



## ORIGINAL

# Evaluación temporal del efecto del *status epilepticus* inducido en la rata en desarrollo en la concentración cerebelar de ácido $\gamma$ -aminobutírico y glutamato



D. Hernández-Martínez<sup>a</sup>, L. Rocha<sup>b</sup>, J. Martínez-Quiroz<sup>c</sup>, C. Morgado-Valle<sup>a</sup>, J. Manzo<sup>a</sup> y M.L. López-Meraz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

<sup>b</sup> Departamento de Farmacobiología, Cinvestav Sede Sur, Ciudad de México, México

<sup>c</sup> Dirección General de Servicios Periciales, Xalapa, Veracruz, México

Recibido el 6 de junio de 2016; aceptado el 20 de julio de 2016

Accesible en línea el 25 de octubre de 2016

### PALABRAS CLAVE

*Status epilepticus*;  
Cerebelo;  
Ácido  
 $\gamma$ -aminobutírico;  
Glutamato

### Resumen

**Introducción:** El *status epilepticus* (SE) es un tipo de actividad epiléptica que causa atrofia cerebelar y pérdida de células de Purkinje en humanos y en animales de experimentación. El cerebelo es una región con alto contenido de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutamato, y algunos estudios refieren cambios en su concentración después de las convulsiones. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que hayan analizado su efecto en diferentes regiones cerebelares en ratas en desarrollo. El objetivo del presente estudio fue realizar un curso temporal del efecto del SE inducido en ratas Wistar de 14 días de edad (P14) sobre el contenido tisular de GABA y glutamato en el vermis y los hemisferios cerebelares.

**Métodos:** El SE se indujo con el modelo de litio-pilocarpina; las ratas control se inyectaron con salina. Seis h, 24 h o 30 días después del inicio del SE o de la aplicación de solución salina, las ratas se anestesiaron y decapitaron, se extrajo su cerebelo y se separaron el vermis y los hemisferios. Las ratas de ambos grupos se anestesiaron y decapitaron, se extrajo su cerebelo y se separaron el vermis y los hemisferios. Ambas regiones se homogeneizaron (ácido perclórico 0,1 M conteniendo metabisulfito de sodio 4 mM) y centrifugaron, y el sobrenadante se empleó para cuantificar la concentración tisular de GABA y glutamato por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector fluorométrico.

**Resultados:** El SE no modificó la concentración de GABA y glutamato a los diferentes tiempos de análisis ni en el vermis ni en los hemisferios cerebelares.

**Conclusiones:** El cerebelo en desarrollo es resistente a los cambios neuroquímicos a corto y largo plazo producidos por el SE.

© 2016 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [leonorlopez@uv.mx](mailto:leonorlopez@uv.mx) (M.L. López-Meraz).

**KEYWORDS**

*Status epilepticus*;  
Cerebellum;  
 $\gamma$ -amino butyric acid;  
Glutamate

### Time course of the effect of *status epilepticus* induced in the developing rat on $\gamma$ -amino butyric acid and glutamate cerebellar concentration

**Abstract**

**Introduction:** *Status epilepticus* (SE) is an epileptic condition that can cause cerebellar atrophy and loss of Purkinje cells in both humans and research animals. Cerebellum is a region rich in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate, and some studies have shown that their concentrations may be altered after convulsions. However, there are no studies showing the effect of seizures on different cerebellar regions in developing rats. Time course of the effect of *status epilepticus* induced in the developing rat on  $\gamma$ -amino butyric acid and glutamate cerebellar concentration.

**Methods:** SE was induced using the lithium-pilocarpine model; control rats were injected with saline solution. At 6 h, 24 h, and 1 month after SE or saline injection, rats were anaesthetised with pentobarbital and decapitated, and cerebella were extracted. The vermis and hemispheres were dissected and homogenised in 0.1 M perchloric acid containing 4 mM sodium bisulfite. Homogenates were centrifuged and supernatant was used to quantify GABA, and glutamate tissue concentrations by HPLC coupled with fluorometric detection.

**Results:** SE did not alter GABA and glutamate tissue concentration in the cerebellar vermis and hemispheres.

**Conclusion:** The developing rat cerebellum is resistant to both short- and long-term neurochemical changes induced by SE.

© 2016 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

Recientemente la Liga Internacional contra la Epilepsia propuso una nueva definición para el *status epilepticus* (SE), definiéndolo conceptualmente como un trastorno que resulta ya sea de una falla en los mecanismos responsables de la terminación de las crisis o de la iniciación de mecanismos que conducen a crisis anormalmente prolongadas. Este trastorno tiene consecuencias a largo plazo, incluyendo muerte neuronal, daño neuronal y alteración de las redes neuronales, dependiendo del tipo y de la duración de las crisis<sup>1</sup>. El SE es considerado la forma más extrema de una crisis<sup>2</sup> y su incidencia en la población varía considerando diferentes factores, incluyendo la edad, la etnicidad, la genética y el estatus socioeconómico<sup>3</sup>. Lo cierto es que al considerar los resultados obtenidos en 5 estudios epidemiológicos realizados en poblaciones específicas en Europa y los Estados Unidos, se observó una mayor incidencia de SE convulsivo en niños menores de uno o 5 años de edad<sup>3</sup>. Lo anterior hace a esta población pediátrica importante-mente vulnerable a este tipo de actividad epiléptica y a sus consecuencias.

El cerebelo es una estructura cuyo desarrollo se inicia durante el período embrionario temprano y finaliza posnatalmente<sup>4,5</sup>. Participa en funciones como el equilibrio, el control del movimiento y postural, y el aprendizaje motor<sup>5,6</sup>, aunque recientemente también se ha destacado su participación en las conductas sexual<sup>7-9</sup> y adictiva<sup>10</sup>. A diferencia de otras enfermedades del sistema nervioso central, tales como las ataxias y el autismo<sup>11,12</sup>, el cerebelo no es una región clásicamente relacionada con la epilepsia.

Sin embargo, varios estudios muestran que la modulación de la función cerebelar puede tener efectos antiepilépticos o anticonvulsivantes<sup>13-16</sup>. Además, se ha demostrado que pacientes con epilepsia o que presentaron SE muestran atrofia cerebelar<sup>17-20</sup> y pérdida de células de Purkinje<sup>21-23</sup>, y este efecto ha sido también observado utilizando modelos experimentales de epilepsia<sup>24-26</sup>. El cerebelo es una región rica en aminoácidos, principalmente el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutamato, pues las células de Purkinje y las granulares (las más abundantes en el cerebro) los emplean como neurotransmisores inhibitorio y excitatorio, respectivamente, para integrar la información que entra y sale de este<sup>27</sup>.

Las consecuencias de la actividad epiléptica en la neuroquímica cerebelar han sido poco exploradas, sobre todo en el cerebro en desarrollo. Se sabe que las crisis hipertérmicas inducidas en ratas de 10 días de edad promueven una disminución en la concentración de GABA, taurina y alanina, así como un aumento del ácido aspártico en el cerebelo completo, 24 h después de las convulsiones<sup>28</sup>. El SE producido en ratas de 14 días de edad no modificó la concentración tisular de GABA ni de glutamato cerebelar cuando se analizaron 24 h después de las convulsiones<sup>29</sup>. Considerando la evidencia anterior, resulta importante evaluar si inmediatamente después del SE, o bien a largo plazo, pueden observarse cambios en la concentración de estos neurotransmisores. El objetivo del presente estudio fue realizar un curso temporal del efecto del SE inducido con el modelo de litio-pilocarpina en ratas en desarrollo sobre la concentración tisular de GABA y glutamato en el vermis y los hemisferios cerebelares.

## Métodos

### Sujetos experimentales

Se emplearon 36 ratas de la cepa Wistar de ambos sexos y de 14 días de edad posnatal (P14) al momento de inducir las convulsiones (peso corporal de 25-30 g), las cuales fueron criadas en el bioterio del Centro de Investigaciones Cerebrales de la Universidad Veracruzana. El día de nacimiento fue considerado como el día posnatal cero (P0). Las crías se mantuvieron con sus madres (hasta el final del experimento o hasta el día del destete durante el día posnatal 21, según el caso) en cajas de acrílico transparente (15 × 24 × 37 cm). En el caso de las ratas adultas, se emplearon solo machos, los cuales se alojaron en cajas colectivas de acrílico (20 × 30 × 50 cm). En todos los casos, las ratas se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad ambientales, con ciclos luz-oscuridad normales de 12 h (8:00 a 20:00 h) y con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos éticos nacionales e internacionales indicados en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de investigación (NOM-062-ZOO-1999), así como en la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio del *National Research Council* versión 2011.

### Grupos experimentales

Las ratas se dividieron en 6 grupos experimentales. Una vez inducido el SE, las ratas se eutanzaron 6 h, 24 h o 30 días posteriores al evento epiléptico; los grupos control (sin convulsiones) se manipularon y eutanzaron a los mismos tiempos indicados que los grupos con SE (n = 6 por grupo).

### Inducción del *status epilepticus* con litio-pilocarpina

Las ratas se inyectaron con cloruro de litio (3 mEq/Kg, i.p.) durante el día posnatal 13, y 20 h después, durante el día posnatal 14, se indujo el SE mediante la administración de clorhidrato de pilocarpina (100 mg/kg, s.c.). La manifestación conductual del SE fue monitorizada según la escala de Haas et al.<sup>30</sup> y solo aquellos animales que lo desarrollaron se incluyeron en el estudio. Los grupos controles fueron inyectados con cloruro de litio y solución salina. Todas las ratas se rehidrataron con solución salina glucosada (5%) 7 h después del inicio del experimento (1 ml, s.c.) e inmediatamente regresaron con su madre. Este tiempo se eligió porque las convulsiones ya habían cesado en las ratas con SE. El tiempo de separación de las crías y su madre fue similar en los grupos control y SE.

### Procesamiento del tejido

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), se decapitaron e inmediatamente después se extrajo el cerebelo en frío (aproximadamente 4 °C utilizando hielo *frappé*), y se separaron el vermis y los hemisferios (ambos hemisferios se procesaron conjuntamente).

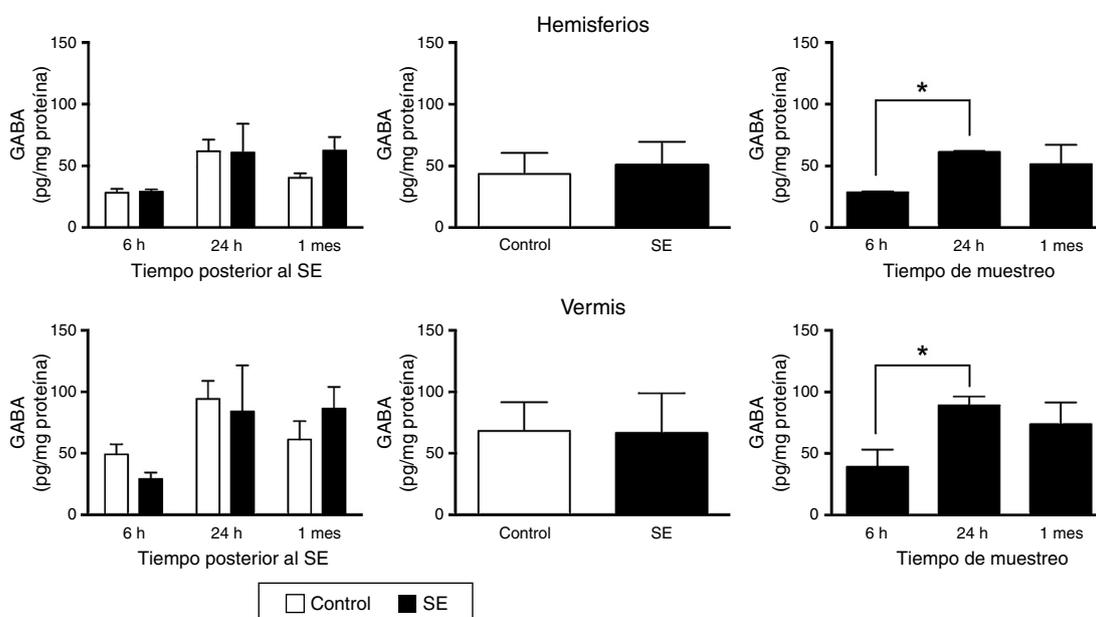
Posteriormente, el tejido cerebelar se homogeneizó mecánicamente adicionando 30 µl de ácido perclórico 0,2 N (HClO<sub>4</sub>, Baker) y metabisulfito de sodio (Baker, S-1516) por cada 10 mg de tejido. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 min a 4 °C y los sobrenadantes se recolectaron y se filtraron (filtros HV de 0,45 µm tamaño de poro, Milipore). Los filtrados y el sedimento se almacenaron a -70 °C hasta que se realizó la cuantificación de aminoácidos y de proteínas.

### Determinación del contenido tisular de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución

La separación y cuantificación de GABA y glutamato en los hemisferios y el vermis cerebelares se llevaron a cabo considerando el procedimiento descrito por Luna-Munguía et al.<sup>31</sup>. Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia (Waters modelo 474), así como una precolumna Nova-Pack C18 (4 µm-60 A [3,9 × 20]) y una columna de fase reversa Nova-Pack C18 (4 µm-60 A [3,9-150]). El detector de fluorescencia operó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. La determinación de aminoácidos se realizó preparando una dilución del sobrenadante (1:250-1:450), para posteriormente mezclar 20 µl de la muestra con 6 µl del agente derivatizante, e inyectar esta mezcla manualmente (25 µl) al cromatógrafo 2 min después de iniciada la reacción. El agente derivatizante se preparó mezclando 4,7 mg de o-ftaldialdehído (OPA), 94 µl de metanol, 0,874 ml de tetraborato de potasio 0,4 M y 8,8 µl de 2-β-mercapto etanol 0,116 M. La separación cromatográfica se realizó utilizando un sistema binario de gradiente. La fase móvil A consistió en una solución amortiguadora de acetato de sodio 40 mM en metanol al 10 (pH a 6,7). La fase móvil B consistió en una solución amortiguadora de acetato de sodio 8 mM y metanol al 80% (pH 5,7). El perfil de elusión se realizó como se describe a continuación: a 0 min 77% A, 23% B; 1 min 55% A, 45% B; 6,5 min 30% A, 70% B; 11-13 min 3% A, 97% B; 16 min 77% A, 23% B. El flujo se mantuvo a 0,5 ml/min. La concentración tisular de GABA y glutamato se determinó por medio de un análisis de regresión lineal utilizando el sistema Milenium (Waters®), a partir de una curva de calibración (100, 300 y 500 ng/ml) de un estándar externo de GABA y glutamato. La concentración de aminoácidos se expresó en pg/mg de proteína.

### Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de las proteínas se realizó con la técnica de Bradford (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, Biorad) utilizando el sedimento remanente en los homogeneizados cerebelares. Para este fin, se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (Sigma). La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 595 nm utilizando un lector de microplacas (Molecular- Devices, Spectra Max 190).



**Figura 1** Concentración tisular del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en los hemisferios y el vermis cerebelares después del *status epilepticus* (SE). En el panel de la izquierda se muestra el curso temporal de la concentración de GABA después del SE. En el panel medio se presenta el efecto del tratamiento, ya sea control o SE, en la concentración tisular de GABA, independientemente del tiempo de análisis. En el panel de la derecha se indica la concentración de GABA a los diferentes tiempos de análisis considerando ambos grupos experimentales. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de la concentración de glutamato ( $n=6$  por grupo experimental). \* $p < 0,05$ .

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con una ANOVA de 2 vías para grupos independientes teniendo como factores el tratamiento (control y SE) y el tiempo de evaluación (6 h, 24 h y un mes) y siendo las variables respuestas la concentración de los aminoácidos. Se empleó la prueba de Tukey de comparación múltiple para identificar diferencias entre los factores. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) y se consideró un nivel de significación menor a 0,05.

### Resultados

Todas las ratas del estudio presentaron SE con una duración de 5 a 6 h. La severidad máxima de las convulsiones correspondió al nivel 5, pues las ratas presentaron crisis generalizadas caracterizadas por mioclonus bilateral de las extremidades anteriores y postura de canguro, ya sea con pérdida o no de la postura.

El análisis de varianza de 2 vías mostró que existen diferencias en el contenido tisular de GABA en los hemisferios considerando el tiempo de análisis ( $F_{(2,30)} = 4,47$ ;  $p = 0,0199$ ), pero no debido a la inducción del SE ( $F_{(1,30)} = 0,645$ ;  $p = 0,4282$ ) o a la interacción entre el SE y el tiempo de evaluación ( $F_{(2,30)} = 0,651$ ;  $p = 0,5299$ ). Un efecto similar se observó en el vermis, pues el análisis estadístico identificó diferencias en la concentración tisular de GABA debido al tiempo de análisis ( $F_{(2,30)} = 3,5$ ;  $p = 0,0430$ ), pero no debido al SE ( $F_{(1,30)} = 0,010$ ;  $p = 0,9190$ ) ni a la interacción entre la inducción del SE y el tiempo transcurrido hasta el

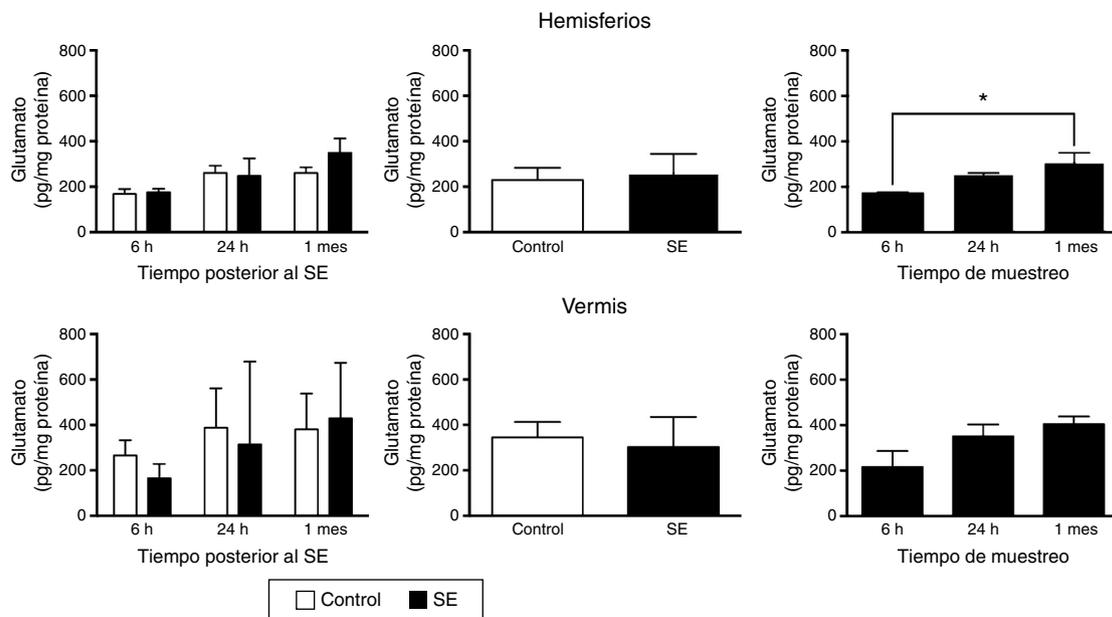
análisis ( $F_{(2,30)} = 0,749$ ;  $p = 0,4813$ ). La prueba *post hoc* mostró que existe una mayor concentración tisular de GABA en los hemisferios ( $p < 0,05$ ) y el vermis ( $p < 0,05$ ) evaluados a las 24 h con respecto al periodo de 6 h (fig. 1).

Con respecto al glutamato, el análisis de varianza de 2 vías mostró diferencias en el contenido tisular de este aminoácido en los hemisferios cerebelares considerando el tiempo de análisis ( $F_{(1,30)} = 4,37$ ,  $p = 0,0216$ ), pero no debido a la inducción del SE ( $F_{(1,30)} = 0,556$ ;  $p = 0,4615$ ) o a la interacción entre el SE y el tiempo de evaluación ( $F_{(2,30)} = 0,710$ ;  $p = 0,4995$ ). La prueba *post hoc* mostró que existe una menor concentración tisular de glutamato en los hemisferios evaluados a las 6 h con respecto al análisis realizado un mes después ( $p < 0,05$ ). La concentración tisular de glutamato en el vermis cerebelar no se modificó debido al tiempo de análisis ( $F_{(2,30)} = 2,67$ ;  $p = 0,0855$ ), ni al SE ( $F_{(1,30)} = 371$ ;  $p = 0,5473$ ) y no se detectó ninguna interacción entre estos 2 factores ( $F_{(2,30)} = 0,44$ ;  $p = 0,6481$ ) (fig. 2).

### Discusión

Los resultados de este estudio muestran que el SE inducido en ratas de 14 días de edad no modifica, de forma aguda ni a largo plazo, la concentración tisular de GABA y glutamato en el cerebelo, ya sea a nivel del vermis o de los hemisferios.

Las causas y consecuencias del SE han sido estudiadas en gran medida empleando modelos experimentales que mimetizan este tipo de actividad epiléptica. El modelo de litio-pilocarpina utilizado en este estudio, se ha empleado para estudiar el SE durante el desarrollo ya que reproduce las manifestaciones motoras y causa daño neuronal en diversas regiones cerebrales<sup>32-35</sup>. Los hallazgos aquí



**Figura 2** Concentración tisular de glutamato en los hemisferios y el vermis cerebelares después del *status epilepticus* (SE). En el panel de la izquierda se muestra el curso temporal de la concentración de glutamato después del SE. En el panel medio se presenta el efecto del tratamiento, ya sea control o SE, en la concentración tisular de glutamato, independientemente del tiempo de análisis. En el panel de la derecha se indica la concentración de glutamato a los diferentes tiempos de análisis considerando ambos grupos experimentales. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de la concentración de glutamato ( $n = 6$  por grupo experimental). \* $p < 0,05$ .

presentados evidencian que la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica cerebelar en la rata en desarrollo no es dramáticamente afectada por un trastorno tan agresivo como lo es el SE, ya sea inmediatamente luego de las convulsiones, un día después durante la etapa postictal o a largo plazo. Pocos estudios han evaluado las consecuencias del SE en la concentración extracelular de aminoácidos cerebelares. Previamente se reportó que el SE inducido en ratas de 14 días de edad no modificó la concentración tisular de GABA ni de glutamato en el vermis y los hemisferios cerebelares, pero sí aumentó los niveles tisulares de alanina, taurina y glutamina en los hemisferios al ser evaluados 24 h después de las convulsiones. Este efecto fue acompañado de una ausencia de cambios en la unión de radioligando a los receptores GABA<sub>A</sub> en el vermis cerebelar<sup>29</sup>. Se sabe que las crisis hipertérmicas producidas en ratas de 10 días de edad promueven un aumento de aspartato en el cerebelo completo, mientras que la concentración de otros aminoácidos, como el GABA y el glutamato, disminuye un día después de las convulsiones<sup>28</sup>. El hecho de que el SE no promueva cambios en la concentración tisular de GABA y glutamato sugiere que el cerebelo en desarrollo presenta resistencia a los cambios producidos por las convulsiones, aun si estas se presentan durante varias horas. Lo anterior puede ir de la mano con los cambios propios del desarrollo del cerebro de la rata y su neuroplasticidad<sup>36</sup>. De hecho, se sabe que el SE produce en la rata daño neural con un patrón anatómico y de una intensidad diferente dependiendo de la edad a la cual se induzca; así mismo, una menor proporción de ratas presentan crisis epilépticas espontáneas debido al SE cuando este se induce en ratas de 2 semanas de edad en comparación con aquellas de 3 o 4 semanas de vida<sup>32</sup>.

Los resultados mostraron que la concentración tisular de GABA, tanto en los hemisferios como en el vermis cerebelar,

resultó mayor cuando se evaluó 24 h después de las convulsiones, o de la manipulación con solución salina en el caso de las ratas control, es decir, cuando las ratas tenían 14 días de edad, que 6 h después de la recolección de las muestras, es decir, cuando las ratas tenían 13 días de edad. Mientras tanto, la concentración tisular de glutamato fue mayor un mes después del SE o de la manipulación en comparación con las muestras obtenidas a las 6 h. Estos hallazgos sugieren que los cambios pueden deberse al proceso propio de maduración del cerebelo de la rata, pues se sabe que posnatalmente y hasta alrededor de los 25 días de edad existe una prominente tasa de proliferación celular y neurogénesis<sup>37</sup>. Además, se sabe que las sinapsis GABAérgicas se forman durante la segunda y tercera semanas de vida<sup>38</sup>.

En conclusión, el presente estudio mostró que el SE producido en ratas de 14 días de edad no modifica la concentración tisular de GABA ni de glutamato, ni a corto ni a largo plazo, en el vermis o los hemisferios cerebelares, efecto que puede deberse a la neuroplasticidad propia de esta región del encéfalo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionado con el artículo.

## Agradecimientos

A la Secretaría de Educación Pública (SEP) de México por el apoyo otorgado a MLLM a través del Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) como nuevo profesor de tiempo completo (PROMEP/103.5/10/5006). Al Programa

Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) de la SEP por el apoyo al Cuerpo Académico de Neurofisiología (UV-CA-333).

## Bibliografía

1. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus — Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015;56:1515–23.
2. Trinka E, Hofler J, Zerbs A. Causes of status epilepticus. *Epilepsia*. 2012;53(Suppl. 4):127–38.
3. Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, Bedford H, Scott RC. The epidemiology of convulsive status epilepticus in children: A critical review. *Epilepsia*. 2007;48:1652–63.
4. Hamori I. Anatomy and neurochemical anatomy of the cerebellum. En: Platakis A, editor. *Cerebellar degenerations: Clinical neurobiology*. Kluwer Academic Publishers; 1992. p. 11–57.
5. Ito M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*. 2006;78:272–303.
6. Voogd J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*. 1998;21:370–5.
7. Manzo J, Miquel M, Toledo R, Mayor-Mar JA, Garcia LI, Aranda-Abreu GE, et al. Fos expression at the cerebellum following non-contact arousal and mating behavior in male rats. *Physiol Behav*. 2008;93:357–63.
8. Paredes-Ramos P, Pfaus JG, Miquel M, Manzo J, Coria-Avila GA. Sexual reward induces Fos in the cerebellum of female rats. *Physiol Behav*. 2011;102:143–8.
9. Perez-Pouchoulen M, Toledo R, Garcia LI, Perez-Estudillo CA, Coria-Avila GA, Hernandez ME, et al. Androgen receptors in Purkinje neurons are modulated by systemic testosterone and sexual training in a region-specific manner in the male rat. *Physiol Behav*. 2016;156:191–8.
10. Carbo-Gas M, Vazquez-Sanroman D, Aguirre-Manzo L, Coria-Avila GA, Manzo J, Sanchis-Segura C, et al. Involving the cerebellum in cocaine-induced memory: pattern of cFos expression in mice trained to acquire conditioned preference for cocaine. *Addict Biol*. 2014;19:61–76.
11. Matilla-Dueñas A, Ashizawa T, Brice A, Magri S, McFarland KN, Pandolfo M, et al. Consensus paper: Pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum*. 2014;13:269–302.
12. Stoodley CJ. Distinct regions of the cerebellum show gray matter decreases in autism, ADHD, and developmental dyslexia. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:92.
13. Dow RS, Fernandez-Guardiola A, Mannie E. The influence of the cerebellum on experimental epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1962;14:383–98.
14. Miller JW1, Gray BC, Turner GM. Role of the fastigial nucleus in generalized seizures as demonstrated by GABA agonist microinjections. *Epilepsia*. 1993;34:973–8.
15. Rubio C, Custodio V, Juárez F, Paz C. Stimulation of the superior cerebellar peduncle during the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Res*. 2004;1010:151–5.
16. Torres CV, Pastor J, Navarrete EG, Sola RG. Deep brain stimulation for refractory epilepsy: Extrathalamic targets. *Rev Neurol*. 2011;53:153–64.
17. Afifi AK, van Allen MW. Cerebellar atrophy in epilepsy. Pneumographic and histological documentation of a case with psychosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1968;31:169–74.
18. Sandok EK, O'Brien TJ, Jack CR, So EL. Significance of cerebellar atrophy in intractable temporal lobe epilepsy: A quantitative MRI study. *Epilepsia*. 2000;41:1315–20.
19. McDonald CR, Hagler DJ Jr, Ahmadi ME, Tecoma E, Iragui V, Dale AM, et al. Sub-cortical and cerebellar atrophy in mesial temporal lobe epilepsy revealed by automatic segmentation. *Epilepsy Res*. 2008;79:130–8.
20. Szabo CA, Lancaster JL, Lee S, Xiong JH, Cook C, Mayes BN, et al. MR imaging volumetry of subcortical structures and cerebellar hemispheres in temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27:2155–60.
21. Crooks R, Mitchell T, Thom M. Patterns of cerebellar atrophy in patients with chronic epilepsy: A quantitative neuropathological study. *Epilepsy Res*. 2000;41:63–73.
22. Fujikawa DG, Itabashi HH, Wu A, Shinmei SS. Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy. *Epilepsia*. 2000;41:981–91.
23. Leifer D, Cole DG, Kowall NW. Neuropathologic asymmetries in the brain of a patient with a unilateral status epilepticus. *J Neurol Sci*. 1991;103:127–35.
24. Dam M, Bolwig T, Hertz M, Bajorec J, Lomax P, Dam AM. Does seizure activity produce Purkinje cell loss? *Epilepsia*. 1984;25:747–51.
25. De Vera N, Camón L, Martínez E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002;12:397–405.
26. Lomoio S, Necchi D, Mares V, Scherini E. A single episode of neonatal seizures alters the cerebellum of immature rats. *Epilepsy Res*. 2011;93:17–24.
27. Sillitoe RV, Joyner AL. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:549–77.
28. González Ramírez M, Neri Bazán L, Salgado Ceballos H, Orozco Suárez S. Las crisis hipertérmicas modifican el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en regiones del cerebro anterior de ratas inmaduras. *Arch Neurocién*. 2010;15:84–92.
29. López-Meraz ML, Rocha LL, Miquel M, Ortega JC, Perez-Estudillo CA, Garcia LI, et al. Amino acid tissue levels and GABA<sub>A</sub> receptor binding in the developing rat cerebellum following status epilepticus. *Brain Res*. 2012;1439:82–7.
30. Haas KZ, Sperber EF, Moshé SL. Kindling in developing animals: Expression of severe seizures and enhanced development of bilateral foci. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990;56:275–80.
31. Luna-Munguía H, Meneses A, Peña-Ortega F, Gaona A, Rocha L. Effects of hippocampal high-frequency electrical stimulation in memory formation and their association with amino acid tissue content and release in normal rats. *Hippocampus*. 2012;22:98–105.
32. Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci*. 1998;18:8382–93.
33. Kubova H, Druga R, Lukasiuk K, Suchomelová L, Haugvicová R, Jirmanová I, et al. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci*. 2001;21:3593–9.
34. Nairismagi J, Pitkänen A, Kettunen MI, Kauppinen RA, Kubova H. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: A histologic and MRI study. *Epilepsia*. 2006;47:479–88.
35. Lopez-Meraz ML, Wasterlain CG, Rocha LL, Allen S, Niquest J. Vulnerability of postnatal hippocampal neurons to seizures varies regionally with their maturational stage. *Neurobiol Dis*. 2010;37:394–402.
36. McCutcheon JE, Marinelli M. Age matters. *Eur J Neurosci*. 2009;29:997–1014.
37. Bandeira F1, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14108–13.
38. Takayama C. Formation of GABAergic synapses in the cerebellum. *Cerebellum*. 2005;4:171–7.