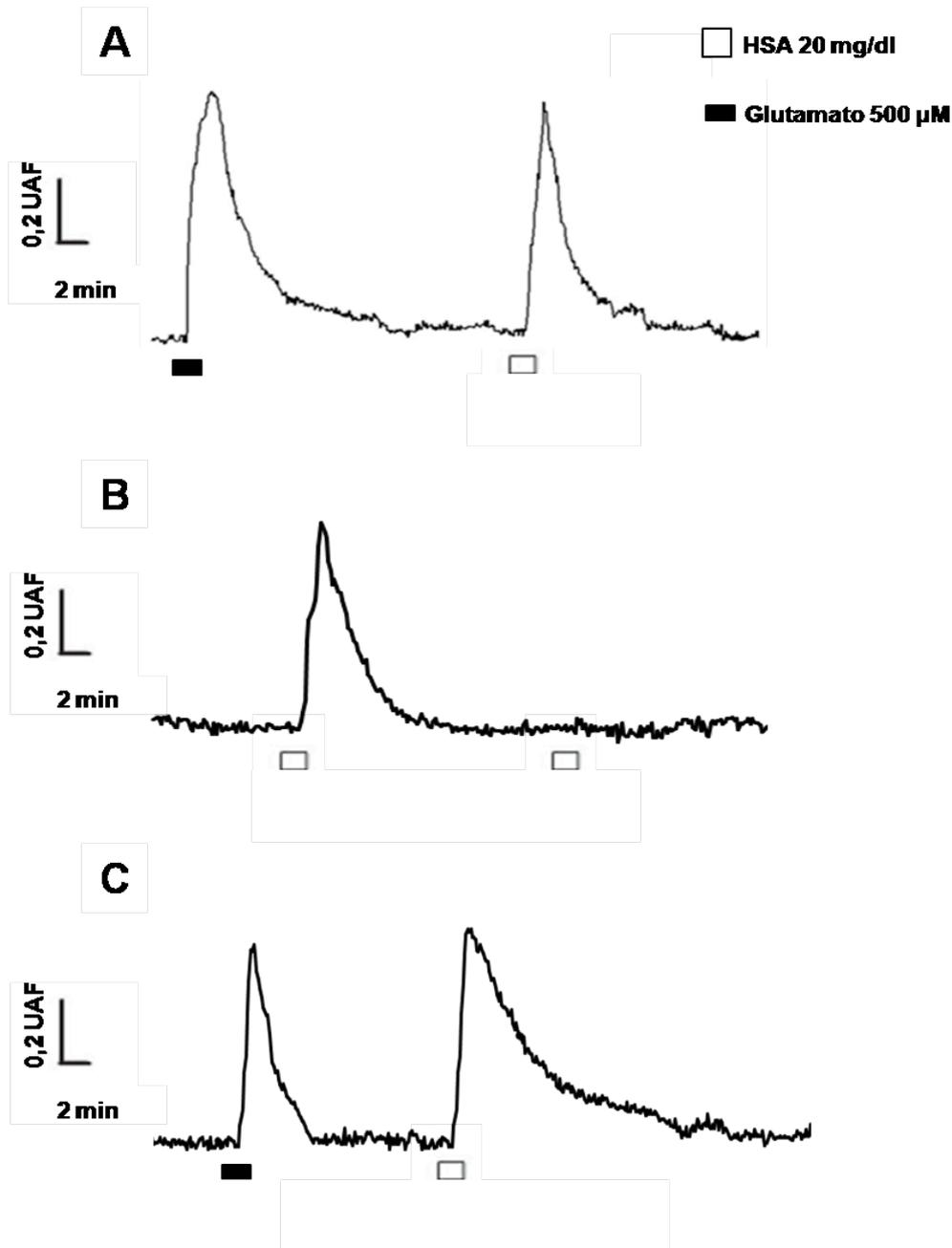
aplicación de HSA mediara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares; retículo endoplásmico, núcleo y mitocondria.

A continuación se estudió la opción de que el  $\text{Ca}^{2+}$  fuese liberado desde el RE, que es el principal depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito, para lo cual se procedió a estudiar el sistema de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de segundos mensajeros.

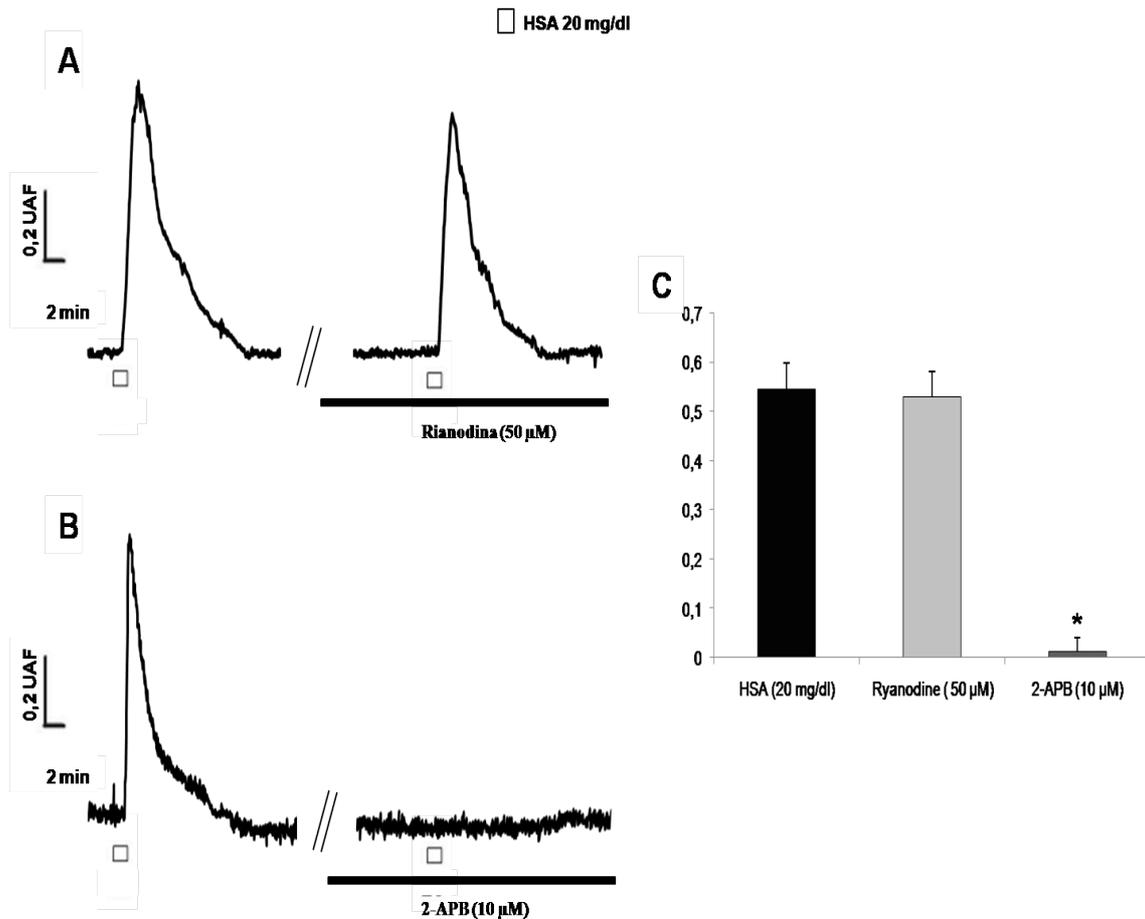
Teniendo en cuenta la bibliografía, se conoce que los receptores de rianodina en los astrocitos no se expresan o están en tan bajo número que no son funcionales, de modo que el objetivo era comprobar si la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la albúmina tiene relación con el segundo mensajero  $\text{IP}_3$  en este modelo celular, tal y como se ha demostrado usando otros modelos celulares (Fiacco y McCarthy, 2006). Se realizaron experimentos donde se utilizó rianodina a alta concentración, circunstancia que permite el bloqueo de los receptores de rianodina y bloquea el CICR mediado por rianodina. Este experimento se planteó como un control negativo, ya que los receptores de rianodina en astrocitos no se expresan o su número es tan pequeño que no poseen un papel determinante en la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Se observa que la presencia de una concentración supramáxima de rianodina, 50  $\mu\text{M}$ , no disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  al compararse con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del experimento control (Ver figura 25-A).

En cuanto a los experimentos en los que se estudia el receptor de  $\text{IP}_3$  se utiliza un antagonista específico de los receptores de  $\text{IP}_3$ , el 2-APB o 2-amino-etoxidifenil-borato, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 24.** Estudio de mecanismos responsables de los incrementos de la  $[Ca^{2+}]_c$  (I). A) Experimentos en presencia de 1 mM de  $Ca^{2+}$ , tanto al aplicar los pulsos de glutamato como de HSA se obtiene un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$ . B) Experimentos en ausencia de  $Ca^{2+}$ , 0 mM de  $Ca^{2+}$ , y además con productos quelantes del  $Ca^{2+}$ , EGTA 1 mM. Se observa que el primer pulso de HSA produce un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  pero al aplicar el segundo pulso de HSA no se observa respuesta alguna. C) Experimentos donde se reintroduce la solución de trabajo con 1 mM de  $Ca^{2+}$ , en estas circunstancias al aplicar los estímulos de glutamato y HSA si se observa un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  al haber sido rellenados los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ .



**Figura 25.** Estudio de mecanismos responsables de los incrementos de la  $[Ca^{2+}]_c$  (II). A) Experimentos en presencia de una concentración supra-máxima de rianodina, se observa que al aplicar el estímulo de HSA en presencia de rianodina 50  $\mu$ M existe un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$ . B) Experimentos en presencia de 2-APB 10  $\mu$ M, al aplicar HSA se puede observar que existe una abolición completa del incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$ . C) Existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), al comparar la respuesta mediada por la HSA (20 mg/dl) en presencia y ausencia de 2-APB (10  $\mu$ M), mientras que al comprar la respuesta mediada por la HSA en presencia y ausencia de rianodina no es observan diferencias significativas. ( $n=52$  en este tipo de experimentos).

En presencia de este compuesto a la concentración utilizada se observa un bloqueo total de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Ver figura 25-B).

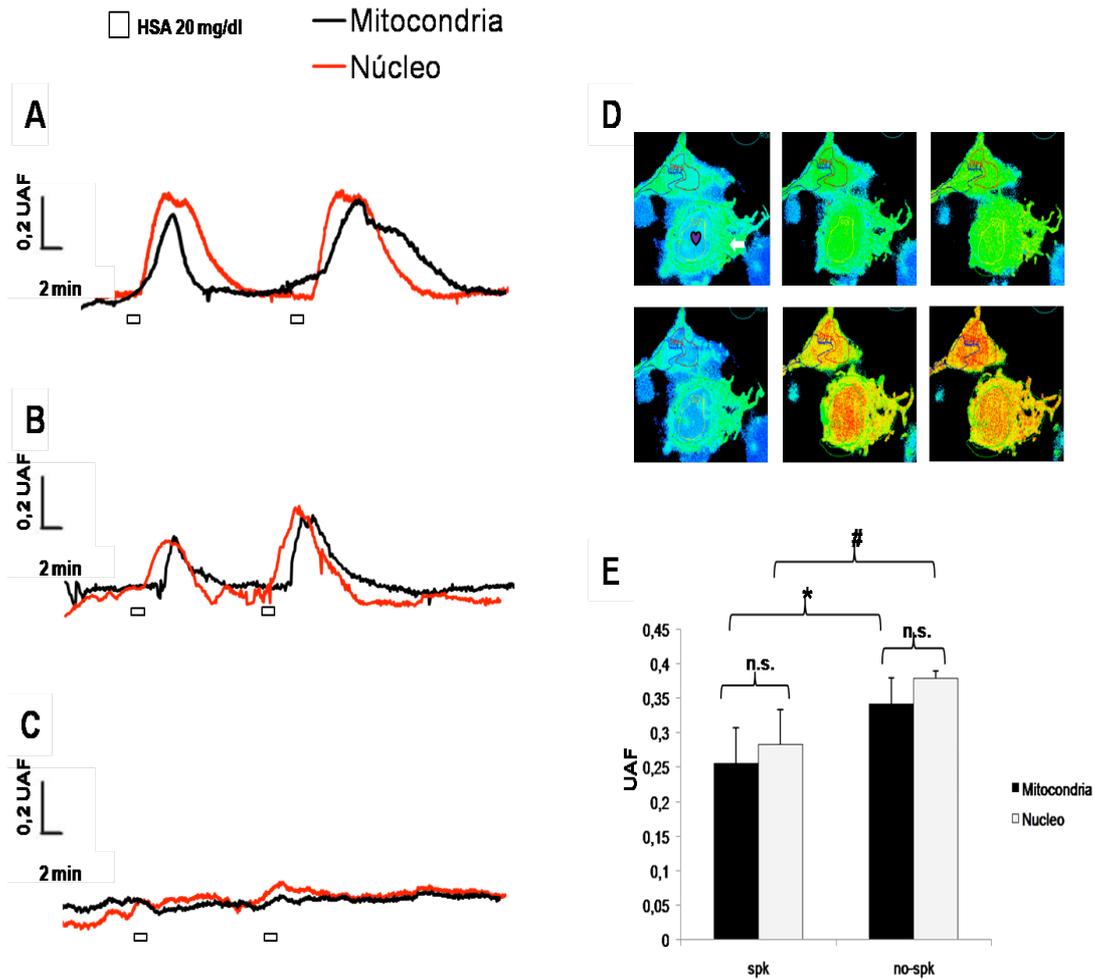


A continuación se planteó el estudio de los otros depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , como son el núcleo y las mitocondrias. En concreto se estudió si existía diferencias en cuanto al aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado al citosol desde el RE, entre los astrocitos en cultivo procedentes de zonas "spk" y de zonas "no-spk".

Para abordar este estudio se usaron sondas fluorescentes genéticamente dirigidas a estos orgánulos, RT Pericam, que permiten detectar incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas organelas.

Como puede observarse en la figura 25 la aplicación de dos pulsos de 20 mg/dl de HSA, produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE e inmediatamente se aprecia como parte de este  $\text{Ca}^{2+}$  penetra en el núcleo y después comienzan las mitocondrias a captar ese  $\text{Ca}^{2+}$  (ver figura 26-D). A la hora de comparar esta situación en astrocitos en cultivo procedentes de tejido identificado como "spk" y "no-spk" se observa que la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que es introducido, tanto en el núcleo como en la mitocondria, es menor en los astrocitos "spk" que en los "no-spk". En concreto al comparar el pico máximo observado en la mitocondria en astrocitos "spk" y "no-spk", obtenemos valores de 0,256 UAF y 0,342 UAF respectivamente. Existe una disminución en la capacidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del 25,15% en los astrocitos procedentes de tejido "spk" con respecto a los que proceden de tejido "no-spk". La diferencia es estadísticamente significativa,  $p < 0,05$ , al comparar estos dos grupos (Ver figura 26-E).

Si se compara el pico máximo observado en el núcleo en astrocitos "spk" y "no-spk", obtenemos valores de 0,283 UAF y 0,379 UAF respectivamente. Existe



**Figura 26.** Estudio del aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  por el núcleo y las mitocondrias. Encontramos que en los experimentos A, B y C, la línea roja representa a la medida de  $\text{Ca}^{2+}$  proporcionada por el RT pericam nuclear mientras que la línea negra representa al RT Pericam mitocondrial. A) Registro correspondiente a astrocitos en cultivo procedentes de tejido identificado como "no-spk". Puede verse con claridad que comienza a existir una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el núcleo instantes antes de que comience este proceso en la red mitocondrial. B) Registro correspondiente a astrocitos en cultivo procedentes de tejido identificado como "spk". Puede verse con claridad que comienza a existir una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el núcleo instantes antes de que comience este proceso en la red mitocondrial. Además los valores máximo del pico son menores que los existentes en astrocitos procedentes de tejido "no-spk". C) Registro correspondiente a astrocitos en cultivo procedentes de tejido identificado como "no-spk", los estímulos de HSA (20 mg/dl) se aplican en presencia del inhibidor de los receptores de  $\text{IP}_3$ , 2-APB (10  $\mu\text{M}$ ). D) Se puede observar una secuencia de imágenes donde se observa un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las organelas, donde (♥) representa al RT Pericam nuclear y (○) representa al RT Pericam nuclear. E) Existe una disminución del 25,15% y del 25,33% en la efectividad de captar  $\text{Ca}^{2+}$  en la red mitocondrial y el núcleo, respectivamente, de astrocitos de tejido "spk". Las diferencias observadas son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar el  $\text{Ca}^{2+}$  que captan las ambas tipos de organelas, en los astrocitos procedentes de tejido "spk" y "no-spk". (n=21).



una disminución en la capacidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del 25,33% en los astrocitos procedentes de tejido "spk" con respecto a los que proceden de tejido "no-spk". La diferencia es estadísticamente significativa,  $p < 0,05$ , al comparar estos dos grupos (Ver figura 26-E).

El hecho de que el  $\text{Ca}^{2+}$  penetre en el núcleo en primer lugar e inmediatamente después lo hace en la red mitocondrial, hace pensar en que el RE está muy próximo al núcleo y si éste libera el  $\text{Ca}^{2+}$  antes que estos dos depósitos secundarios, puede crear un microdominio con una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cerca del núcleo que favorecerá su captura por parte de dicha organela.

### **3. SINCRONIZACIÓN DE LA RESPUESTA ASTROCITARIA EN RESPUESTA LA ALBÚMINA**

Actualmente existen evidencias que muestran la existencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  que se propagan de unos astrocitos a otros, astrocitos que forman redes que pueden estar compuestas desde cuatro a más de treinta astrocitos (Sul y col., 2004; Tian y col., 2006). Dichas ondas pueden representar un importante mecanismo de señalización intercelular en el sistema nervioso (Goldberg y col., 2010).

Para comprobar si los astrocitos en cultivo en monocapa utilizado durante este trabajo estaban conectados entre sí, se utilizó la introducción del tinte fluorescente amarillo lucifer como se describe en el apartado de materiales y métodos. Se obtienen resultados que indican que los astrocitos presentes en el



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

cultivo monocapa utilizado en estos experimentos si estaban comunicados entre sí a través de las uniones comunicantes al observarse que el colorante amarillo lucifer había llegado al 90-95% de los astrocitos en cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior se decidió estudiar, si en el modelo celular utilizado en el presente estudio, aparecía esta sincronización cuando se aplicaba albúmina durante un periodo de tiempo de 50 minutos.

Se aplicó HSA 20 mg/ml de forma constante durante 50 minutos observándose un incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  en cada astrocitos pero de forma des-sincronizada. Aproximadamente, después de 14 minutos de la presencia constante de HSA 20 mg/ml se observa el comienzo del "reclutamiento" de algunos astrocitos, que no habían mostrado respuesta inicialmente a la aplicación de HSA. Alrededor del minuto 16 se observa la existencia de incrementos en la frecuencia y en la concentración de  $Ca^{2+}$  liberado al citosol, así como una sincronización de dichos "disparos".

Este mismo experimento se realiza en presencia de un bloqueante reversible de las uniones comunicantes, como es el etomidato a una concentración de  $10^{-4}$  M (Mantz y col., 1993). En presencia de este bloqueante no se observa la sincronización de "disparos" que aparecía alrededor del minuto 16 en los experimentos en ausencia del etomidato. Pero se observan oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma de los astrocitos individuales de forma asincrónica.

En ausencia de etomidato encontramos que, alrededor del 40% de los disparos observados (180 de 300 disparos, en 5 experimentos) están interconectados y derivan de una onda de  $Ca^{2+}$  originada en un astrocito. Sin embargo al aplicar



etomidato, encontramos que el 9% de las oscilaciones (21 de 230 disparos, en 4 experimentos) en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico están interconectadas y forman parte de las ondas de  $Ca^{2+}$ . Al estudiar la participación de las uniones comunicantes en las ondas de  $Ca^{2+}$  en astrocitos en cultivo procedentes de pacientes epilépticos, mediante el uso del etomidato, se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de astrocitos interconectados en ausencia de etomidato que los que existen en presencia del mismo ( $p < 0,05$ ).

Así mismo, al comparar el número de oscilaciones que están interconectadas con la aparición de una onda de  $Ca^{2+}$  tanto en ausencia, 55% de disparos interconectados (209 de 380 disparos, 5 experimentos), como en presencia del etomidato, 11% de disparos interconectados (27 de 245 disparos, 5 experimentos), en astrocitos cultivados de tejido resecado de corteza "spk" se observa una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ )

A la hora de comparar el estudio realizado en presencia o ausencia de etomidato, tanto en astrocitos procedentes de tejido resecado de corteza "spk" como de "no-spk", se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) existiendo mayor cantidad de disparos sincronizados en los experimentos analizados que utilizan astrocitos procedentes de la corteza "spk".

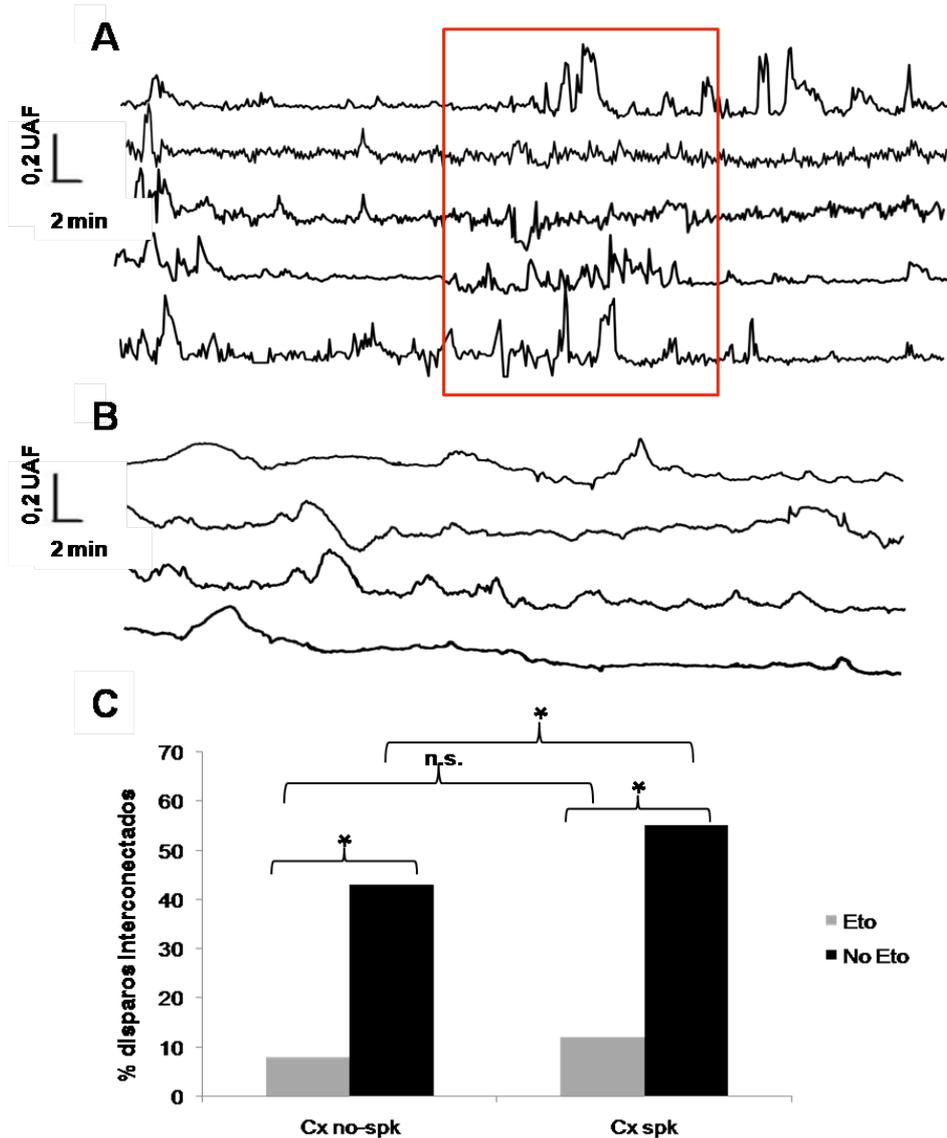
El cálculo de estos datos se realiza según el método descrito por Nadal y col. en 1997, y es que los astrocitos fueron contabilizados como integrantes de una onda de  $Ca^{2+}$  cuando el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico era



observada dentro de los 3 segundos siguientes a la aparición de incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en un astrocito adyacente.

Atendiendo a los resultados obtenidos, parece que las uniones comunicantes poseen un papel muy importante en la conductancia de la señal en astrocitos en cultivo procedentes de pacientes epilépticos. La albúmina parece actuar como un elemento que favorece la coordinación en la conductancia de la señal en los astrocitos.

De hecho existe la teoría de que la sincronización a través de las uniones comunicantes puede deberse al paso de  $\text{IP}_3$  a otros astrocitos a través de éstas. El  $\text{IP}_3$  mediaría el CICR en el astrocito al que llega, de modo que regeneraría la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y mediaría así la propagación de la señal.



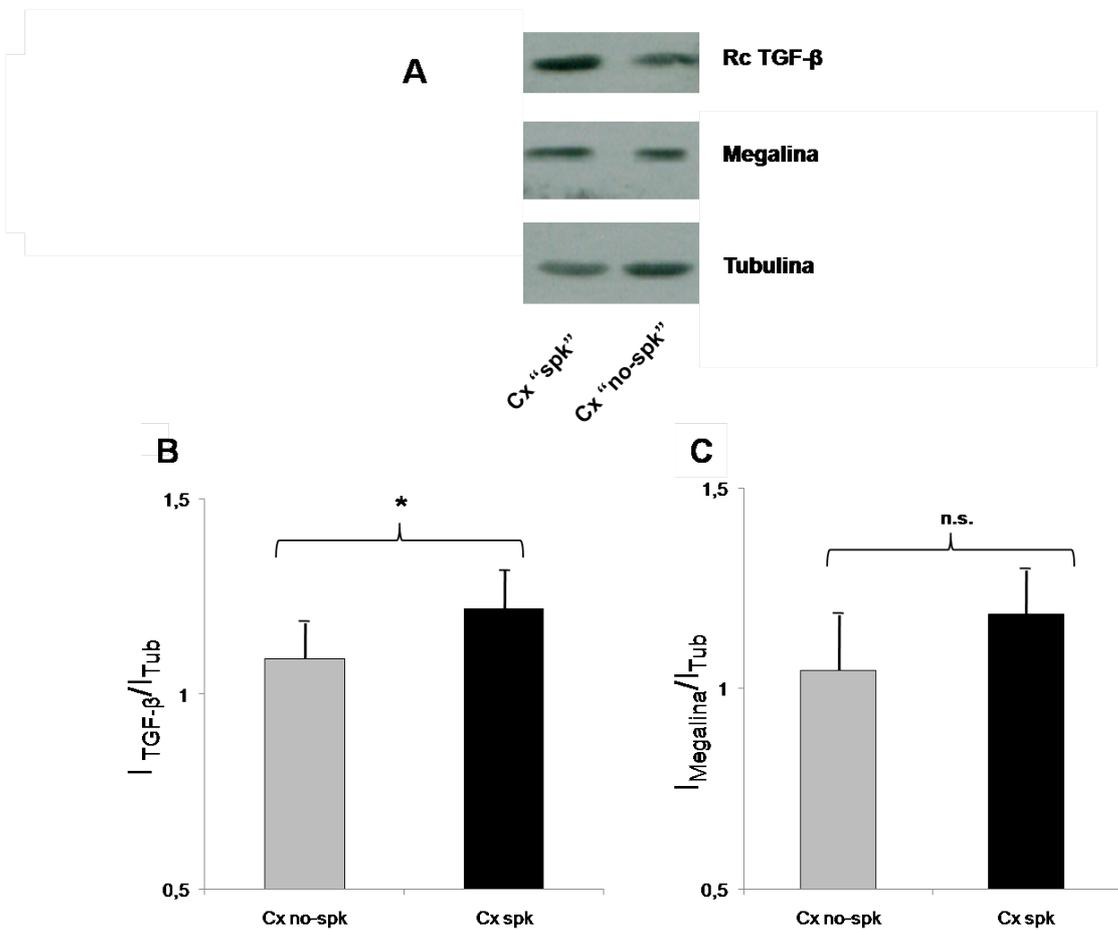
**Figura 27.** A) Ejemplo de oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_c$  en respuesta a la perfusión constante de una solución que contiene HSA (20 mg/dl), en una selección de un cluster de 5 astrocitos en cultivo. Estos astrocitos en cultivo se encuentran formando un cultivo confluyente en monocapa. Es interesante destacar que a partir de los 15-16 minutos de exposición comienza a observarse una serie de oscilaciones sincronizada, marcado con la línea roja continua. B) Ejemplo de la respuesta, en cuanto a la sincronización, que ofrece un cluster de 4 astrocitos en cultivo cuando se perfunde de modo constante una solución con HSA (20 mg/dl) en presencia del bloqueante reversible de las gap-junctions, el etomidato ( $10^{-4}M$ ). C) comparativa, en cuanto al porcentaje de disparos u oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_c$  entre astrocitos procedentes de Cx "spk" y "no-spk", en presencia o ausencia de etomidato. Como puede apreciarse en astrocitos procedentes de Cx "spk" el valor alcanzado, en cuanto al % de disparos interconectados, es mayor en ausencia de etomidato que en presencia del mismo ( $p < 0,05$ ). Esta misma comparativa pero en astrocitos derivados de Cx "spk" ofrece un resultado similar al anterior ( $p < 0,05$ ). A la hora de comparar el % de disparos interconectados entre los astrocitos procedentes de la Cx "spk" y "no-spk", observamos que en presencia de etomidato no existen diferencias estadísticas entre ambos ( $p > 0,05$ ). Mientras que para astrocitos de Cx "no-spk" en ausencia de etomidato si existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



#### **4. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ADN**

Los estudios previos han demostrado la inducción de la síntesis de ADN en astrocitos de rata por acción de la BSA (Nadal y col., 1995). Sin embargo, en otro modelo de inducción astrocitaria in vitro (no en cultivo), la inducción de la síntesis de ADN se lleva a cabo a partir de la endocitosis de la albúmina sérica mediada por el receptor TGF- $\beta$  (Ivens y col., 2007). Se ha considerado que la síntesis de ADN puede ser el paso inicial en los procesos de epileptogénesis. Otros grupos han observado que la albúmina es introducida en el astrocito a través de la endocitosis mediada por la megalina (Bento-Abreu y col., 2008), esta entrada de la albúmina en el astrocito mediará la síntesis de ácido oleico. Por tanto, resulta de especial relevancia el estudiar los distintos mecanismos y comprobar su efecto sobre la inducción de síntesis de ADN en astrocitos humanos.

En primer lugar se estudió el que en los astrocitos en cultivo procedentes de corteza procedente de pacientes epilépticos, tanto si es corteza "spk" o "no-spk", presentaban receptores de albúmina descritos en modelo murinos, es decir el receptor TGF- $\beta$  y la megalina. Para ello se realizó la determinación de la expresión de ambos receptores, la megalina y del receptor de TGF- $\beta$ , usando la tubulina como control de carga. El método utilizado para determinar la expresión fue el de la inmunorreactividad con anticuerpos específicos (figura 28).



**Figura 28.** A) Determinación por western blot de la expresión de megalina, el Rc TGF- $\beta$ . Las muestras se analizan incluyendo la variable de si proceden o no de CX "spk" o "no-spk". B) se muestran los valores medios de la relación Rc TGF-  $\beta$ /Tubulina medidos tanto en Cx "spk" como "no-spk". Se observa la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en la relación de intensidades entre la Cx "no-spk" y Cx "spk" ( $p < 0,05$ ). C) se muestran los valores medios de la relación Megalina /Tubulina medidos tanto en Cx "spk" como "no-spk". No existe una diferencia estadísticamente significativa en la relación de intensidades entre la Cx "no-spk" y Cx "spk" ( $p > 0,05$ ).

Como puede observarse aparecen ambos receptores en los astrocitos en cultivo procedentes de pacientes epilépticos. Una vez comprobada su existencia en el modelo estudiado en el presente trabajo, se procedió a estudiar



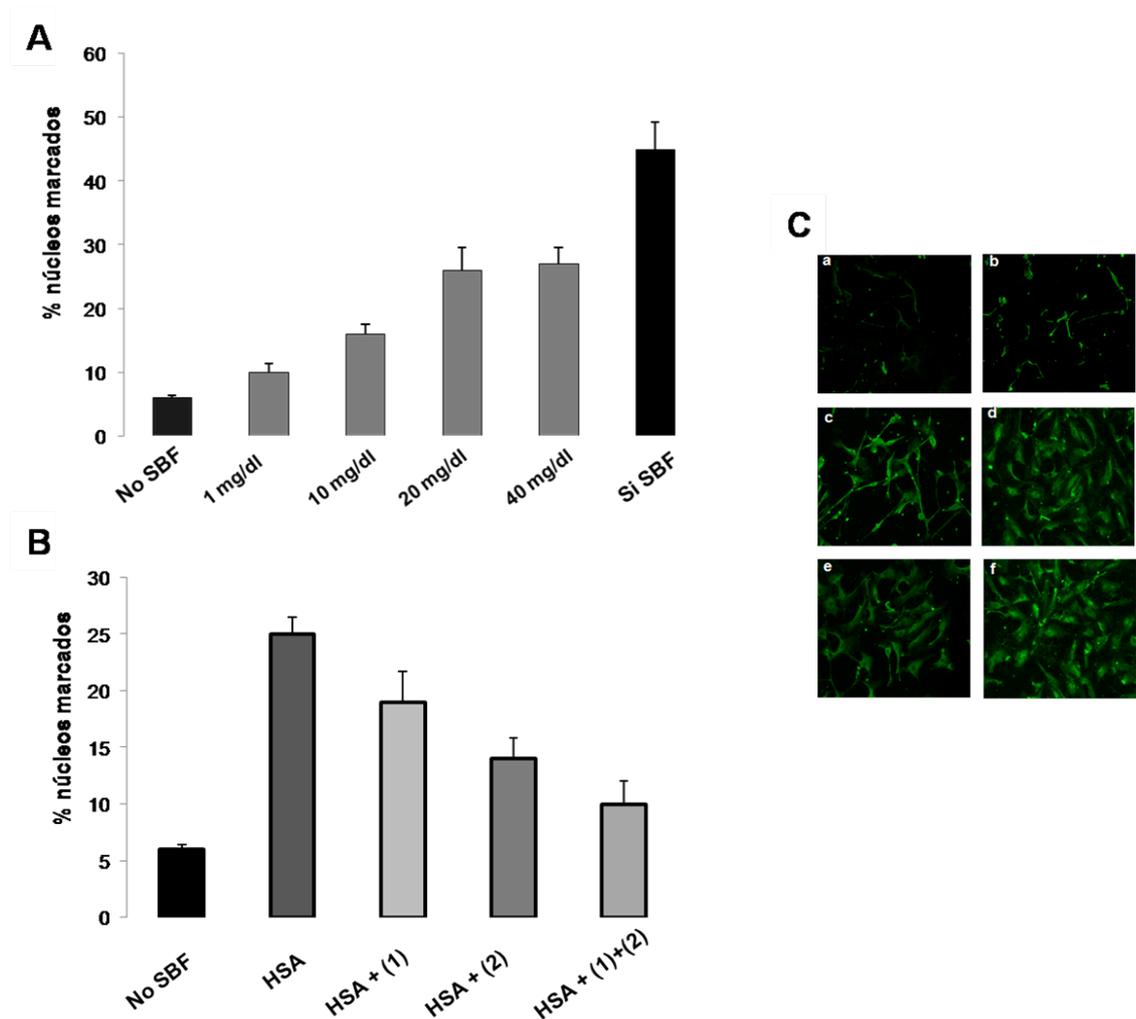
el papel de estos receptores en la inducción de la síntesis de ADN mediada por la aplicación de albúmina.

Para la realización de este tipo de experimentos se cultivaron astrocitos humanos en presencia de distintas concentraciones de HSA (1, 10, 20 y 40 mg/dl) en ausencia de suero bovino fetal (SBF). Comprobando como la HSA induce síntesis de ADN en los astrocitos de forma dosis dependiente (Ver figura 29).

Para estudiar si este efecto se debía a la acción de la HSA sobre el receptor TGF- $\beta$  o sobre la megalina, se utilizaron los inhibidores de ambos receptores; el inhibidor del receptor TGF- $\beta$  subtipo I y la proteína asociada a receptor (RAP, del inglés, Receptor-associated protein) (Cui y col., 1996), respectivamente.

Las distintas variables abordadas en este estudio serían;

- Medio sin suero bovino fetal como control negativo
- Medio con suero bovino fetal como control positivo
- Medio con una concentración de HSA de 20 mg/dl
- Medio con una presencia de 20 mg/dl HSA + inhibidor del receptor TGF- $\beta$  subtipo I (30  $\mu$ M)
- Medio con una presencia de 20 mg/dl HSA + inhibidor de la megalina (RAP).
- Medio con una presencia de 20 mg/dl de HSA junto con el inhibidor del receptor TGF- $\beta$  subtipo I y con el inhibidor de la megalina (RAP).



**Figura 29.** Inducción de la síntesis de ADN por parte de la HSA sobre astrocitos humanos en cultivo. A) Efecto de diferentes concentraciones de HSA sobre la síntesis de ADN. Incluso la concentración de 1 mg/dl induce un incremento significativo con respecto al medio sin SBF (\*  $p < 0,05$  para el test t de Student). B) Efecto sobre la síntesis de ADN de la aplicación del inhibidor del receptor de TGF- $\beta$  del subtipo I (30  $\mu$ M) en presencia de HSA (20 mg/ml). \* $p < 0,05$ . Datos obtenidos de 22 experimentos, procedentes de 10 pacientes. Donde (1) es el Inhibidor para el receptor TGF- $\beta$  del subtipo I; (2) es el inhibidor de la megalina. C) Microfotografías de los campos utilizados para la elaboración de estos resultados, de **a** hasta **f**.

Por ello, se incubaron astrocitos en diferentes soluciones presencia de HSA 20 mg/dl, concentración que produce prácticamente una inducción máxima de la síntesis de ADN en astrocitos. en presencia de 20 mg/dl HSA + inhibidor del



receptor TGF- $\beta$  subtipo I (30  $\mu$ M). Como puede observarse en la figura 29 la presencia del inhibidor TGF- $\beta$  disminuye la síntesis de ADN con respecto a la HSA en un 28%, pero no la elimina por completo. La síntesis de ADN también disminuye un 44%, con respecto a la HSA cuando se aplica la proteína RAP pero no abole la respuesta por completo ( Ver figura 29). Por último se incubaba con HSA más inhibidor de megalina e inhibidor del receptor de TGF- $\beta$ , obteniéndose una reducción del 72% en la síntesis de ADN de los astrocitos en cultivo. Esto supone que aproximadamente el 28%, de la inducción en la síntesis de ADN, por efecto de la HSA, está mediado por otros mecanismos que no son los propios del receptor TGF- $\beta$  o la megalina. La aplicación conjunta de ambos inhibidores no abole la síntesis de ADN por completo.



## **V. DISCUSIÓN**



Los experimentos realizados en el presente trabajo, ofrecen una serie de resultados que han sido agrupados en distintos puntos para su mejor interpretación. En primer lugar se detallan los datos relativos a la técnica de localización del tejido irritativo mediante técnicas intraoperatorias y la técnicas de cultivo que se emplearon para obtener los cultivos primarios de astrocitos humanos. A continuación se aborda el efecto de la albúmina sobre los astrocitos en cultivo, enfocándose a su vez en tres puntos; i) el efecto observado sobre el RE, el núcleo o la red mitocondrial, ii) efecto de la albúmina sobre el "reclutamiento" de astrocitos y iii) efecto de la albúmina sobre la síntesis de ADN en astrocitos. Para finalizar se realiza un pequeño resumen que incluye perspectivas futuras de lo observado.

## **1. CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO RESECADO Y REALIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR**

Durante muchos años se han cultivado astrocitos derivados de humanos adultos (De Groot y col., 1997; O'Connor y col., 1998; Gibbons y col., 2007). De hecho Gibbons y col. (2007) modificaron la técnica previa de De Groot y col. (1997) simplemente sembrando las células en placas con un sustrato de poli-L-lisina, de modo que mejoraban la adherencia de los astrocitos. El grupo de Gibbons y col. (2007) obtenía el tejido de pacientes con características similares a las descritas en el presente trabajo, se sembraba un número



semejante de células, alrededor de  $10^4$ , y siendo similar el método empleado para incrementar la adherencia celular, parece que las modificaciones introducidas en la elaboración del cultivo hacen que exista una menor cantidad de oligodendrocitos en los cultivos realizados para el presente trabajo que en los realizados por Gibbons y colaboradores en el año 2007.

Además de haber optimizado el método de obtención de cultivos primarios de astrocitos, procedentes de muestras de corteza resecadas de pacientes epilépticos fármaco-resistentes sometidos a cirugía, se estudió la funcionalidad de las células presentes en estos cultivos primarios, mediante el uso de la sonda fluorescente Fura-2AM. En dicho estudio se midieron las variaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol de los astrocitos al aplicar diferentes estímulos. Es importante destacar que el uso del 10% de suero humano en el medio de cultivo utilizado parece aumentar la viabilidad del cultivo, de hecho algunos autores como Uto y col. (1994) y Dux y col. (1996) demuestran que la existencia de algunos factores séricos como BFGF y TGF- $\beta$ 1 son necesarios para la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , en el citosol y las mitocondrias, de las células en cultivo tras la aplicación de glutamato.

En la línea de la obtención de la pieza de tejido de los pacientes epilépticos fármaco-resistentes sometidos a cirugía, no hay que olvidar la capacidad de diferenciación entre la zona no irritativa o "no-spk" y la zona irritativa o "spk" que aparece en la corteza. Los datos que permiten diferenciar una zona de otra son aportados por los registros intraoperatorios al realizar una ECoG. No hay que olvidar que esta técnica se utiliza como una forma de mejorar la localización del foco epileptógeno. De modo que el análisis del ECoG se utiliza



como una herramienta para guiar la resección, ya que las puntas interictales registradas durante el ECoG suelen derivar de la zona irritativa (Rosenow y Lüders, 2001).

Sin embargo, el uso intraoperatorio de los resultados obtenidos por el ECoG es aún controvertido (Keene y col., 2000). Por un lado, la identificación visual de las puntas epileptógenas depende de la opinión de expertos (Wilson y Emerson, 2002) pudiendo darse el caso de la existencia de una gran diferencia de opinión entre dos expertos a la hora de revisar el mismo registro (Ortega GJ y col., 2007). En cuanto a los resultados quirúrgicos derivados de la interpretación de los datos proporcionados por el ECoG fue realizada por el neurofisiólogo clínico de la Unidad de Cirugía de la Epilepsia, Dr. Pastor. La validez de la interpretación del Dr. Pastor acerca de estos datos, datos que guiarán la resección de tejido cerebral llevada a cabo por el neurocirujano de la UCE, el Dr. García de Sola, se fundamenta en la evaluación postquirúrgica de los pacientes intervenidos. Dicha evaluación aporta un valor en la escala de Engel, ésta se considera en la actualidad como la clasificación estandarizada más difundida en cuanto a presencia de crisis (Engel y col., 1993). Consiste en grandes 4 grupos, que son:

- Grado I; sin crisis o crisis parciales simples no discapacitantes.
- Grado II; sólo crisis ocasionales.
- Grado III; reducción de las crisis en más del 75% con respecto a antes de la intervención quirúrgica.
- Grado IV; sin cambios apreciables o reducción de las crisis entre un 50-75% con respecto a antes de la intervención quirúrgica.



Siguiendo esta clasificación reducida y en base al seguimiento de más de un año realizado a los pacientes incluidos en el presente trabajo, como se puede observar en la tabla I, el 95% de los pacientes presente un grado Engel I y sólo el 5% restante presenta un Engel distinto de I, en concreto el paciente nº 8 presenta un grado Engel IV (ver tabla I).

Atendiendo a los datos que proporciona la evaluación postquirúrgica, la localización de la zona a resear atendiendo a la interpretación de los datos del ECoG por parte de un neurofisiólogo clínico experto, es muy exacta. Por lo que se puede aseverar que el tejido denominado "spk" o "no-spk", que fue utilizado para los procedimientos experimentales, corresponde realmente a zonas de corteza temporal con esas características eléctricas.

De modo que de los astrocitos en cultivo procedentes de tejido "no-spk", será razonable asumir que pueden considerarse como astrocitos humanos no afectados por cambios moleculares o estructurales asociados a la epilepsia, mientras que si proceden de tejido identificado como "spk" si presentarían los cambios moleculares o estructurales asociados a la epilepsia.

## **2. EFECTOS DE LA ALBÚMINA SOBRE ASTROCITOS**

El estudio de los astrocitos y su posible implicación en la epilepsia, se presenta como un campo extraordinariamente sugerente y de reciente inicio (Herrera-Peco y col., 2008). Hasta el momento, se tenía conocimiento de numerosos mecanismos fisiopatológicos en tejidos epilépticos, tanto en modelos animales como en humanos, ya establecidos que no ofrecían información acerca de los



procesos iniciales que podían llevar desde un cerebro normal a uno epiléptico. Se conocían, en efecto, muchos datos electrofisiológicos e histológicos en este tipo de patologías, principalmente en la epilepsia del lóbulo temporal mesial (Pastor y col., 2006), pero estos datos no mostraban un patrón claro y daban cabida a gran número de interpretaciones (Arellano y col., 2004). Sin embargo, por vez primera, los mecanismos de activación astrocitaria a partir de la albúmina, tras una permeabilización de la BHE, se postulan como posibles responsables de los procesos de inicio en las epilepsias focales humanas idiopáticas.

Trabajos recientes (Vermeulen y col., 1994; van Vliet y col., 2007; Seiffert y col., 2004), junto con datos conocidos con anterioridad que ahora cobran nueva vigencia (Nagele, 2004; Veerhuis y col., 1998) sugieren, por primera vez, un modelo pausable del proceso de epileptogénesis focal humana para alguno de los tipos de epilepsias existentes.

Este proceso de epileptogénesis comienza con un aumento en la permeabilidad de la BHE, aumento que podría deberse a algún tipo de alteración como pudiera ser; fiebre, traumatismo craneoencefálico, alteraciones en transportadores (Oby y Janigro, 2006), esclerosis múltiple, tumores (Weiss y col., 2009), etc. De modo que esta alteración sea lo suficientemente grave como para comprometer la integridad estructural de la BHE y permite la entrada de albúmina al espacio extracelular cerebral, de modo que la albúmina entrará en contacto con los astrocitos y comenzará a mediar su activación.



## **2.1 ACCIÓN DE LA ALBÚMINA SOBRE EL RE, NÚCLEO Y RED MITOCONDRIAL**

Se han descrito numerosos efectos de la albúmina sobre los astrocitos en cultivo procedentes de especies murinas. Entre otros, se han observado oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de los astrocitos que dan lugar a una inducción de la síntesis de ADN (Nadal y col., 1997), regulación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (Tabernero y col., 1999) así como inducción de la formación de fibras de estrés de actina (Moser y col., 2007). En el presente trabajo, en astrocitos procedentes de muestras obtenidas de pacientes epilépticos, se obtienen resultados que muestran como la albúmina induce un incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, tanto de aquellos procedentes de tejido caracterizado como "spk" o "no-spk".

Este incremento es provocado por una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares mediada por un aumento en la concentración de  $\text{IP}_3$ , ya que demostramos que la albúmina libera  $\text{Ca}^{2+}$  desde los mismos depósitos que el glutamato (Nadal y col., 1997), este  $\text{Ca}^{2+}$  mediará la salida de más  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el CICR y aunque este no es el único sistema envuelto en la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$  (Lencesova y col., 2004), si es el principal mecanismo relacionado con la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la albúmina en el modelo experimental utilizado en el presente trabajo.

A tenor de estos resultados que indican un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de los astrocitos, se decidió estudiar el comportamiento de otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  como son el núcleo y la mitocondria. Éstos actuarán



principalmente como estructuras que captan el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el RE (Vasington, 1963). Se consideró que esta capacidad para captar el  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol podría estar disminuida en aquellos astrocitos en cultivos procedentes del tejido "spk" con respecto a aquellos procedentes de tejido "no-spk".

Los resultados ofrecidos en el presente trabajo muestran que la capacidad de aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en ambos depósitos, núcleo y mitocondria, presenta una disminución muy significativa en su efectividad cuando los astrocitos proceden de tejido "spk" con respecto a la efectividad en el aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  observada en astrocitos procedentes de tejidos "no-spk".

Las alteraciones que puedan llevar a esta situación no están claras y no han sido estudiadas en profundidad, ya que existen numerosos mecanismos de aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, como son la bomba PMCA, en intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , la SERCA o el uniportador UC (Álvarez y col., 1999). De modo que cualquier alteración en estos sistemas acabarían desembocando en que la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera elevada durante mayor tiempo. Atendiendo a los resultados de los experimentos aquí expuestos, se puede observar que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que es captada por la red mitocondrial y por el núcleo es menor en los astrocitos procedentes de tejido "spk" que de los procedentes de tejido "no-spk", lo que apoya la posible existencia de alteraciones funcionales o estructurales en los sistemas de aclaramiento de  $\text{Ca}^{2+}$  que harán que disminuya o desaparezca totalmente su eficacia. Permitiendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  esté presente durante un largo periodo de tiempo en el citoplasma de los astrocitos.



## **2.2 ACCIÓN DE LA ALBÚMINA SOBRE LAS ONDAS DE $\text{Ca}^{2+}$**

A continuación se procedió a estudiar el fenómeno de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la red de astrocitos existente en los cultivos monocapa con los que se ha trabajado en el presente trabajo. Existen en los astrocitos elevaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden propagarse desde los extremos hasta el soma del astrocito, e incluso este tipo de propagación puede llegar a pasar a los astrocitos vecinos (Goldberg y col., 2010), formando lo que se denomina una "onda de  $\text{Ca}^{2+}$ " intercelular (Dani y col. 1992). Este tipo de evento ha sido descrito en numerosas ocasiones en astrocitos en cultivo (Charles, 1998; Scemes y col., 2006).

De los resultados derivados de los experimentos realizados en este trabajo, se puede concluir que las uniones comunicantes juegan un papel muy importante en la transmisión de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se puede observar en presencia del bloqueante reversible de las uniones comunicantes, el etomidato, el porcentaje de disparos interconectados disminuye drásticamente tanto en astrocitos procedentes de tejido "spk" como "no-spk". Mientras que en ausencia de etomidato la frecuencia de estos disparos interconectados aumenta en los dos grupos de astrocitos estudiados.

La utilización del etomidato viene dada por el estudio al que se ha sometido este fármaco por parte de la UCE del HUP (Herrera-Peco y col., 2009 B; Herrera-Peco y col., 2010; Pastor y col., 2010) y como se ha visto que en modelos superiores al cultivo celular en monocapa la acción del etomidato se puede dar a través de diferentes acciones. En primer lugar el etomidato se



puede unir a la subunidad  $\beta 3$  del receptor GABA A (Vanlersberghe y col., 2008), esta interacción facilitará la unión del GABA a su receptor, incrementando las corrientes de entrada de cloro, que producirán una hiperpolarización celular (Belelli, 1997). Si esta situación ocurre en una sub-población de interneuronas GABAérgicas que controla la inhibición ejercida por otra sub-población de interneuronas GABAérgicas sobre una población de neuronas piramidales excitadoras, puede facilitar una situación pro-epileptógena (Voss y cols., 2008).

Otra posibilidad sería la transformación de la acción inhibitoria del GABA en una acción excitatoria. Esta posibilidad se ha demostrado en rodajas de pacientes intervenidos por epilepsia del lóbulo temporal, y tiene su fundamento en la inversión del gradiente de  $Cl^-$  (Cohen y cols., 2002). Por último, como tercera posibilidad, el etomidato también actuaría disminuyendo la actividad de los transportadores de glutamato. En concreto, se ha observado que esta disminución de la actividad de recaptación se da en los GLUT del tipo 1 y 2, que se encuentran en los astrocitos (Räth y col., 2008). La presencia de etomidato en concentraciones clínicas produce una disminución en la capacidad de recaptación de estos GLUT hasta del 40% (Räth y col., 2008). Una de las funciones que realizan los astrocitos consiste en la recaptación de glutamato (Herrera-Peco y col., 2008), y la disminución de esta actividad permitirá un aumento de la permanencia del glutamato en la hendidura sináptica, lo que explicaría un incremento en la hiperexcitabilidad neuronal (Räth y col., 2008; Herrera-Peco y col., 2009 A).



Sin embargo en el modelo de trabajo utilizado para el presente estudio, cultivo celular en monocapa, el etomidato es utilizado como bloqueante reversible de las uniones comunicantes (Mantz y col., 1993). Este tipo de modelo de trabajo tiene un efecto claro, y es el bloqueo de las uniones comunicantes y la casi completa abolición de la onda de  $Ca^{2+}$ , ya sea en astrocitos en cultivos derivados de corteza tipo "spk" como de corteza "no-spk". Pudiendo concluirse que en este modelo el etomidato es un fármaco que desincroniza la red astrocitaria, haciendo que los astrocitos reclutados por la onda de  $Ca^{2+}$  disminuyan desde un 40% de astrocitos reclutados hasta un 9% en astrocitos en cultivo procedentes de tejidos "no-spk" . mientras que en astrocitos en cultivo procedentes de tejidos "spk", la presencia de etomidato hace disminuir los astrocitos reclutados desde un 55% hasta un 11%.

Sin embargo es interesante destacar el hecho de que exista una diferencia clara en el porcentaje de astrocitos reclutados, en ausencia del etomidato, entre aquellos cultivos realizados a partir de tejido caracterizado como "no-spk" y "spk". Encontramos que en el caso de cultivos de tejido "spk" existe un 55% de astrocitos reclutados en la "onda de  $Ca^{2+}$ ", mientras que en cultivos de tejido "no-spk" encontramos que existe un 40% de astrocitos reclutados. Esta diferencia permite considerar la existencia de una predisposición a ser reclutados, bien porque los astrocitos de zonas consideradas como "spk" presenten cambios moleculares o estructurales asociados a epilepsia, como por ejemplo; i) un incremento en el número de uniones comunicantes, ii) aumento de la expresión de receptores de membrana para la albúmina que estén asociados a PLC produciendo  $IP_3$  o iii) que exista un incremento en la



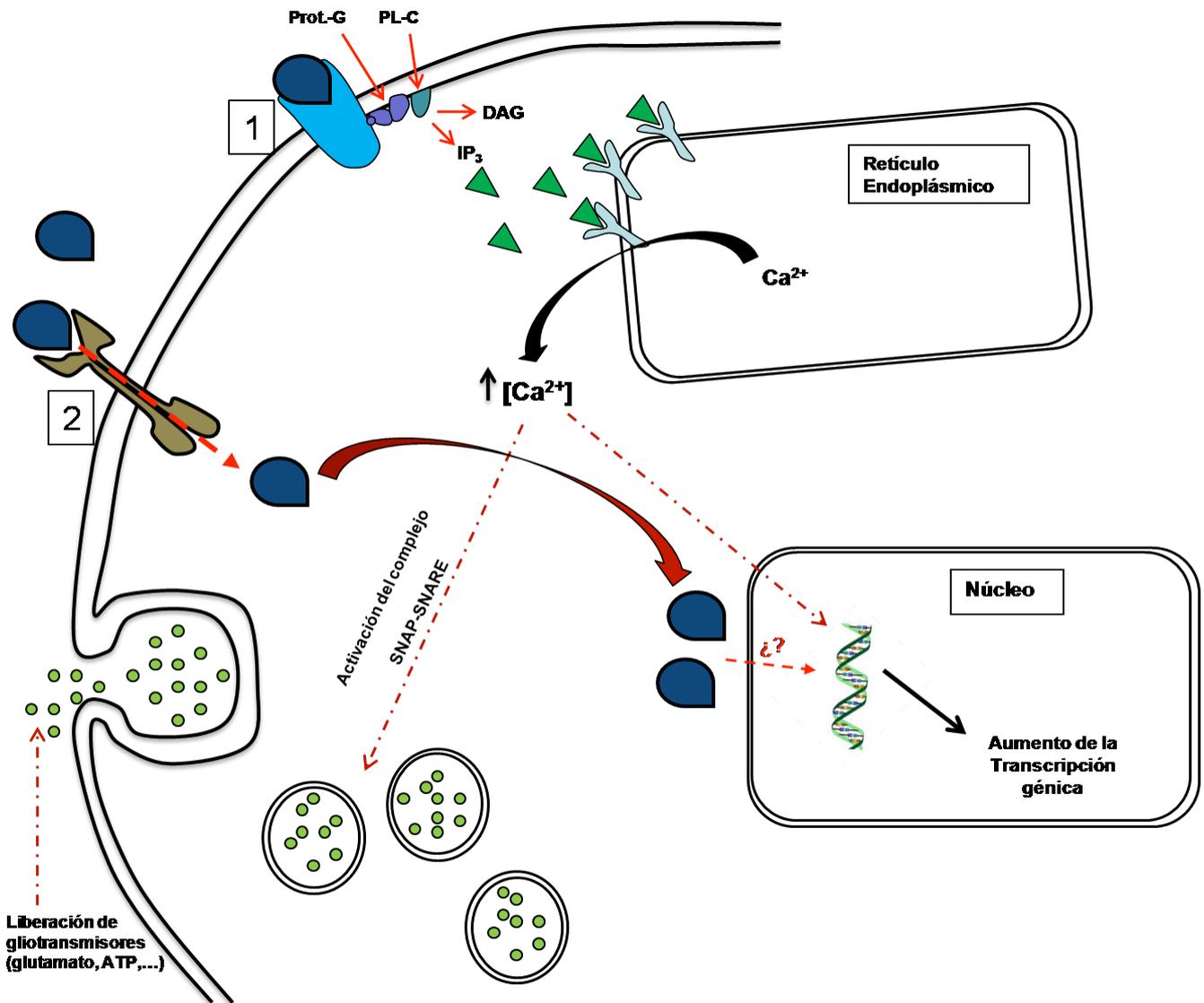
expresión de receptores de membrana para el ATP, que es otra vía de que se propague la "onda de  $\text{Ca}^{2+}$ "

Existe una teoría que propone que la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a la producción de  $\text{IP}_3$  en los astrocitos y que éste puede atravesar las uniones comunicantes y pasar a los astrocitos vecinos, desencadenando una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, generando así una onda de  $\text{Ca}^{2+}$  (Agulhon y col., 2008; Goldberg y col., 2010).

Una posible hipótesis que puede explicar cómo la aplicación de albúmina promueve el incremento de los disparos interconectados, es aquella en la que se relaciona la existencia de un receptor de membrana para la albúmina, que esté asociado a una proteína G, la cual activaría a la PLC lo que desembocaría en un incremento del  $\text{IP}_3$  en el interior del astrocito. Este  $\text{IP}_3$  pasaría, a través de las uniones comunicantes, hacia los otros astrocitos que estuvieran formando una red de astrocitos de modo que ese  $\text{IP}_3$  llegaría al RE de estos astrocitos que están más alejados del punto de entrada inicial de la albúmina y mediaría la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma de los astrocitos.

### **2.3 SÍNTESIS DE ADN MEDIADA POR LA ALBÚMINA**

En base a los datos proporcionados por algunos autores sobre la existencia de proteínas de membrana que actuarían como receptores para la albúmina, receptor de TGF- $\beta$  (Ivens y col., 2007) y la megalina (Bento-Abreu y col., 2008). Recientemente se ha mostrado que la albúmina tras unirse a los receptores TGF- $\beta$  existentes en la membrana plasmática de los astrocitos, es introducida



**Figura 30.** Posibles mecanismos por los que la albúmina produce sus efectos sobre los astrocitos. En 1, se plantea la posibilidad de la existencia de un receptor de membrana plasmática que esté unido a una proteína G (prot.-G) y a una fosfolipasa-C (PL-C). La unión de la albúmina a su receptor en la membrana plasmática, activa la fosfolipasa C (PL-C), generándose diacilglicerol (DAG) e IP<sub>3</sub>. Este último se dirigirá al retículo endoplásmico uniéndose a los receptores específicos de IP<sub>3</sub>, mediando la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmico al citosol. Este incremento en el calcio citosólico puede estimular numerosos mecanismos, como por ejemplo la exocitosis dependiente de calcio o un incremento en la síntesis de AD (Yamaguchi, 2011). En 2 se plantea la posibilidad de que la albúmina se una a receptores de membrana, como Rc TGF-β o de Megalina, que permitirán el transporte directo de ésta al interior celular y de ahí al núcleo donde mediarán el incremento en la síntesis de ADN.



en la célula (Ivens y col., 2007). Así mismo, también existen evidencias de que la albúmina se une a la proteína de membrana megalina y que es introducida en la célula al igual que en el caso anterior (Bento-Abreu y col., 2008). Tras esta introducción de la albúmina en el interior del astrocitos, se activa un mecanismo de segundo mensajero o se produce un traslado al núcleo, donde daría lugar a modificaciones en la expresión génica. Es interesante destacar que estas dos vías estudiadas, cuando se bloquean no se produce un bloqueo completo de la síntesis de ADN, por tanto debe existir al menos otro mecanismo que medie esta respuesta. En el caso de la megalina, puede aumentar la producción de factores de crecimiento como el ácido oleico (Bento-Abreu y col., 2008). En el caso del receptor de TGF- $\beta$ , puede aumentar el número de receptores del tipo TGF- $\beta$  (Ivens y col., 2007) o disminuir la expresión de canales de K<sup>+</sup> rectificadores de entrada (inward rectifier) del subtipo tipo Kir 4, disminuir a la baja la expresión del canal de agua aquaporina 4 (AQP4) (Eid y col., 2005) o estimular la proliferación celular (Ivens y col., 2007). Existe además otra posible vía para la acción mediada por la albúmina, y es su unión a receptores situados en la membrana plasmática de astrocitos, receptores que aún sin estar caracterizados es muy probable que estén unidos a proteínas G y a la PLC, propiciando el aumento de IP<sub>3</sub>. Este aumento de la concentración de IP<sub>3</sub> liberaría Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares. Es un mecanismo similar al empleado por el glutamato (ver figura 30). Además, considerando que los principales orgánulos celulares que medían la extrusión de Ca<sup>2+</sup> del citoplasma presentan un funcionamiento disminuido en los astrocitos procedentes de tejido "spk", nos encontramos con que el Ca<sup>2+</sup>



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

permanece en el citoplasma un largo periodo de tiempo permitiéndole actuar como un segundo mensajero y ser el responsable del aumento de la síntesis de ADN (Nadal y col., 1995).

Independientemente de la vía por la cual la albúmina medie su acción, se produce alteración en las conductancias de entrada de  $K^+$ . Dando lugar a un incremento de la  $[K^+]_o$  y a un gradual incremento en la concentración sináptica de glutamato, debido a la facilitación de la exocitosis, mediada por  $Ca^{2+}$ , del glutamato almacenado por los astrocitos. Todo ello, puede conllevar cambios en la plasticidad sináptica responsables de la hiperexcitabilidad y, finalmente, del desarrollo de un estado crónico de epilepsia.

No hay que olvidar el efecto de la albúmina sobre la síntesis de ADN, dato que podemos extrapolar y relacionar con las "cicatrices gliales" que se observan el cerebro de pacientes después de haber sufrido algún incidente que pudiese provocar muerte neuronal. Estos incidentes, bien pueden ser relacionados con aquellos problemas o alteraciones descritos anteriormente, que pueden ser aquellos en los que se produce un compromiso de la BHE. Situación que puede ser relacionada de nuevo con la entrada de albúmina al cerebro y la activación de dichos astrocitos.

Atendiendo a todo lo expuesto anteriormente, se es importante destacar que el incremento en el número de astrocitos, al estimularse su división celular mediante la albúmina, provocará que éstos tiendan a crear redes de astrocitos.



Es importante destacar el hecho de que los astrocitos se comunican entre sí mediante ondas de  $Ca^{2+}$  (Goldberg y col., 2010). Este sistema de comunicación intercelular se ha demostrado, en numerosas ocasiones, en cultivo celulares (Nadal y col., 1997; Scemes & Giaume, 2006; Goldberg y col., 2010) aunque existen evidencias de que esta situación ocurre también en condiciones fisiológicas (Agulhon y col., 2001).

Existen varias teorías de cómo se produce esta sincronización entre distintos astrocitos, aunque la teoría predominante es aquella en que la propagación intercelular se debe al paso de las moléculas de  $IP_3$  a través de las uniones comunicantes. Dentro del presente trabajo se ha aplicado un bloqueante reversible de las uniones comunicantes, impidiéndose el paso de  $IP_3$ , y observándose como se bloqueaba casi por completo la sincronización en la respuesta de los astrocitos en cultivo.

Teniendo en cuenta que un sólo astrocito puede estar involucrado en distintas sinapsis y por tanto influir en la activación de numerosas neuronas, es imprescindible destacar la capacidad de la que disponen los astrocitos para coordinar y sincronizar las descargas de las neuronas. Facilitando de este modo una de las características principales de las neuronas cuando se habla de epilepsia, y no es otra que la sincronización de las descargas.

Quedan aún numerosos puntos por esclarecer acerca de la participación de estos mecanismos en la epileptogénesis humana. También es importante comprobar cuál de las hipótesis de activación astrocitaria por albúmina explica realmente (en caso de que alguna de ellas lo haga) los procesos en pacientes,



aunque los resultados obtenidos por nosotros, hasta el momento, demuestran la implicación del mecanismo que utiliza  $IP_3$  y parece restar importancia a la síntesis de ADN mediada por el receptor de TGF- $\beta$  y el receptor de megalina. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se trata de astrocitos en cultivo y que, por tanto, sus propiedades pueden resultar ligeramente distintas de las observadas in vivo.

No obstante, más allá de la importancia que estos hallazgos puedan tener en el campo científico, su mayor importancia radica en las nuevas expectativas diagnósticas y terapéuticas que estos procesos abrirían. Podrían desarrollarse estrategias dirigidas a restaurar la función de la BHE, a impedir la activación de los astrocitos puestos en presencia de albúmina o a eliminar el aumento local de  $K^+$  y glutamato derivado de dicha activación. Todo ello, lógicamente, combinado con las terapias actuales que pretenden reducir la excitabilidad actuando a través de las sinapsis o los canales iónicos.



## **VI. CONCLUSIONES**



De la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones puntuales:

- Las modificaciones incluidas en el proceso de cultivo primario de astrocitos de corteza del lóbulo temporal procedente de pacientes epilépticos fármaco-resistentes, ha resultado un éxito permitiendo obtener mayor eficacia en la selección del tipo celular, astrocitos. Asegurando su funcionalidad. Y permitiendo diferenciar con éxito el tejido que dentro del quirófano fue identificado como "spk" o "no-spk".
- La albúmina funciona como un activador de los astrocitos en cultivo, procedentes de tejidos de pacientes epilépticos sometidos a cirugía. tanto si proceden de tejido "spk" como "no-spk".
- El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en astrocitos, se debe mayoritariamente a la salida de  $Ca^{2+}$  desde el RE. Esta situación es igual en astrocitos procedentes de tejido "spk" y "no-spk".
- Existe diferente capacidad a la hora del aclaramiento del  $Ca^{2+}$  por parte de los astrocitos procedentes de tejido "spk" y "no-spk", siendo menos efectiva en los primeros y que el  $Ca^{2+}$  actúe más tiempo en el astrocitos, pudiendo mediar mecanismos proepileptógenos, como la liberación excesiva de glutamato al activar el sistema SNAP-SNARE.
- Existe una predisposición de los astrocitos en cultivo procedentes de tejido "spk" al reclutamiento que produce una onda de  $Ca^{2+}$ , facilitándose así que un mayor número de astrocitos se coordinen e su actividad y



pudiendo mediar a su vez una hipersincronización en la frecuencia de descarga neuronal.

- La albúmina media un incremento en la síntesis de ADN en los astrocitos en cultivo, tanto de los "spk" como de los "no-spk". De hecho esta característica puede relacionarse con una característica importante de la glía reactiva y es la aparición de las cicatrices gliales.

Como conclusión final se puede extraer el haber demostrado que los astrocitos humanos obtenidos de áreas funcionalmente diferentes conservan algunas de las características típicas de la epilepsia focal y que, además, son capaces de responder a la albúmina como se ha demostrado en que ocurre en otros modelos.

Por tanto, se trata de un modelo que permite estudiar directamente los procesos implicados en la aparición de la epilepsia focal humana, de acuerdo con los últimos datos que implican la participación de la albúmina en la activación de los astrocitos en la epilepsia.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal  
de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



1. Adams R, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. McGraw-Hill, 6<sup>a</sup> ed, 1997: 313-343.
2. Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD . What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology. *Neuron*. 2008;59:932-946.
3. Alés E, Gabilan NH, Cano-Abad MF, Garcia AG, López MG. The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca<sup>2+</sup> in chromaffin cells. *J Biol Chem* 2000;275(48):37488-95.
4. Álvarez J, Montero M, García-SAncho J. Subcellular Ca<sup>2+</sup> dynamics. *News Physiol Sci* 1999;14:161-168.
5. Alving J. What is intractable epilepsy?. Intractable Epilepsy. Ed: Johannessen, Gram, Sillanpä, Tomson. Wrightson Biomedical Publishing; USA, 1991; pp: 1-12.
6. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate release from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 2004; 24: 6920-6927.
7. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. Calcium elevation on astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; 18:6822-6829.



8. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999; 22, 208-215.
9. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 795-813.
10. Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 2008;4:3-10.
11. Arellano JI, Muñoz A, Ballesteros-Yáñez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain.* 2004; 127(Pt 1):45-64.
12. Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, Alonso-Nanclares L, Ballesteros Yáñez I, y cols. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in the neocórtex of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease.* 2006; 22: 374 – 387.
13. Argumosa A, Herranz JL. Aspectos económicos de la epilepsia. *Rev Neurol* 2000;30 (Supl. 1): S154-S160.
14. Argumosa A, Herranz JL. La repercusión económica de las enfermedades crónicas: el costo de la epilepsia infantil en el año 2000. *Bol Pediatr* 2001;41: 23-29.
15. Arroyo S, Brodie MJ, Avanzini G, Baumgartner C, Chiron C, Dulac O, French JA, Serratosa JM. Is refractory epilepsy preventable? *Epilepsia* 2002; 43 (4):437-444.



16. Avoli M, Louvel J, Pumain R, Khöling R. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurol* 2005 ;77(3):166-200.
17. Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. En: Engel J Jr, ed. *Surgical Treatment of the Epilepsies*. New York: Raven Press; 1987:511–540.
18. Bagaglio DM, Cheng EH, Gorelick FS, Mitsui K, Nairn AC, Hait WN. Phosphorylation of elongation factor 2 in normal and malignant rat glial cells. *Cancer Res* 1993; 53:2260-2264.
19. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1-13.
20. Barres BA. New roles for glia. *J Neurosci* 1991; 11: 3685-94.
21. Beck A, Zur Nieden R, Schneider HP, Deitmer JW. Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* 2004;35:47-58.
22. Beck H. Plasticity of antiepileptic drug targets. *Epilepsia* 2007;48(suppl. 1):14-18.
23. Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Wafford K, Whiting PJ. The interaction of the general anesthetic etomidate with the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 11031-6.



24. Bento-Abreu A, Velasco A, Polo-Hernández E, Pérez-Reyes PL, Taberner A, Medina JM. Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem* 2008;106(3):49-59.
25. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):517-529.
26. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; 391: 281-5.
27. Binder DK, Steinhauser C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 2006; 54:358-36.
28. Brodie MJ y Kwan P. Staged approach to epilepsy management. *Neurology* 2002; 58 (Supl. 5):2-8
29. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA-A receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 1998; 4:1166-1172.
30. Buono RJ, Lohoff FW, Sander T, Sperling MR, O'Connor MJ, Dlugos DJ, Ryan SG, Golden GT, Zhao H, Scattergood TM, Berrettini WH, Ferraro TN. Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 2004; 58: 175-183.
31. Burgos M, Pastor MD, González JC, Martínez-Galán JR, Vaquero CF, Fradejas N, Benavides A, Hernández-Guijo JM, Tranque P, Calvo S.



- PKC $\epsilon$  upregulates voltage-dependent calcium channels in cultured astrocytes. *Glia* 2007; 55:1437-1448.
32. Cano-Abad MF, Herrera-Peco I, Sola RG, Pastor J, García-Navarrete E, Moro RC, Pizzo P, Ruiz-Nuño A. New insights on culture and calcium signalling in neurons and astrocytes from epileptic patients. *Int J Dev Neurosci* 2011;29(2):121-129.
  33. Carmignoto G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog Neurobiol* 2000; 62:561-581.
  34. Carmignoto G, Fellin T. Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *J Physiol* 2006; 99: 98–102.
  35. Cascino GD, Boon PAJM, Fish DR. Surgically remediable lesional syndromes. En: Engel J Jr (ed.): *Surgical Treatment of the Epilepsies*. 1993, 2nd ed. New York. Raven Press: 77-86.
  36. Catterall WA. Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv Neurol* 1999; 79:441-456.
  37. Cedazo-Mínguez A. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* 2007;11:1227-1238.
  38. Charles AC. Intercellular calcium waves in glia. *Glia* 1998;24(1):39-49.
  39. Chen XK, Xiong YF, Zhou Z. "Kiss and run" exocytosis in astrocytes. *Neuroscientist* 2006; 12: 375-8.



40. Chung YH, Shin CM, Kim MJ, Cha CI. Enhanced expression of L-type  $Ca^{2+}$  channels in reactive astrocytes after ischemic injury in rats. *Neurosci Lett* 2001;302:93-96.
41. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*. 2002; 298: 1418-21.
42. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for a revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981; 22: 489-501.
43. Cornell Bell AH, Finkbeiner SM.  $Ca^{2+}$  waves in astrocytes. *Cell Calcium* 1991; 12: 185-204.
44. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signalling. *Science* 1990; 247:470-473.
45. Crippa D, Schnek U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol* 2006;3:567-582.
46. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1996;271(4):F900-F907.



47. Curtis BM and Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23: 2113-2118.
48. Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 1992; 8:429-440.
49. Daubolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1-105
50. DeFelipe J. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 1999; 122:1807-1822
51. De Groot CJA, Langeveld CH, Jongenelen CAM, Montagne L, Van Der V, Dijkstra CD. Establishment of human adult astrocyte cultures derived from postmortem multiple sclerosis and control brain and spinal cord regions: Immunophenotypical and functional characterization. *J Neurosci Res* 1997;49:342-354.
52. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005;105(3):229-66.
53. De Pittà M, Goldberg M, Volman V, Berry H, Ben-Jacob E. Glutamate regulation of calcium and IP3 oscillating and pulsating dynamics in astrocytes. *J Biol Phys* 2009;35:383-411.
54. Dichter MA. Epilepsias y trastornos convulsivos. En: Harrison. Principios de Medicina Interna, 1994, Interamericana-McGraW-Hill, 13ª ed: 2558-70.
55. Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, Mayberg MR, Benge L, Janigro D. Overexpression of multiple drug



- resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001;42(12):1501-6.
56. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor of neuronal glutathione. *J Neurosci* 2002; 19: 562-9.
57. Dux E, Oschlies U, Uto A, Kusumoto M, Siklos L, Joo F, Hossmann KA. Serum prevents glutamate induced mitochondrial calcium accumulation in primary neuronal cultures. *Acta Neuropathol* 1996;92:264-322.
58. Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiry-Moghaddam M, Bjornsen LP, Spencer DD, y cols. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 1193-1198.
59. Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Laneorolle NC. Glutamate and astrocytes: key players in human mesial temporal lobe epilepsy?. *Epilepsia* 2008; 49 suppl. 2: 42-52.
60. Engel J Jr. Update on surgical treatment of the epilepsies. Summary of treatment of Epilepsies. 1992. *Neurology* 1993;43:1612-1617.
61. Engel J Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1996 A;26:141–150.
62. Engel J Jr. Early versus late surgery for intractable seizures. *Adv Exp Med Biol* 2002; 497: 99-105
63. Fellin T, Haydon PG. Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures?. *TRENDS in molecular Medicine*. 2005; 11:530-533.



64. Fiacco TA, McCarthy KD. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 722-32.
65. Fiacco TA, McCarthy KD. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation and effects on brain signaling. *Glia*. 2006; 54: 676-690.
66. Frade J, Pope S, Schmidt M, Dringen R, Barbosa R, Pocock J, Larajinha J, Heales S. Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes –a possible neuroprotective mechanism? *J Neurochem* 2008; 105:1144-52
67. García AG, Gandía L, Lopez MG and Montiel C. Calcium channels for exocytosis: functional modulation with toxins. In “Seafood toxicity: Pharmacology, Physiology and Mode of action”. Marcel Dekker, Inc 2000: 91-124.
68. García AG, García-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, García-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 2006; 86(4):1093-131.
69. Gastaut H (1973). Dictionary of epilepsy. Part I: Definitions. World Health Edition. Geneva.
70. Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1145-50.
71. Gibbons HM, Hughes SM, Van Roon-Mom W, Greenwood JM, Narayan PJ, Teoh HH, Bergin PM, Mee EW, Wood PC, Faull RLM, Dragunow M.



- Cellular composition of human glial cultures from adult biopsy brain tissue. *J Neurosci Methods* 2007; 166:89-98.
72. Giray Ö, Ülgenalp A, Bora E, Uran N, Yilmaz E, Ünalp A, Erçal D. Role of Apolipoprotein E in febrile convulsion. *Paediatric Neurology* 2008; 39(4):241-244.
73. Glauser TA. Advancing the medical management of epilepsy: disease modification and pharmacogenetics. *J Childs Neurol* 2001;17(suppl. 1):8-13.
74. Goldberg M, de Pitta M, Volman V, Berry H, Ben-Jacob E. Nonlinear Gap junctions enable long-distance propagation of pulsating calcium waves in astrocytes networks. *PLOS computational biology* 2010; 6(8):1-14.
75. Guerini D, Coletto L, Carafoli E. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4):281-289.
76. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 2007; 13: 54-63.
77. Harty TP, Rogawski MA. Felbamate block of recombinant N-Methyl-D-Aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res* 2000; 39:47-55.
78. Hauser WA (1998) Incidence and prevalence. In *Epilepsy. A Comprehensive Textbook* (3 vol), Eds. J Engel Jr, T Pedley. Vol 1, pp: 47-57 Philadelphia: Lippincott-Raven.
79. Herman ST. Epilepsy after brain insult. *Neurology*. 2002;59(supple, 5):S21-S26.



80. Herranz JL, García-Arranz P, Caviedes B, Arteaga R. Epilepsia rebelde: concepto, factores de riesgo y alternativas terapéuticas. *Rev Neurol* 1997; 25 (Supl. 4): S439-S445
81. Herrera-Peco I, Sola RG, Osejo V, Wyx R, Pastor J. Participación de los astrocitos activados mediante la albúmina en la epileptogénesis. *Rev Neurol*. 2008;47(11);582-587.
82. Herrera-Peco I, Fernández-Millares V, Pastor J, Hernando-Requejo V, Sola RG, Alonso-Cerezo C. Factores genéticos asociados a la epilepsia del lóbulo temporal. Revista: *Rev Neurol* 2009 A;49(10);541-546.
83. Herrera-Peco I, Wix-Ramos R, Domínguez-Gadea L, Meilán-Paz ML, Martínez-Chacón JL, de Dios E, Sola RG, Pastor J. Cambios en la perfusión cerebral inducidos por etomidato en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. *Rev Neurol* 2009 B; 49(11):561-565.
84. Herrera-Peco I, Ortega GJ, Hernando-Requejo V, Sola RG, Pastor J. Fuentes de voltaje en la región temporal mesial inducidas por etomidato. *Rev Neurol* 2010; 51(5):263-270.
85. Herrera-Peco I, Pastor J, Alonso-Cerezo C, Sola RG, Ortega GJ. Análisis complejo de la actividad eléctrica en la epilepsia del lóbulo temporal: Registros con electrodos de foramen oval. *Rev Neurol* 2011;52:3-12.
86. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 2004; 27: 735-43.
87. Hirase H, Qian I, Barthó P, Buzsáki G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* 2004; 2:494-496.



88. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949; 108: 37-77.
89. Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, et al. TGF- $\beta$  receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*. 2007; 130: 535-547.
90. Jean-Pierre J. ALS: astrocytes move as deadly neighbors. *Nature Neurosci*. 2007; 10(5):535-537.
91. Jensen AM, Chiu SY. Differential intracellular calcium responses to glutamate in type1 and type2 cultured brain astrocytes. *J Neurosci* 1991;11:1674-1684.
92. Keene DL, Whiting S, Ventreyra EC. Electrocorticography. *Epileptic Disord*. 2000;113:1873-1881.
93. Köhling R, Avoli M. Methodological approaches to exploring epileptic disorders in the human brain in vitro. *J Neurosc Methods* 2006; 155: 1–19.
94. Konnerth A, Orkand RK. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium. *Neurophysiol*. 1986; 56(2):409-423
95. Kwan P y Brodie MJ. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure* 2002;11:77-84.
96. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46:224-235.
97. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.



98. Lencesova L, O'Neill A, Resneck WG, Bloch RJ, Balustein MP. PLasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes. *J Biol Chemistry*. 2004;23: 2885-2893.
99. Lepore AC, Rauck B, Dejea C, Pardo AC, Rao MS, Rothstein JD, MAragakis NJ. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective ina model of motor neuron disease. *Nat Neurosci*. 2008;11:1294-1301.
100. Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search of new targets. *Epilepsy Res*. 2004; 60: 77-159
101. Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:591-602.
102. Löscher W. Drug transporters in the epileptic brain. *Epilepsia*. 2007; 48 (suppl. 1):8-13.
103. Lüders HO (1992) Epilepsy Surgery. 1 rst Edition. New York: Raven Press.
104. Lui H, Prayson RA, Estes ML, Drazba JA, Barnett GH, Bingaman W, et al. In vivo expression of the interleukin 4 receptor alpha by astrocytes in epilepsy cerebral cortex. *Cytoline*. 2000; 12: 1656-61.
105. Lynch JR, Morgan D, Mance J, Matthew WD, Laskowitz DT. Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response. *J Neuroimmunol*. 2001; 114: 107-13



106. Manning TJ Jr, Sontheimer H. Spontaneous intracellular calcium oscillations in cortical astrocytes from a patient with intractable childhood epilepsy (Rasmussen's encephalitis). *Glia*. 1997; 21:332-337.
107. Mantz J, Cordier J, Giaume C. Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Anesthesiology* 1993;78(5):892-901.
108. Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2000;95:425-432.
109. Menéndez de la Prida L, Huberfeld G, Cohen I, Miles R. Threshold Behavior in the Initiation of Hippocampal Population Bursts. *Neuron*. 2006; 49, 131–142.
110. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 1997;388(6645):882-887.
111. Moser KV, Humpel C. Blood-derived serum albumin contributes to neurodegeneration via astroglial stress fiber formation. *Pharmacology*. 2007; 80:286-292.
112. Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 1426-1430
113. Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA. Plasma albumin induces calcium waves in rat cortical astrocytes. *Glia*. 1997; 19:343-35



114. Nadal A, Fuentes E, McNaughton P. Glial cell responses to lysophospholipids bound to albumin in serum and plasma. *Prog Brain Res.* 2001; 132: 377-384.
115. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Sci USA.* 2001;98(6):3197-3202.
116. Nagele RG. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004; 25:663-674.
117. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003; 26(10):523-530.
118. Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol.* 2002; 87(1):528-537.
119. Newman EA. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci.* 1993; 13: 3333-45.
120. Oby E, Janigro D. The blood brain barrier and epilepsy. *Epilepsia.* 2006;47:1761-1774.
121. O'Connor E, Sontheimer H, Spencer D, de Lanerolle N. Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. *Epilepsia.* 1998;39:347-354.
122. Olsen RW, Chang CS, Li G, Hancher HJ, Wallner M. Fishing for allosteric sites on GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:1675-1684.



123. Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem.* 2008; 107: 589-601.
124. Ortega GJ, Sola RG, Pastor J. Complex network analysis of human ECoG data. *Neurosci Lett.* 2008;447(2-3):129-133.
125. Parri HR, Crunelli V. Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ. *Neuroreport.* 2001; 12(18):3897-3900.
126. Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* 2001; 4(8):803-812.
127. Pascual-Garvía JM, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S, Roda JM. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev Neurol.* 2004;38:565-581.
128. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci.* 1997;17(20):7817-7830.
129. Pastor J, Hernando-Requejo V, Dominguez-Gadea L, de Llano I, Meilan-Paz ML, Martínez-Chacón JL, y cols. Impacto de la experiencia sobre los resultados quirúrgicos en la epilepsia del lóbulo temporal. *Rev Neurol.* 2005;41(12): 709-716.



130. Pastor J, Uzcátegui YG, Gal B, Ortega GJ, Sola RG, Menéndez de la Prida L. Bases Fisiopatológicas de la Epilepsia del Lóbulo Temporal: estudios en humanos y animales. *Rev Neurol*. 2006; 42(11): 663-673.
131. Pastor J, Domínguez-Gadea L, Sola RG, Hernando V, Meilán ML, de Dios E. First true initial ictal SPECT in partial epilepsy verified by electroencephalography. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4(1):305-309.
132. Pastor J, Wix R, Meilán ML, Martínez-Chacón JL, de Dios E, Domínguez-Gadea L, Herrera-Peco I, Sola RG. Etomidate accurately localizes the epileptic area in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2010; 51(4):602-609.
133. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005; 50: 427-434.
134. Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR, Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2004; 24:8629-8639.
135. Perea G, Araque A. Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. *Rev Neurol*. 2003; 36(2):137-144.
136. Perea G, and Araque A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*. 2005; 38:375-382.
137. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosci*. 2009;32(8):421-431.
138. Perea G, and Araque A. Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science*. 2007; 317: 1083-1086.



139. Perea G, Navarrete M, Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009;32(8):421-431.
140. Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: Academic Press, 1996. pp xx, 432.
141. Picot MC, Baldy-Moulinier M, Daurès JP, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a western european country. *Epilepsia.* 2008;49(7):1230-1238.
142. Pineda S, Gale KA crucial epileptogenic site in the deep piriform cortex. *Nature.* 1985; 317: 623-625.
143. Porter R (1987). *Epilepsia*, Ed. Científica Interamericana S.A
144. Posse de Chaves E, Narayanaswami V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and diseases in the brain. *Future Lipidol.* 2008;3(5):505-530.
145. Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MG, Schrama LH, van Veelen CW, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PN. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2002;125:32-43.
146. Ramón y Cajal S. Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Científicas.* 1913; 11: 255-315 (Biblioteca Cajaliana, n.º 3291).
147. R ath M, F ohr KJ, Weigt HU, Gauss A, Engele J, Georgieff M, et al. Etomidate reduces glutamate uptake in rat cultures glial cells: involvement of PKA. *J Pharmacol.* 2008; 155: 925-33.



148. Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 2006;129:18-35.
149. Rose CR, Ransom BR. Gap junction equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia*. 1997; 20:299-307.
150. Rosenow F, Lüders HO. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain* 2001;124:1683-1700.
151. Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*. 2000; 23: 618-25.
152. Salanova V, Markand O, Worth R. Longitudinal follow-up in 145 patients with medically refractory temporal lobe epilepsy treated surgically between 1984 and 1995. *Epilepsia*. 1999; 40(10):1417-23.
153. Sander JW. The problem of the drug –resistant epilepsies. *Novartis Found Symp*. 2002; 243:4-12
154. Scemes E, Giaume C. Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia*. 2006;54:716-725.
155. Schuele S, Lüders H. Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *Lancet Neurol*. 2008; 7: 514–24.
156. Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, y cols. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci*. 2004 Sep 8; 24(36):7829-36.
157. Seiffert G, Schilling K, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:194-206.



158. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Reviews*. 2004; 45:250-265.
159. Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, Thom M. Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet*. 2001;357(9249):42-43.
160. Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*. 2002;125(Pt. 1)22-31.
161. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32:638-647.
162. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119:7-35.
163. Sola RG, Hernando V, Pastor J, Navarrete EG, de Felipe J, Alijarde MT, Sánchez A, Domínguez-Gadea L, Martín-Plasencia P, Maestú F, DeFelipe-Oroquieta J, Ramón-Cajal S, Pulido-Rivas P. Epilepsia farmacorresistente del lóbulo temporal. Exploración con electrodos del foramen oval y resultados quirúrgicos. *Rev Neurol*. 2005; 41: 4-16.
164. Sul JY, Orosz G, Givens RS, Haydon PG. Astrocytic connectivity in the hippocampus. *Neuron Glia Biol*. 2004; 1: 3-11.
165. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*. 1989; 26: 321–330
166. Tabernero A, Medina A, Sánchez-Abarca LI, Lavado E, Medina JM. The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about



- through the control of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia*. 1999; 25:1-9.
167. Tamayo-Orrego L, Duque-Parra JE. Regulación metabólica de la microcirculación cerebral. *Rev Neurol*. 2007; 44: 415-25.
168. Tessler S, Danbolt NC, Faull RL, Storm-Mathisen J, Emson PC. Expression of the glutamate transporters in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1999; 88: 1083-91.
169. Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, y cols. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*. 2005;11:973-981.
170. Tian GF, Takano T, Lin JHC, Wang X, Bekar L, Nedergaard M. Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 773-787.
171. Tigyi G, Henschen A, Mileidi R. A factor that activates oscillatory chloride currents in *Xenopus* oocytes copurifies with a subfraction of serum albumin. *J Biol Chem*. 1991; 266: 20602-20609.
172. Tigyi G, Mileidi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activates membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurites retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*. 1992; 267: 21360-21367.
173. Tomkins O, Friedman O, Ivens S, Reiffurth C, Major S, Dreier JP, y cols. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Disease*. 2007; 25:367-377.
174. Truong K, Sawano A, Miyawaki A, Ikura M. Protein engineering protocols: Calcium indicators based on calmodulin-fluorescent protein fusions.



- Arendt KM & Müller KM eds. *Methods in Molecular Biology*. 2007. Vol. 352.
175. Tuxhorn I, Holthausen H, Boenigk HE, eds. *Paediatric Epilepsy Syndromes and Their Surgical Treatment*. London: John Libbey; 1997:924
176. Uto A, Dux E, Hossmann KA. Effect of serum on intracellular calcium homeostasis and survival of primary cortical and hippocampal CA1 neurons following brief glutamate treatment. *Metab Brain Dis*. 1994;9:333-345.
177. Vanlersberg C, Camu F. Etomidate and other non-barbiturates. *Hand Exp Pharmacol*. 2008;182:275-282.
178. van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2007; 130(Pt 2):521-34.
179. Vasington FD. Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J Biol Chem*. 1963; 238:1841-1847.
180. Veerhuis R, Janssen I, Hoozemans JJ, De Groot CJ, Hack CE, Eikelenboom P. Complement C1-inhibitor expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1998; 96(3):287-96.
181. Verkhartsy A, Trotter NJ, Kettenmann H. Cultured glial precursor cells from mouse cortex express two types of calcium currents. *Neurosci Lett*. 1990; 112:194-198.
182. Vermeulen RJ, Jongenelen CAM, Langeveld CH, Wolters ECH, Stoof JC, Drukarch B. Dopamine D1 receptor agonists display a different intrinsic



- activity in rat, monkey and human astrocytes. *Eur J Pharmacol.* 1994; 269:121-125.
183. Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:57-71.
184. Villanueva V y Sola RG (2009). Tratamiento quirúrgico de las lesiones inductoras de crisis epilépticas. Cirugía de la epilepsia. Límites entre la cirugía lesional y la cirugía de la epilepsia. Resultados de cirugía de la epilepsia. En J Sánchez Álvarez y M Arráez Sánchez. *Diagnóstico y tratamiento de las crisis epilépticas*; 183-221.
185. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolutions continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005 6:626-640.
186. Voss LJ, Sleight JW, Barnard JPM, Kirsch HE. The howling cortex: seizures and general anesthetic drugs. *Anesth Analg.* 2008; 107: 1689-703.
187. Vreugdenhil M, Hoogland G, van Veelen CW, Wadman WJ. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2004; 19(10):2769-78.
188. Walz W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 2000; 36: 291-300.
189. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;4:842-857.



190. Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*. 2008; 58: 168-178.
191. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *New England J Medicine*. 2001; 5:311-318
192. Wieser GH, Schwarz U. Topography of foramen ovale electrodes by 3D image reconstruction. *Clin Neurophysiol*. 2001;112: 2053-6.
193. Wilson SB, Emerson R. Spike detection: A review and comparison of algorithms. *Clin Neurophysiol*. 2002; 113:1873-1881.
194. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 2003;9:453-457.
195. Wyler AR, Hermann BP, eds. The Surgical Management of Epilepsy. Boston: Butterworth-Heinemann; 1994.
196. Xu JH, Long L, Tang YC, Hu HT, Tang FR. Ca(v)1.2, Ca(v)1.3, and Ca(v)2.1 in the mouse hippocampus during and after pilocarpine induced status epilepticus. *Hippocampus*. 2007;17:235-251.
197. Yamaguchi M. Regucalcin and cell regulation: Role as a suppressor protein in signal transduction. *Mol Cell Biochem*. 2011 Mar 24. PMID: 21431902.
198. Zambrano MT, Támara EC, Ballestas JMC. Refractory epilepsy: new insights. *Acta Neurol Colomb*. 2007;23(4): 278-285.
199. Zarranz JJ. Epilepsias. En: Farreras, Rothman. Medicina Interna; 14<sup>a</sup> edición, 2000, Ediciones Harcourt.



*Efecto de la albúmina sobre astrocitos en cultivo procedentes de corteza temporal de pacientes epilépticos fármaco-resistentes*

200. Zonta M , Carmignoto G. Calcium oscillations encoding neuron-to-astrocyte communication. *J Physiol Paris*. 2002; 96:193-198.
201. Zumsteg D, Friedman A, Wieser H, Wennberg R. Propagation of interictal discharges in temporal lobe epilepsy: Correlation of spatiotemporal mapping with intracranial foramen ovale electrode recordings. *Clinical Neurophysiology*. 2006; 117: 2615–26