

03068

2<sup>o</sup> y 1<sup>o</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"EFECTO DE LA PROPIONAMIDA SOBRE LA INHIBICION RECURRENTE DEL HIPOCAMPO"

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS PRESENTA: JOSE ANTONIO GALINDO MORALES

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

R E S U M E N . . . . .	i i
S U M M A R Y . . . . .	i i i
1. I N T R O D U C C I O N . . . . .	1
a) Aspectos Históricos y Epidemiológicos de la Epilepsia. . . . .	1
b) El Hipocampo en la Neuropatología de la Epilepsia. . . . .	5
c) Aspectos Anatómicos y Fisiológicos del Hipocampo. . . . .	7
d) Modelos de plasticidad neuronal e inhibición recurrente en el hipocampo. . . . .	15
e) Epileptogénesis. . . . .	21
f) Modelo Kindling. . . . .	23
g) Desinhibición en el hipocampo. . . . .	25
h) Participación del GABA en la Epileptogénesis. . . . .	28
i) Fisiología, Farmacología y Bioquímica del GABA. . . . .	29
j) Planteamiento del problema. . . . .	36
k) Objetivos. . . . .	41
l) Hipótesis. . . . .	41
2. M A T E R I A L Y M E T O D O S . . . . .	43
a) Kindling en la corteza entorrinal. . . . .	43
b) Ensayo anticonvulsionante. . . . .	44
c) Prueba de pulsos pares. . . . .	46
d) Análisis Estadístico. . . . .	50
3. R E S U L T A D O S . . . . .	50
a) Kindling en la corteza entorrinal. . . . .	50
b) Prueba de pulsos pares. . . . .	57
4. D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S . . . . .	73
5. R E F E R E N C I A S . . . . .	79

## RESUMEN

Se estudió el efecto anticonvulsivo del compuesto 3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP) en un grupo de ratas a las que se les subdividió en cuatro grupos asignados a cada uno una sola dosis (0, 25, 50 ó 100 mgkg<sup>-1</sup>; i.p.) de la sustancia. En estos animales se provocó la disminución en el umbral convulsivo mediante la aplicación de estímulos subumbrales tipo kindling en la corteza entorrinal lateral hasta obtener crisis convulsivas generalizadas (estado conductual "5"). Los estímulos se aplicaron cada hora de tal forma que después de 28 a 32 estímulos los animales alcanzaron el estado "5" según la clasificación conductual del fenómeno kindling (Racine, 1972). La dosis de 25 mgkg<sup>-1</sup> provocó una reducción en la forma de la crisis convulsiva, es decir, una crisis focal que corresponde al estado "3". Las dosis de 50 y 100 mgkg<sup>-1</sup> modificaron tanto el patrón conductual de la crisis convulsiva (estado "1" y "2") como la duración de la postdescarga que se redujo para la dosis de 25 mgkg<sup>-1</sup> en un 29%, la dosis de 50 mgkg<sup>-1</sup> en un 61%, y para la de 100 mgkg<sup>-1</sup> en un 82%. En otra serie de experimentos se evaluaron las dosis de 0, 25, 50 y 100 mgkg<sup>-1</sup> de HEPP intraperitoneal en ratas anestesiadas con uretano e inmovilizadas con pancuronio y mantenidas con respiración artificial. Estos experimentos consistieron en cuantificar el cambio en la excitabilidad neuronal a través de los potenciales provocados por la aplicación de un par de pulsos en la corteza entorrinal y el registro correspondiente en el giro dentado del hipocampo. La dosis de 50 mgkg<sup>-1</sup> provocó una disminución del 60% en la amplitud del potencial provocado. El máximo efecto se observó a los 15 minutos después de administrar el HEPP. Estos resultados muestran que el HEPP tiene un potente efecto anticonvulsivo en los modelos experimentales de epilepsia del sistema límbico (kindling en la corteza entorrinal lateral). Además sugieren que el probable mecanismo de acción del HEPP sea por un aumento en la transmisión GABAérgica. Ya que se sabe que esta "inhibición neuronal" es mediada por un mecanismo GABAérgico y puede ser aumentada por la administración de agonistas GABAérgicos como los bloqueadores de la recaptura del GABA y severamente disminuida o abolida por la administración de la picrotoxina y la bicuculina.

**S U M M A R Y**

The effects of 3-hydroxy-3-ethyl-3-phenyl-propionamide (HEPP) were valorated in fully kindled hippocampal rats. In the first group of the rats were employed stimulus trains (biphasic pulses; 60 Hz, 1 sec, 250  $\mu$ A) with interstimulus interval of 60 minutes applied into the dentate gyrus or the entorhinal cortex. Such parameters led to a persistent, fully kindled state in which generalized seizures and stable afterdischarge thresholds were present (stimulus 28 and 32) in all rats. In this conditions, the HEPP at dose with 25  $\text{mgkg}^{-1}$  produce a significative reduction in the seizure stage. Another doses of the HEPP (50 and 100  $\text{mgkg}^{-1}$ ) induced similar effects on the behavioral stage. The afterdischarge duration was reduced by HEPP in dose dependent relation (29%, 61% and 82%). In other group of rats anesthetized with urethane and paralyzed with pancuronium bromide was evaluated the paired pulse inhibition in the dentate gyrus. The results of this experiments demonstrated a reduction of potential evoked amplitude (60%). The maxima response was at the 15 minutes after administration of the drug injection. Our results showed that HEPP has a potent anticonvulsant effect in the experimental models of the limbic epilepsy. Under the conditions of this study, afterdischarge duration were not modified, indicating that a critical role of HEPP is to counteract seizure spread and propagation. Since the paired pulse inhibition is modulated by GABAergic neurones this data suggest that HEPP act through GABAergic mechanisms

## 1. INTRODUCCION.

### a) Aspectos Históricos y Epidemiológicos de la Epilepsia.

Etimológicamente la palabra epilepsia deriva del griego "epilambanein" que significa "ser estremecido bruscamente". Esta enfermedad se conoce desde el año 2080 a. c., Hipócrates<sup>1</sup> (año 400 a. c.) fue el primero en describir la enfermedad como una anormalidad cerebral; "En cuanto a la enfermedad que llamamos, sagrada, he aquí lo que es. Ella no es ni más sagrada ni más divina que las otras, y tiene la misma naturaleza que las otras enfermedades, el desconocimiento de ella, hace que se le considere así y tiene su asiento en el cerebro.....". En el siglo II d. c., Galeno<sup>2</sup> ensayó el tratamiento de la epilepsia con extractos de testículo de hipopótamo y la sangre de tortuga. En México, Martín de la Cruz<sup>3</sup> en el Códice Badiano fue el primero en hacer referencia al tratamiento de la epilepsia (Siglo XIV). Sin embargo, aún en esa época persistía la creencia de que la epilepsia tenía un origen demoníaco y por eso se recomendaban los enemas, los purgantes, las unciones y los fomentos. En el siglo XVIII, se le describía como una enfermedad causada por los excesos sexuales y/o la masturbación, por lo que se llegó a recomendar la castración y el tratamiento con sales de bromo, por sus efectos depresores de la libido. John Huxtable Jackson<sup>4</sup> en 1870 la describió como una "descarga eléctrica anormal en forma ocasional, súbita, intensa, rápida y repetida de la materia gris". Posteriormente, Hans Berger<sup>5</sup>

en el año de 1929 desarrolló la electroencefalografía (EEG) que resultó una excelente ayuda para el diagnóstico y localización de la "descarga cerebral anormal". Por lo tanto, a partir de que se empezó a estudiar en forma más racional la epilepsia, se encontró que la definición era ambigua, e interpretada en forma distinta por cada grupo. Lo que llevó a una total confusión no sólo en el ámbito científico, sino lo que es peor, en la comunidad. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un diccionario (1973 <sup>6</sup>) y posteriormente la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) publicó un glosario de terminología y de clasificación clínica de la epilepsia (1981<sup>7</sup> y 1989 <sup>8</sup> ver TABLA I) en el que se define a la epilepsia como: "una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis convulsivas recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas". La epilepsia primaria o idiopática se refiere a aquellos casos en los cuales no es posible identificar una causa para estas crisis epilépticas. La epilepsia secundaria o sintomática designa las convulsiones o las crisis convulsivas, que son también manifestación o síntoma común de otras enfermedades neurológicas y sistémicas, por ejemplo: tumores cerebrales, traumatismos craneoencefálicos, infecciones del tejido nervioso, uremia, desórdenes del metabolismo de los carbohidratos, de los aminoácidos y lípidos, envenenamiento por isoniacida, plomo y otros medicamentos.

La epilepsia afecta por lo menos a 20 a 40 millones de personas en

todo el mundo (Delgado-Escueta et al<sup>9</sup>., 1986).

Esta enfermedad es más común en niños que en adultos, con una prevalencia, es decir los casos ya existentes, de 8 por cada mil menores de 7 años (Nelson y Ellenberg<sup>10</sup>, 1987). Se calcula que la epilepsia en la población mundial tiene una incidencia, es decir casos nuevos en la población general, de 20 a 70 por cada cien mil personas por año (rango de 11 a 134 por cada 100 000 personas) y una prevalencia de 4 a 10 por cada mil habitantes (rango de 1.5-30 por cada 1000 habitantes) de la población general (Shorvon<sup>11</sup>, 1990).

En México, se calcula una incidencia de 48 por cada cien mil habitantes. Por grupo de edad, es la siguiente; 76 % antes de la adolescencia, 16 % en el adulto joven, 5% en el adulto y 2% en el anciano. La prevalencia en la población general es de 5 por cada mil habitantes, y es mayor en los hombres que en las mujeres (Rubio-Donnadieu<sup>12</sup>, 1986 y Rubio-Donnadieu et al<sup>13</sup>, 1990). Las manifestaciones de inicio de la enfermedad suelen ser muy diversas, pero muy características para cada tipo de epilepsia; como las

TABLA I. Clasificación de las crisis epilépticas según la ILAE<sup>8</sup>.

**I. CRISIS PARCIALES.**

- A) Crisis Parciales Simples (sin alteración de la conciencia).
- B) Crisis Parciales Complejas (con alteración de la conciencia).
- C) Crisis Parciales Secundariamente Generalizadas

**II. CRISIS GENERALIZADAS (Convulsivas/no convulsivas).**

- A) Ausencias.
- B) Crisis mioclónicas.
- C) Crisis clónicas.
- D) Crisis Tónicas.
- E) Crisis Tónico-clónicas.
- F) Atónicas

**III. CRISIS EPILEPTICAS NO CLASIFICABLES.**

crisis convulsivas tónico-clónicas (crisis generalizada convulsiva), o la interrupción o cese de la actividad motora o crisis de ausencia (crisis generalizada no convulsiva), o las crisis parciales que tienen un origen localizado y se acompañan de conductas extrañas y alteraciones de la conciencia (crisis parcial compleja) ver TABLAI (Bancaud et al<sup>14</sup>, 1981 y Dreifuss et al<sup>15</sup>, 1985). En estudios longitudinales sobre la progresión de la epilepsia infantil se describe cierta relación entre la edad de inicio y el tipo de crisis, ya que muchos de los pacientes que inician con crisis de ausencia, posteriormente desarrollan algún otro tipo de crisis convulsiva más severa en la edad adulta, especialmente crisis generalizadas tónico-clónicas (Doose<sup>16</sup>, 1965). Con menos frecuencia se presentan, las crisis parciales focales que involucran trastornos motores (motora focal con marcha o crisis jacksoniana) y más raras aún son las crisis generalizadas atónicas y/o acinéticas (ausencia del tono muscular postural) y las crisis mioclónicas. Por otro lado, es importante señalar que de todos los pacientes con diagnóstico reciente de epilepsia, el 80% de estos casos nuevos no presentaran crisis convulsivas, debido al tratamiento farmacológico (Shorvon y Reynolds<sup>17</sup>, 1982). Sin embargo, es conocido que las crisis epilépticas no responden igual a los distintos fármacos antiepilépticos y esto hace que la eficacia del tratamiento farmacológico en algunos casos no sea adecuado. En particular, no existen agentes farmacológicos específicos para el tratamiento de las crisis parcial compleja o psicomotora.

**b) El Hipocampo en la Neuropatología de la Epilepsia.**

Desde hace 165 años, era ya conocida la estrecha relación entre epilepsia y la patología del hipocampo. Bouchet y Cazauviehli<sup>18</sup> (1825) hicieron las primeras observaciones y describieron la patología del "Uncus" en pacientes con epilepsia. Sin embargo, Bouchet y Cazauviehli no postularon ninguna hipótesis con respecto a las causas del daño o pérdida neuronal. Posteriormente, Meynert<sup>19</sup> (1868) y Sommer<sup>20</sup> (1880) entre otros, iniciaron una controversia acerca de esta relación ya que encontraron una reducción de la celularidad en una área específica del hipocampo. La revisión de Sommer establecía que el hipocampo tenía bajo umbral para la atrofia, de tal modo que cualquier alteración podría causar la pérdida neuronal y la subsecuente esclerosis determinaría la aparición de las crisis epilépticas. Spielmeyer<sup>21</sup> (1927) y Scholz<sup>22</sup> (1933) enfatizaron que la pérdida neuronal aparecía particularmente sólo después del status epilepticus y esto como resultado de la isquemia producida durante las crisis convulsivas. Estos datos también fueron muy controvertidos ya que semejante pérdida neuronal se encontró en algunos casos sin historia de epilepsia (Haymaker et al<sup>23</sup> ., 1958). Los pacientes descritos en ese tiempo habían sufrido epilepsia severa con crisis convulsivas generalizadas. Además, sólo en algunos de estos pacientes, se describió la presencia de "aura", que para propósitos de clasificación implicaría, al menos para estos casos, una categoría de crisis parcial compleja. Por lo tanto, una clasificación de crisis epilépticas, mediante la cual, la crisis parcial compleja

fuera claramente relacionada a la patología del lóbulo temporal no se estableció adecuadamente hasta la introducción del EEG en los años treinta (Gibbs, Gibbs y Fuster<sup>24</sup>, 1948). En este tiempo, el material investigado fue la porción anterior del lóbulo temporal de pacientes seleccionados por padecer claramente crisis convulsivas intratables. Durante este período se estableció una discusión acerca de la definición de la esclerosis hipocampal. Sommer la describió como "una pérdida neuronal total restringida a la área CA<sub>1</sub> de la banda piramidal". En cambio, Margerison y Corsellis<sup>25</sup> (1966), describieron dos tipos de esclerosis hipocampal: uno de estos tipos semejante a la descrita por Sommer (aunque el grado de la pérdida neuronal era considerada más libremente) y en el otro tipo consideraron una pérdida neuronal más dispersa en todas las regiones piramidales pero especialmente en la región CA<sub>3</sub> o H3, que llamaron "esclerosis de folia terminal (end-folium)". Sin embargo, en otros estudios estos cambios frecuentemente fueron considerados como gliosis (Dam<sup>26</sup>, 1987). Recientemente, Babb et al<sup>27</sup> (1984) utilizó un método de cuantificación neuronal del hipocampo y del lóbulo temporal que extirparon a pacientes con un diagnóstico particular de epilepsia parcial compleja intratable. Los pacientes se dividieron en dos grupos de estudio con base a la estereoelectroencefalografía; un grupo incluyó a los que presentaron epilepsia focal "primaria" con un foco localizado en la parte anterior del lóbulo temporal y que con la lobectomía disminuyeron las crisis convulsivas. El otro grupo de pacientes presentó epilepsia focal "no primaria" con diferentes focos de

actividad paroxística y que no mostraron mejoría con la lobectomía. Se encontró pérdida neuronal en todos los campos del hipocampo en los grupos estudiados. Pero la pérdida neuronal fue más significativa en el campo CA<sub>1</sub> o H1 en el grupo de pacientes con epilepsia focal primaria.

**c) Aspectos Anatómicos y Fisiológicos del Hipocampo.**

El hipocampo recibe este nombre por su semejanza con la forma del caballo de mar. En un corte coronal se observa como dos "v"

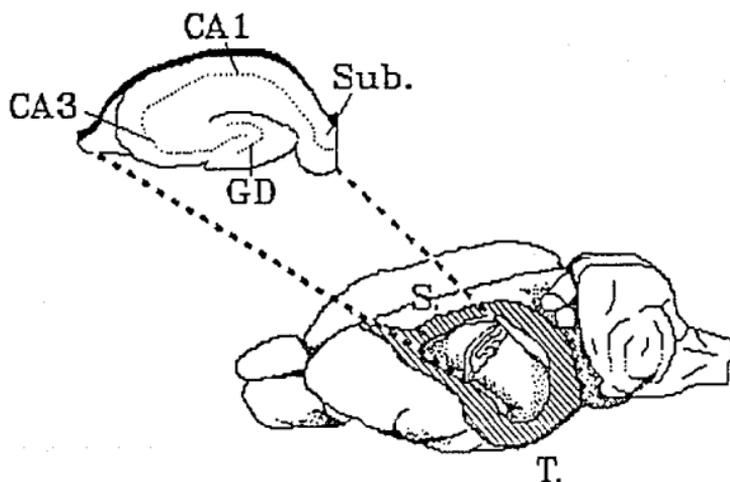


Figura 1.01 Topografía del hipocampo (campos CA1 y CA3 de la capa de células piramidales; GD = giro dentado; Sub. = Subículo; S. = Septomedial y T. = Temporal).

ensambladas (Escobar<sup>28</sup>, 1986). El hipocampo forma parte del sistema límbico. Es la parte de la formación hipocámpica que queda situada en el piso y pared medial de la prolongación temporal del ventrículo lateral. Durante su desplazamiento hacia el lóbulo temporal, se pliega en torno a la cisura hipocámpica, lo que origina modificaciones en su estructura interna (Figura 1.01). El hipocampo presenta tres zonas: el giro dentado (vecino a la cisura coroidea), el asta de Ammon (intermedia) y el subículo (contiguo a la neocorteza). La situación de estas zonas se señala en la figura 1.01. El hipocampo posee una corteza trilaminar muy primitiva a nivel del giro dentado y del asta de Ammon, pero en el subículo hay una zona transicional hacia la corteza de seis capas (Escobar<sup>28</sup>, 1986 y Walaas<sup>29</sup>, 1983).

En el asta de Ammon o *corneo ammonis* (CA), se consideran los siguientes estratos a partir de la superficie ventricular: el *alveus*, por donde cursan fibras aferentes que llegan al hipocampo de otras regiones, y eferentes, que parten del mismo (estas últimas son los axones de las células piramidales del hipocampo); la capa *polimórfica* o *estrato oriens* donde además de fibras aferentes y eferentes, se hallan células en *canasta* y otras pequeñas células de forma variable cuyos axones se dirigen en su mayor parte a los estratos más profundos; el *estrato de células piramidales*, que dan origen a dendritas basales que se distribuyen horizontalmente por el *estrato oriens* y a una dendrita apical que se ramifica en los estratos *radiado* y *molecular* situados más profundamente; de la base de su soma parte el axón que después de cursar por el *estrato*

oriens y el alveus pasa a la fimbria y posteriormente al fórnix que constituye la principal vía eferente del hipocampo; los axones de las células piramidales dan ramas colaterales [colaterales de Schaffer (Schaffer<sup>30</sup>, 1892)] que penetran al estrato lacunoso-molecular donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de otras células piramidales; el estrato radiado sigue a continuación; en éste se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales; finalmente, el estrato lacunoso-molecular que es el más profundo, contiene las ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras que llegan al hipocampo (Andersen et al<sup>31</sup>, 1973; Hjörth-Simonsen<sup>32</sup>, 1973 y Swanson y Cowan<sup>33</sup>, 1977) y al septum lateral (Meibach y Siegel<sup>34</sup>, 1977 y Swanson y Cowan<sup>33</sup>, 1977) (ver Figura 1.02). Tomando en cuenta sus características arquitectónicas y conexiones, Lorente de Nó<sup>35</sup> (1934), subdividió el asta de Ammon en varios campos: CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub>, CA<sub>4</sub> y CA<sub>5</sub>.

La fascia dentada o giro dentado tiene también una estructura trilaminar, constituida por las capas molecular o superficial, granular intermedia y polimórfica profunda. Contiene neuronas de axón corto (Golgi tipo II), cuyos axones y dendritas se distribuyen dentro de la misma capa en que están situadas. Algunas células de la capa granular dan origen a axones que además de emitir colaterales para las neuronas de la capa polimórfica, llegan hasta el asta de Ammon y en su curso se ponen en relación con las dendritas apicales de las células piramidales en el estrato radiado; se les llama **fibras musgosas** por la gran cantidad de

varicosidades que presentan (Ramón y Cajal<sup>36</sup>, 1955). Otros axones de las células de la capa granular llegan hasta el alveus para incorporarse posteriormente a la fimbria (Escobar<sup>28</sup>, 1986; Gaarskjaer<sup>37</sup>, 1978; Golgi<sup>38</sup>, 1886 y Waalas<sup>29</sup>, 1983). La morfología de las células granulares en el hipocampo, varía de acuerdo a su posición, mostrándose mayor material dendrítico emergiendo de las células más superficiales (Green y Juraska<sup>39</sup>, 1985).

El subículo se continua lateralmente con la corteza del área entorrinal. Como se mencionó anteriormente, tiene una estructura que representa la transición de una corteza trilaminar en el hipocampo a una disposición en seis capas en el área entorrinal, por lo que se consideran varias partes: parasubículo (contiguo a la corteza entorrinal), presubículo, subículo o prosubículo este último separado del giro dentado por la cisura hipocámpica (Figura 1.02).

Las conexiones sinápticas del hipocampo han sido estudiadas por numerosos investigadores. Por lo tanto, se hará un resumen de sus aspectos más importantes. La vía de acceso más importante al hipocampo, esta constituida por el tracto o vía del patrón perforante (VP), la cual entra por el subículo (S) y la cisura hipocámpica (CH), presentando terminaciones en el subículo y en la parte superficial de la capa molecular (CM) del giro dentado (Andersen et al<sup>40</sup>, 1966; Blackstad<sup>41</sup>, 1958; Hjørth-Simonsen<sup>42</sup>, 1972 y Hjørth-Simonsen y Jeune<sup>43</sup>, 1972), a partir de donde las células granulares del área dentada propagan los impulsos aferentes del tracto perforante a través de sus axones o fibras musgosas (FM)

hacia la región CA<sub>1</sub> (Blackstad et al<sup>44</sup> ,1970 y Gaarskjaer<sup>37</sup> ,1978) y colaterales hacia el área dentada contralateral (Gottlieb y Cowan<sup>45</sup> ,1973; Hjörth-Simonsen y Laurberg<sup>46</sup> ,1977; Laurberg<sup>47</sup> ,1979; Swanson et al<sup>48</sup> ,1978 y Zimmer<sup>49</sup> ,1971). Como ya se menciono, las células piramidales reciben influencia de las células granulares a través de las fibras musgosas (Blackstad et al<sup>44</sup> ,1970; Gaarskjaer<sup>37</sup> ,1978; Golgi<sup>38</sup> ,1886; y Swanson et al<sup>48</sup> ,1978), proyectándose estas fibras ipsilateralmente sobre las dendritas apicales en el estrato lucidum, , mientras que CA<sub>1</sub> envia axones ipsilateralmente a CA<sub>1</sub> (Laurberg<sup>47</sup> ,1979) observándose en estos sitios botones sinápticos gigantes y sinapsis en "passage" (Blackstad y Kjaerheim<sup>50</sup> ,1961; Blackstad et al<sup>44</sup> ,1970; y Gaarskjaer<sup>37</sup> ,1978), las colaterales de Schaffer (cSch: Schaffer<sup>30</sup> ,1892) y las fibras comisurales contralaterales (f. com.) al estrato oriens (Waalas<sup>29</sup> ,1983). Por su parte, los campos CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub>, también envían sus axones ipsi y contralateralmente al estrato oriens y al radiado (Andersen<sup>51</sup> et al., 1966; Blackstad<sup>52</sup> ,1956; Gottlieb y Cowan<sup>45</sup> ,1973; Hjörth-Simonsen<sup>42</sup> ,1972 y Swanson et al<sup>48</sup> ,1978), hacia corteza entorrinal, subículo y núcleo septal lateral (Waalas<sup>29</sup> ,1983). Otras vías descritas, son las que van de hipocampo al septum (Andersen et. al<sup>31</sup> ,1973, Swanson y Cowan<sup>33</sup> ,1977), el subículo, el fórnix, el tálamo y los cuerpos mamilares (Meibach y

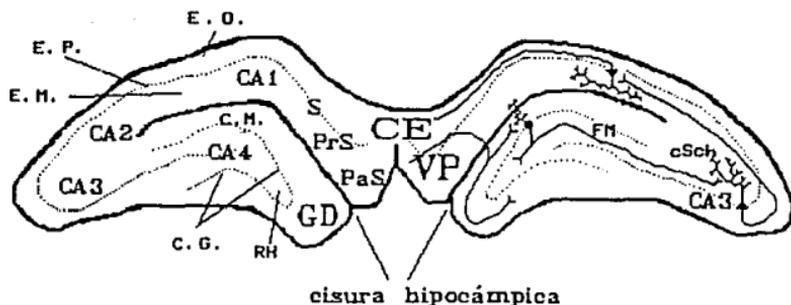


Figura 1.02 El hipocampo presenta tres capas principales: el estrato oriens (E.O.), el estrato piramidal (E.P.) y el estrato molecular (E.M.).

En el lado izquierdo se muestra la parte ventral formada por el Giro Dentado (GD), Región Hiliar (RH), la Capa Molecular (C.M.), la Capa Granular (C.G.). La parte sagital esta formada por el Subículo (S) dividida en Parasubiculo (PaS) y PreSubículo (PrS) y la Corteza Entorrinal (CE). En el lado derecho se muestra la entrada de los axones de la vía del patrón perforante (VP) que hace contacto sináptico en el tercio superior del árbol dendrítico de la célula granular y esta envía sus prolongaciones (fibras musgosas= FM) hacia la célula piramidal de la zona CA3 y las colaterales de Schaffer (cSch).

Siegel<sup>34</sup>, 1977 y Swanson y Cowan<sup>33</sup>, 1977). El hipocampo recibe inervación del cíngulo (Domesick<sup>53</sup>, 1969), tálamo (Herkenham<sup>54</sup>, 1978 y Wyss<sup>55</sup> et al., 1979), el hipotálamo lateral, la región supramamilar (Pasquier y Reinoso-Suárez<sup>56</sup>, 1976 y Wyss et al<sup>55</sup>, 1979), el área tegmental ventral, la sustancia nigra, el locus coeruleus y los núcleos del rafe (Azmitia y Segal<sup>57</sup>, 1978 ;

Segal<sup>58</sup> ,1975; Segal y Landis<sup>59</sup> ,1974 y Waalas<sup>29</sup> ,1983).

En relación, con las vías eferentes del hipocampo, la estimulación del hipocampo es efectiva en producir respuestas excitatorias en el hipotálamo, así como también, el área preóptica, los cuerpos mamilares, la banda diagonal longitudinal, el núcleo accumbens y el área perifórnica, así como la estria terminalis, el núcleo basomedial amigdalino y el sistema ventroamigdalofugal (Poletti et al<sup>60</sup> .,1984).

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central que ofrece ventajas para el estudio neuroquímico , ya que integra varias aferencias químicas específicas, provenientes del área dentada, amígdala y la corteza entorrinal, para terminar en las capas CA<sub>1</sub> y CA<sub>3</sub> del hipocampo (ver Figura 1.03). El neurotransmisor

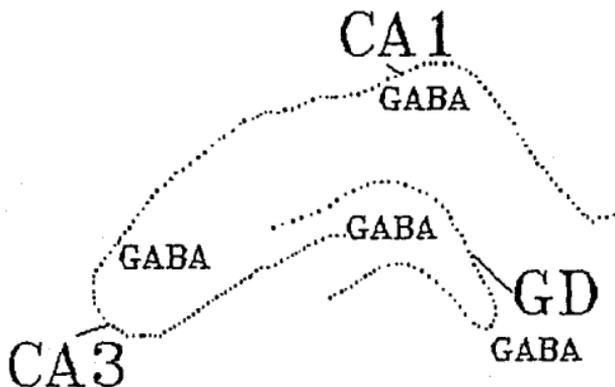


Figura 1.03 Localización del GABA en el hipocampo. El GABA se encuentra principalmente en los campos CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub> y en el giro dentado.

de mayor importancia en el hipocampo, es el ácido gamaaminobutírico (GABA), el cual posee acciones inhibitorias en las sinapsis axosomáticas y en las sinapsis axodendríticas (Andersen et al.<sup>40</sup>, 1966). El GABA en el hipocampo se encuentra principalmente en las regiones CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub> y el área dentada (Figura 1.03), mientras que la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) sólo se encuentra en la capa de las células piramidales de CA<sub>3</sub> (Störm-Mathisen<sup>61</sup>, 1978), siendo interesante que las neuronas que contienen al GABA representan sólo un sistema local, ya que no se ha demostrado que el GABA en el hipocampo provenga de alguna de sus aferencias (Waalas<sup>29</sup>, 1983). Existen reportes que las descargas originadas en el hipocampo dorsal, sólo se propagan al mismo hipocampo, mientras que las descargas en el hipocampo ventral se distribuyen a las áreas ya mencionadas. Por otro lado, es interesante el hecho de que la lesión del fórnix y la estria terminal, elimina casi por completo la influencia hipocampal con excepción de un pequeño incremento en el metabolismo del área preóptica (Poletti et al., 1984). La formación hipocampal ha sido estudiada ampliamente desde el punto de vista anatomofuncional (Collingridge<sup>62</sup>, 1989). La mayoría de las teorías acerca de la función del hipocampo se apoyan en el circuito trisináptico, en el cual la actividad que pasa a través de la vía perforante es relevada desde la corteza entorrinal a las dendritas de las células granulares en el giro dentado, de ahí (por las fibras musgosas) a las células piramidales de la región CA<sub>3</sub> (fibras de Schaffer) y finalmente a las células piramidales de la región CA<sub>1</sub> (Figura 1.04). La excitabilidad de

las células granulares en el giro dentado es modulada por la actividad de circuitos locales de interneuronas llamadas células en canasta (Ribak y Seress<sup>63</sup>, 1983). La mayoría de las células en canasta parecen ser interneuronas inhibitorias gabaérgicas y se sitúan dentro de los márgenes de la zona hilar con la capa de células granulares o inmediatamente cercanas a éstas. El giro dentado, por lo tanto, actúa como modulador de la actividad de paso hacia el hipocampo desde la corteza entorrinal. Se sugiere que el giro dentado podría servir como compuerta que restringe el flujo de la actividad anormal hacia el hipocampo (Walther et al<sup>64</sup>, 1986). Sin embargo, ¿cómo se realiza esta modulación?, es aún desconocido.

#### **d) Modelos de plasticidad neuronal e inhibición recurrente en el hipocampo.**

La formación hipocampal es conocida como una de las regiones en la cual se manifiesta la plasticidad neuronal. Por ejemplo, el aumento de la eficiencia sináptica se observa después de la aplicación de un tren de estímulos (dentro del primer minuto). A esto se le ha denominado **potenciación posttetánica** y es un aumento a corto plazo. La potenciación posttetánica se establece fácilmente en el hipocampo después de la estimulación de sus vías aferentes (Wilson et al<sup>65</sup>, 1979 y McNaughton y Miller<sup>66</sup>, 1984). La **potenciación a largo plazo** es también una forma de plasticidad neuronal caracterizada por un aumento en la respuesta sináptica a un simple estímulo después de un tren de estímulos tetanizantes (Bliss y Lomo<sup>67</sup>, 1973). Una de las características que distingue a la potenciación a largo plazo

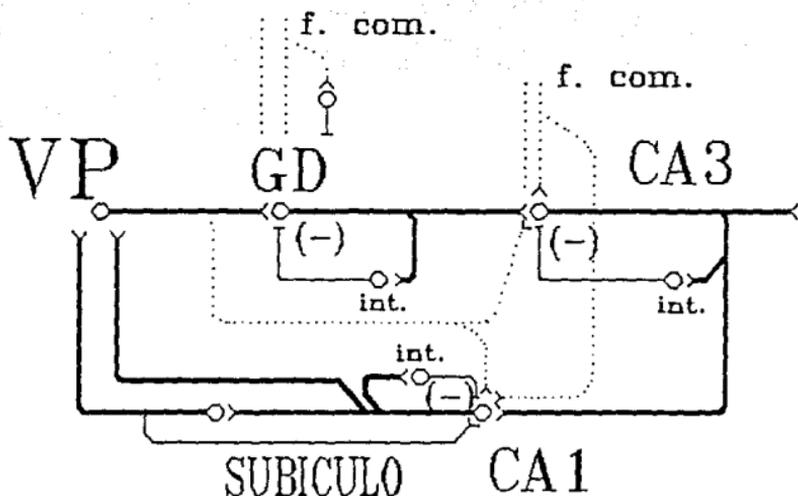


Figura 1.04 Circuito trisináptico del hipocampo. La actividad de la corteza entorrinal pasa a través de las células granulares del Giro Dentado (GD). Esta actividad a su vez pasa hacia las neuronas piramidales del campo CA3 y es finalmente relevada a las neuronas piramidales del campo CA1. Abreviaturas: VP = Vía Perforante; (-) = sinápsis inhibitorias; f. com. = fibras comisurales; e int. = interneuronas.

de la potenciación posttetánica es su duración, ya que después de aplicar un sólo tren tetanizante, el incremento es mantenido por lo menos 10 horas y la repetición del tren de estímulos puede dar como resultado, un incremento que dura hasta 2 semanas (Douglas y Goddard<sup>68</sup>, 1975). Debido a que ambos fenómenos requieren de la estimulación eléctrica tetanizante con parámetros similares, se puede pensar que participan mecanismos semejantes a nivel de membrana y/o a nivel de receptores. La potenciación a largo plazo (LTP) es entonces un ejemplo de la plasticidad sináptica que se da

en el hipocampo, la cual es considerada como el correlato biológico más importante en las últimas dos décadas en relación con el aprendizaje y la memoria. Bliss y Lomo<sup>67</sup> (1973) la describieron por primera vez en la vía perforante del conejo y demostraron que ocurría en todas las vías monosinápticas del hipocampo, tanto en el animal anestesiado como en las rebanadas del hipocampo (Schwartzkroin y Wester<sup>69</sup>, 1975). El fenómeno se describió como un aumento duradero de la eficiencia sináptica después de la aplicación de un breve tren de estímulos de alta frecuencia (tetanus) en la entrada sináptica hacia el giro dentado (la vía perforante), el área CA<sub>2</sub> (la vía comisural y fibras musgosas), o el área CA<sub>1</sub> (la vía comisural y colaterales de Schaffer). La LTP puede durar desde algunos días o hasta varias semanas y esto como resultado de un sólo tren de estímulos, lo que sugirió que la LTP podría proveer de un excelente modelo para el estudio de los procesos de aprendizaje y la memoria.

Dos hallazgos en la LTP se combinaron para hacerla el candidato idóneo para intentar explicar los procesos de aprendizaje y la memoria: la "especificidad" y la "asociatividad" de la entrada sináptica. Desde que la LTP fue descrita, la interrogante de la especificidad fue materia de interés. Bliss y Lomo<sup>67</sup> (1973), mencionaban que la LTP se restringía a la vía que recibía directamente el tetanus (vía perforante-células granulares); ya que estos investigadores no encontraron facilitación heterosináptica (en estructuras no relacionadas sinápticamente). Posteriormente, más evidencias fueron obtenidas acerca de la especificidad de la

entrada en las sinapsis de las células piramidales en CA<sub>1</sub> (Andersen et al<sup>70</sup> .,1977 y Lynch et al<sup>71</sup> .,1977) y las sinapsis de la vía perforante y las células granulares (Lovinger y Routtenberg<sup>72</sup> ,1988). Aunque hay reportes de facilitación heterosináptica, en general se acepta, que sólo una vía es activada durante la tetanización mediante lo cual se provoca la LTP.

La naturaleza asociativa de la LTP, fue estudiada mediante el uso de dos o más electrodos de estimulación por el grupo de Mc Naughton<sup>73</sup> (1978) y el grupo de Levy (Levy y Steward<sup>74</sup> ,1979). Los cuales demostraron que la activación de vías que convergen en una misma población celular, y que por sí solas no eran capaces de originar la LTP cuando se estimulaban por separado, sí eran capaces de dar lugar a la LTP cuando eran "tetanizadas" simultáneamente (Mc Naughton et al<sup>73</sup> .,1978). Entonces esto estableció que una vía sináptica "débil" podía dar lugar a la LTP, siempre y cuando se estimulara junto con otra vía y que convergieran en la misma población de células (Levy y Steward<sup>74</sup> ,1979). A esta propiedad de asociatividad también se le estudió los parámetros temporales necesarios para inducir el fenómeno (ver Lynch<sup>75</sup> , 1989). La asociatividad era el tipo de hallazgo que se necesitaba para entender el condicionamiento clásico, y el hecho que este tipo de condicionamiento se relaciona directamente con la intensidad de la LTP, apoya aún más la idea de que la LTP pueda ser el substrato biológico del aprendizaje y la memoria.

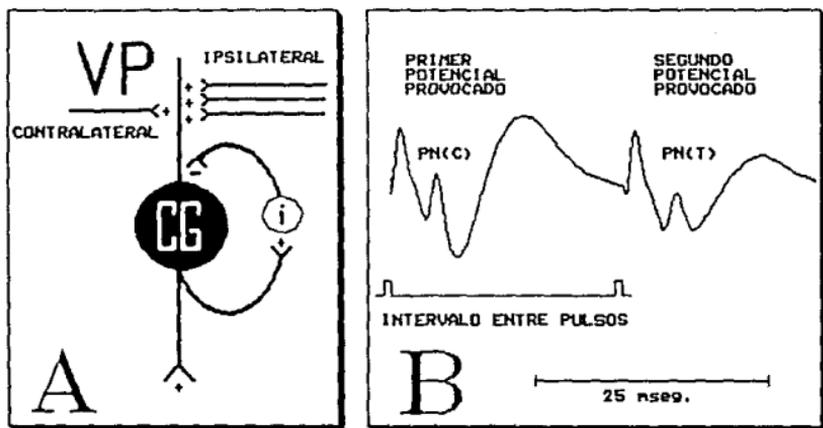


Figura 1.05 Prueba de los pulsos pares. A) la vía perforante (VP) es relevada por las células granulares (CG) y esta actividad es a su vez modulada por las interneuronas (i).

B) Inhibición neuronal temprana, caracterizada por una depresión de la descarga de las células granulares manifestada por una menor respuesta al segundo pulso aplicado dentro de la ventana de los 25 msec. (intervalo entre pulsos).

Por otro lado, el giro dentado, en particular nos provee de un excelente modelo para el estudio de la plasticidad neuronal (Racine

et al<sup>76</sup>, 1983), ya que es conocido que la estimulación desde la corteza entorrinal (vía perforante) con pulsos simples permite registrar especialmente el potencial monosináptico en el giro dentado (Winson y Abzug<sup>77</sup>, 1978). Por lo tanto, estímulos dados a la vía perforante y separados temporalmente en forma precisa, permiten provocar y subsecuentemente medir cambios plásticos a muy corto plazo mediados interneuronalmente. La prueba de los pulsos pares (Figura 1.05B) aplicada a la vía perforante, puede ser utilizada entonces para revelar tres fases dentro de los cambios a corto plazo en la excitabilidad de las células granulares en el giro dentado, variando el intervalo entre los estímulos o pulsos. La primera fase, llamada inhibición neuronal temprana, dura aproximadamente 15 a 45 mseg. después de aplicar el primer pulso (condicionado) y está caracterizada por una depresión de las descargas de las células granulares, manifestada por una menor respuesta al segundo pulso (prueba) aplicado dentro de la ventana de los 40 mseg.. Además, la potencia de la depresión por par de pulsos depende de dos parámetros: la intensidad del estímulo y el intervalo entre pulsos. Cuando el intervalo entre pulsos es fijo, la magnitud de la depresión por par de pulsos alcanza su máximo al alcanzar el valor de la intensidad umbral. Cuando la intensidad del estímulo es fija, los coeficientes alcanzan una inhibición máxima a un intervalo mínimo de 20 mseg. entre pulsos. Entonces con parámetros apropiados de los estímulos pares, la depresión o inhibición por pulsos pares puede ser optimizada. Experimentos farmacológicos y electrofisiológicos previos sugieren que la

depresión por par de pulsos [IMI menor que 1.0] refleja inhibición mediada por el GABA (Figura 1.05B). La segunda fase llamada de **facilitación**, ocurre dentro de los 45 a 200 mseg. después de aplicado el estímulo condicionado y esta se caracteriza por un marcado incremento en la excitabilidad de las células granulares (Racine et al<sup>76</sup>, 1983). El mecanismo para este incremento en la excitabilidad es desconocido. La última fase llamada de **inhibición tardía** sucede en respuesta a estímulos dados después de 200 a 1000 mseg. del estímulo condicionante y esta se caracteriza también por una marcada depresión de la excitabilidad de las células granulares, la cual no es mediada por el GABA ya que no es bloqueada por la bicuculina, ni alterada por el diazepam (Tuff et al<sup>78</sup>, 1983).

#### **e) Epileptogénesis.**

Ahora bien, mientras que los tipos de plasticidad antes mencionados, son considerados procesos fisiológicos, otros tipos de plasticidad en el hipocampo son considerados como responsables de los procesos patológicos tales como la epilepsia. Por estas razones los estímulos eléctricos semejantes a los que inducen la potenciación, utilizados y aplicados en forma continua en rebanadas del hipocampo, producen potenciación posttetánica y posteriormente potenciación a largo plazo. Estos trenes de estimulación en forma iterativa, también dan como resultado al inicio descargas de actividad de espigas, provocadas y posteriormente de aparición

espontánea, siendo parecidas a las descargas "epilépticas o interictales". A este fenómeno se le conoce como descargas inducidas por tren de estímulos (Stasheff et al<sup>79</sup>, 1985; y Anderson et al<sup>80</sup>, 1987). Sin embargo, este paradigma presenta la desventaja de que la estimulación continua de las rebanadas del hipocampo, no permite la evaluación de los efectos sobre la evolución de las crisis convulsivas.

La estimulación tetanizante de una estructura cerebral en intervalos regulares lleva finalmente al desarrollo de focos epileptógenos (McNamara et al<sup>81</sup>, 1980 y Racine<sup>82</sup>, 1978). Este método denominado "kindling" o "encendido" fue descrito originalmente por Goddard et al<sup>83</sup> (1969), como modelo de epilepsia. La importancia de este modelo para explicar la patofisiología de la epilepsia en el hombre es aún discutida, puesto que no se puede demostrar experimentalmente en forma directa que un proceso semejante al kindling ocurre en el hombre. Sin embargo, un hecho que subraya la relevancia del kindling en la epilepsia humana es la dificultad de producir kindling en la mayoría de los primates (Racine<sup>82</sup>, 1978), aunque esto puede ser simplemente un fenómeno relacionado a que el efecto kindling toma mucho más tiempo para establecerse conforme se avanza en la escala filogenética (Wada et al<sup>84</sup>, 1978). De todas maneras, el hecho de que el kindling ocurra o no en el hombre no influencia la decisión de los médicos con respecto al manejo inmediato de los pacientes con epilepsia (Goldensohn<sup>85</sup>, 1984), dado que algunos autores puntualizan que un foco primario en el hombre suele provocar alteraciones

"transinápticas" de larga duración en las poblaciones neuronales "blanco" que llevan a establecer focos secundarios como ocurre en el proceso del kindling. De tal modo, el camino más atractivo para probar si el modelo kindling es relevante en la epileptogénesis en el hombre, es encontrar si los procesos fisiopatológicos que sobrellevan al fenómeno kindling son comunes a los procesos fisiopatológicos en la epilepsia humana.

#### **f) Modelo kindling.**

Este modelo se conoce que puede ser inducido en una gran variedad de especies animales tales como la rana, el ratón, la rata, el conejo, el gato, el perro, y en los monos rhesus y babuino (Goddard et al<sup>83</sup>, 1969 y Racine<sup>86</sup>, 1972). La estimulación con un tren de pulsos eléctricos bifásicos de 0.1 mseg.; 60 Hz de frecuencia; y 250 a 1000  $\mu$ A de intensidad en las citadas especies ocurre en la amígdala o el hipocampo lo que induce primero una postdescarga electroencefalográfica localizada, junto con signos conductuales menores tales como los que describe Racine (1972) en la clasificación conductual del kindling para la rata (ver TABLA II). Las conductas observadas en las etapas 1 y 2 semejan las crisis parciales complejas o crisis límbicas. El comportamiento en las etapas subsecuentes, es similar a las crisis motoras tónico-clónicas generalizadas de manera secundaria. La repetición diaria de esta estimulación, aumenta la postdescarga en amplitud, en duración y en su distribución, primero a las estructuras sinápticamente más relacionadas y progresivamente a todas las demás

TABLA II. Parámetros conductuales de la rata en el modelo Kindling (Racine, 1972).

estructuras cerebrales (Le Gal La Salle<sup>87</sup>, 1980). Es

importante señalar que el kindling puede ser usado para investigar algunos aspectos de la epilepsia: En primer lugar, puede ser utilizado para estudiar los mecanismos que inducen el fenómeno ictal, especialmente el proceso que provoca la descarga de neuronas en forma sincronizada. En segundo lugar, el kindling provee una excelente forma para estudiar la propagación de la

actividad epiléptica a otras áreas del cerebro. En tercer lugar, puede ser utilizado para examinar el curso temporal de los efectos bioquímicos y fisiológicos postictales. Finalmente, es ideal para dilucidar las modificaciones neurobiológicas a largo plazo, en la disminución del umbral convulsivo. Otro aspecto importante de mencionar, es que entre los periodos de estimulación, la aparición espontánea de espigas interictales, ocurre durante y después del desarrollo del fenómeno kindling. Estas espigas aparecen primero en la estructura estimulada y después alcanzan la estructura contralateral seguida por la corteza (Tanaka<sup>88</sup>, 1972; Wada et al<sup>89</sup>, 1974; Fitz y McNamara<sup>90</sup>, 1979 y Leung<sup>91</sup>, 1988). Es notable, que

---

1) clonus facial (movimientos del hocico y/o la cara).

2) sacudidas de la cabeza (movimientos oscilatorios de la cabeza o nodding).

3) clonus de las extremidades superiores (sacudidas clónicas de las patas anteriores).

4) erección de la rata (el animal se yergue y se sostiene sobre sus patas posteriores).

5) erección y caída (crisis generalizada con pérdida del control de la postura).

---

una vez que el animal es estimulado hasta llegar a las crisis generalizadas, las crisis convulsivas pueden llegar a ser provocados, aún después de suspender varias semanas las sesiones de estimulación (Goddard et al<sup>83</sup>, 1969; y Wada et al<sup>89</sup>, 1974). Este punto es de especial interés para los estudios farmacológicos. En algunos casos, cuando los animales han sido estimulados muchas veces (al menos 100 estímulos), las crisis convulsivas espontáneas pueden ocurrir en algunas ocasiones (Wada et al<sup>89</sup>, 1974; y Pinel y Rovner<sup>92</sup>, 1978). Una diferencia entre el kindling y la epilepsia humana, es la ausencia de alteraciones histológicas detectables en el kindling. En tanto que en los focos epilépticos extirpados quirúrgicamente, se encuentran pérdida neuronal y proliferación de tejido glial. Postulándose, que estas alteraciones estructurales son una posible causa de la epileptogénesis. Esta hipótesis, por otro lado, está aún en duda, ya que como mencionamos anteriormente, no en todo los focos epilépticos extirpados se encuentra tejido cicatrizal y ni en todo tejido cicatrizal se encuentran focos epilépticos.

#### **g) Desinhibición en el hipocampo.**

El fenómeno de inhibición se observa en las neuronas de las áreas CA<sub>3</sub>, CA<sub>1</sub> y del giro dentado del hipocampo cuando se estimulan sus aferencias neurales. Además, en estas regiones hipocámpicas se registran los potenciales postsinápticos inhibitorios (PPSI) de larga duración que modifican la conductancia de la membrana a iones, aumentando la conductancia al ión cloro (Cl<sup>-</sup>) por la

liberación de GABA de las terminales nerviosas de las interneuronas inhibitorias. Aunque en varias partes del SNC se han observado estos PPSI, la inhibición que se observa en el hipocampo es interesante por su labilidad. Si se estimulan las fibras comisurales de la fimbria con frecuencias mayores de 4 Hertz (Hz), se observa que en lugar de los PPSI aparecen descargas repetidas. Si se aumenta la frecuencia de estimulación (60 Hz) se desarrolla actividad paroxística que se caracteriza por aparición de postdescargas, fluctuaciones amplias del potencial de membrana, y cese de toda la actividad por uno o dos minutos, lo que podría corresponder a la depresión post-ictal (Krnjević<sup>93</sup>, 1982). Los cambios en la excitabilidad de las neuronas hipocámpicas podrían explicarse de la siguiente manera: con la estimulación a baja frecuencia los mecanismos de inhibición recurrente y de inhibición por alimentación anterógrada positiva (feed-forward) son lo suficientemente efectivos como para bloquear la excitación provocada por la estimulación comisural. Pero con la estimulación con altas frecuencias disminuye la eficiencia de la inhibición recurrente y probablemente se potencia la función sináptica excitadora. La actividad neuronal en forma de espigas o descargas paroxísticas se corelaciona con un aumento en la concentración de potasio ( $K^+$ ) en el medio extracelular. Es probable también que se establezca una corriente entrante de calcio ( $Ca^{++}$ ) ya que se observa una disminución en la concentración del  $Ca^{++}$  extracelular. El aumento del  $K^+$  extracelular probablemente aumenta la excitación, pero también puede disminuir la eficiencia de las

sinapsis inhibitoras y además facilitar el establecimiento de la corriente entrante de  $Ca^{++}$  a las células excitadoras (Heinemann et al<sup>94</sup> .,1982 y Krnjević<sup>93</sup> ,1982). Otros de los mecanismos que podrían estar condicionando la desinhibición que se observa por la estimulación iterativa podrían estar involucrando la sensibilización del receptor postsináptico, la fatiga en la vía inhibitoria o la lesión de las interneuronas que median la inhibición recurrente. De manera alternativa se involucran mecanismos que modulan la inhibición recurrente, la cual se podría modificar ya sea a nivel presináptico o postsináptico. A nivel presináptico se sabe que las interneuronas inhibitoras no son capaces de activarse con frecuencias de estimulación mayores de 1 Hz, por lo tanto cuando se desarrolla una descarga paroxística, las interneuronas inhibitoras no se activan debido a sus características intrínsecas, o por tener una despolarización sostenida por la presencia de altas concentraciones de  $K^+$  en el medio extracelular. La alteración postsináptica podría deberse a una disminución en la sensibilidad del receptor GABAérgico o bien a la inactivación del canal del  $Cl^-$  involucrado en dicha inhibición. El fenómeno de desinhibición, una vez establecido se puede reforzar por la inactivación de terminales inhibitorias y muy probablemente de interneuronas, debido a la disminución importante del  $Ca^{++}$  y al aumento de  $K^+$  extracelular causados por la descarga paroxística autosostenida de la neurona piramidal del campo CA, (Krnjević, 1982). Estas observaciones están de acuerdo con la idea de que la actividad paroxística, normalmente está frenada o es

bloqueada por la inhibición sináptica y que su disminución por cualquier causa, de la potencia del control neuronal inhibitorio es la causa principal de las crisis convulsivas no sólo en el hipocampo sino también en otras estructuras del cerebro.

#### **h) Participación del GABA en la Epileptogénesis.**

Ahora bien , se sabe que la inhibición mediada por GABA en el hipocampo es más compleja, que lo que originalmente se pensó ya que está sujeta a una gran variedad de modificaciones plásticas . Mc Carren y Alger<sup>95</sup> (1985) encontraron una disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios activados por el GABA en las células piramidales de la región CA<sub>1</sub> en condiciones in vitro. Esta disminución duraba varios segundos. Ben Ari et al<sup>96</sup> (1979), observaron que los trenes de estímulos inducían potenciales postsinápticos inhibitorios tempranos en las células piramidales en CA<sub>1</sub> en condiciones in vivo, y también notaron que si los estímulos eran de intensidad suficiente para producir una crisis convulsiva, la disminución de la inhibición era más drástica y duraba mucho más tiempo. Finch y Babb<sup>97</sup> (1977), reportan que existe disminución de las respuestas por fatiga de las células en canasta hipocampales por la estimulación iterativa, especialmente con trenes de alta frecuencia. Miles y Wong<sup>98</sup> (1987) y Stelzer et al<sup>99</sup> (1987), encontraron que los estímulos tetanizantes en las rebanadas de hipocampo causaban una disminución de larga duración de los PPSI. En cambio, estudios fisiológicos y farmacológicos en el hipocampo, sugieren que en el giro dentado, las crisis convulsivas

recurrentes, dan un aumento en la potencia de la inhibición. Sin embargo, otros autores mencionan que el giro dentado es capaz de producir actividad epileptiforme, que consiste en salvas de potenciales o población de espigas de gran amplitud, cuando se estimula a través del haz angular ipsilateral (Sömjen et al<sup>100</sup>, 1986). Por lo tanto, la aparición de estos paroxismos de las células granulares pueden ser un paso importante en la propagación de las crisis convulsivas en el hipocampo. Asimismo, los factores que previenen la aparición de esta población de espigas deben permitir que el giro dentado funcione como una compuerta que restringe la entrada de actividad convulsiva hacia el hipocampo (Kapur y Lothman<sup>101</sup>, 1989).

#### **i) Fisiología, Farmacología y Bioquímica del GABA.**

El GABA un aminoácido monocarboxílico, fue identificado como constituyente químico del cerebro desde los años cincuentas, pero su potencia como depresor del SNC no fue entonces reconocida. En el receptor de estiramiento del cangrejo, se demostró que el GABA mimetizaba la estimulación del nervio inhibitor y que la picrotoxina antagonizaba ambos efectos tanto de la aplicación directa del GABA como de la estimulación del nervio inhibitor. En este crustáceo, Kravitz et al<sup>102</sup> (1966) mostró que el GABA es un aminoácido inhibitor, que se encontraba en el nervio inhibitor y que la potencia inhibitoria de los extractos de este nervio dependía directamente del contenido de GABA. La liberación del GABA, se relacionaba con la frecuencia de estimulación de dicho

nervio. Posteriormente, mediante el registro intracelular del músculo, se mostró que la estimulación del nervio inhibitor y la aplicación del GABA producen aumentos idénticos de la conductancia al ión cloro en el músculo. Estos criterios fueron suficientes para considerar al GABA como neurotransmisor (Otsuka<sup>103</sup>, 1973). Dichas propiedades fisiológicas y farmacológicas fueron más tarde encontradas en otros modelos que sirvieron para mostrar la participación del GABA en el sistema nervioso del mamífero. Muchas de estas evidencias apoyan la participación del GABA en las acciones inhibitorias de la mayoría de las interneuronas del cerebro y que también el GABA es el mediador de la inhibición presináptica en las células de Renshaw de la médula espinal. La existencia de las sinapsis inhibitorias "gabaérgicas" se mostró finalmente en las sinapsis formadas por neuronas cerebelosas de Purkinje y sus neuronas "blanco": el núcleo de Deiters, en las interneuronas cerebelosas y la eferencia de toda la corteza cerebelosa: bulbo olfatorio, núcleo cuneatus, hipocampo y núcleos septales; y las sinapsis entre las neuronas de los núcleos vestibulares y las motoneuronas cocleares. El GABA también es responsable de los efectos inhibitorios en las sinapsis de la corteza cerebral (Kelly y Beart<sup>104</sup>, 1975). Más tarde, se mostró la existencia de una vía gabaérgica desde el núcleo caudado a la sustancia negra por evidencias neuroquímicas y citoquímicas (Kelly y Beart, 1975). Posteriormente, estas observaciones fueron confirmadas y ampliadas: las neuronas gabaérgicas y sus terminales nerviosas son localizadas con los métodos inmunocitoquímicos que

permiten visualizar la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Las acciones fisiológicas del GABA como transmisor inhibitorio en las sinapsis del mamífero se resumen en las siguientes consideraciones:

1. La estimulación de las células de Purkinje resulta en una hiperpolarización de las células postsinápticas en los núcleos cerebelosos profundos y el núcleo de Deiters.
2. La membrana postsináptica es permeable al ión cloro y otros aniones de tamaño molecular comparable, durante la acción del transmisor.
3. La picrotoxina y la bicuculina, los cuales son antagonistas del GABA, bloquean los efectos de la estimulación; la estriknina, la cual no es un antagonista del GABA, no tiene ninguna eficacia.
4. La estimulación de las células de Purkinje aumenta la liberación de GABA en el líquido de perfusión ventricular o en las cánulas insertadas en el área de los núcleos intracerebelosos.

Estas acciones inhibitorias del GABA son asociadas a un flujo o entrada del  $\text{Cl}^-$  desde el líquido extracelular, con la consecuente hiperpolarización de la membrana de las células postsinápticas, y de esta manera se inhibe la capacidad de las células para generar potenciales de acción. Sin embargo, tanto en los estudios fisiológicos como en los estudios bioquímicos se indica que algunas de estas acciones inhibitorias del GABA, deben ser reguladas a través de algún otro tipo de receptores o sitios de unión en el tejido nervioso. Las propiedades farmacológicas de los diferentes

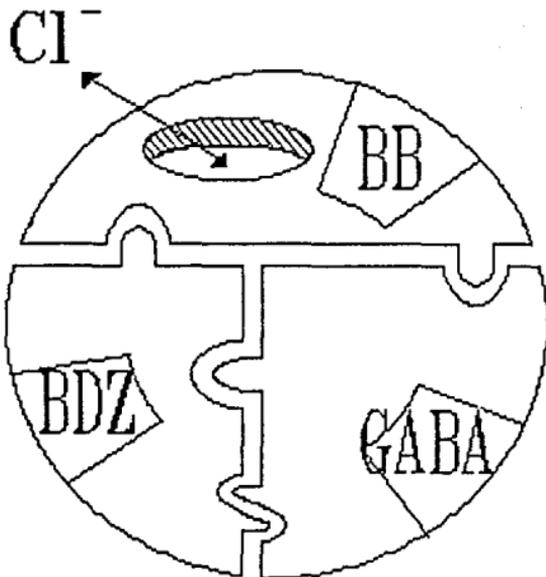


Figura 1.06 El complejo receptor GABA/BDZ/Cl<sup>-</sup>. GABA = Sitio de unión del GABA; BDZ = Sitio de las benzodiazepinas; BB = Sitio de los barbitúricos; y Cl<sup>-</sup> = ionóforo del cloro.

tipos de receptores gabaérgicos: los sitios de unión o enlace específico de receptores GABA<sub>A</sub> son sitios o estructuras sensibles al muscimol (agonista directo), el ácido 3-AminoPropanoSulfónico (3-APS; agonista directo) e isoguvacina (agonista indirecto) y la bicuculina (antagonista competitivo), pero son insensibles al baclofeno.

Las acciones del GABA sobre estos receptores postsinápticos son llamadas también como "ionotróficas" ya que se dan por la breve apertura de los canales del ión cloro ( $\approx 1$  mseg.). Por otro lado, los sitios de unión o enlace específico a receptores GABA<sub>A</sub> son los sitios o estructuras insensibles a la bicuculina, el 3-APS e isoguvacina pero son débilmente sensibles al GABA y al muscimol siendo selectivos y específicamente sensibles al baclofeno (agonista directo), el flaclofeno y el saclofeno (antagonistas competitivos). El enlace o unión a los sitios GABA<sub>B</sub> son inhibidos por nucleótidos de guanidina dependientes de Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup> y severamente disminuidos por el tratamiento de las membranas o rebanadas con Tritón X-100. Los sitios GABA<sub>A</sub> son descritos como receptores postsinápticos y concentrados en las neuronas del sistema nervioso y en las neuronas simpáticas periféricas, mientras que los sitios GABA<sub>B</sub> son receptores presinápticos tanto de terminales centrales como de terminales nerviosas periféricas (Hill y Bowery<sup>105</sup>, 1981). La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> es responsable de las acciones inhibitorias postsinápticas clásicas, descritas para el GABA. En cambio, la activación de receptores GABA<sub>B</sub>, el GABA (o el baclofeno) actúan disminuyendo la liberación de otros neurotransmisores; tales como la noradrenalina, el glutamato, la dopamina, o la serotonina. Los receptores GABA<sub>B</sub> pueden actuar también, disminuyendo la entrada o flujo de Ca<sup>++</sup> en las terminales nerviosas. Además, se conocen sitios moduladores de los receptores para el GABA, dentro de estos sitios moduladores, los fármacos como las benzodiazepinas y la "picrotoxina" (la

forma activa de la picrotoxina), pueden actuar modificando los efectos del GABA sobre los canales del  $Cl^-$ . El sitio modulado por la picrotoxina es distinto al sitio modulado por las

benzodiazepinas (Figura 1.06). Sin embargo, se sabe que la

bicuculina actúa compitiendo con el GABA por el mismo sitio dentro del receptor putativo, en cambio la picrotoxina actúa en forma no competitiva con el GABA en un sitio muy cercano al receptor o dentro del mismo canal de cloro (Iversen<sup>106</sup>, 1978). En cambio, las benzodiazepinas se sabe que sólo pueden potenciar las respuestas en presencia del GABA, actuando como moduladores alostéricos positivos en el receptor localizado dentro del complejo receptor gabaérgico (Olsen<sup>107</sup>, 1982).

Las benzodiazepinas entonces alteran el enlace del GABA, mientras que la picrotoxina no

lo afecta. En cambio, la picrotoxina bloquea el aumento en el

**TABLA III. Receptores gabaérgicos.**

GABA-A (GABA/BDZ/ $Cl^-$ )	GABA-B
<b>agonistas:</b>	
Muscimol	Baclofeno
3-APS	
<b>antagonistas:</b>	
Bicuculina	Faclofeno
	Saclofeno
<b>Benzodia- cepinas (BDZ):</b>	
<b>agonistas:</b>	
diazepam	
flunitrazepam	
<b>antagonistas:</b>	
flumazenil	
<b>Ionóforo o canal del ión cloro (<math>Cl^-</math>):</b>	
Barbitúricos (BB):	
depresores que interactúan con el sitio para la picrotoxina	
<b>Bloqueadores o antagonistas no competitivos.</b>	
Pentilentetrazol	
Penicilina	

flujo hacia el interior de las células o entrada del  $\text{Cl}^-$  disparado por el enlace del GABA a sus receptores. El complejo receptor GABA/Benzodiazepinas/canal de cloro ( $\text{GABA}_A$ ) se logró aislar y purificar muy recientemente y se conoce que esta constituido por dos subunidades alfa ( $\alpha$ ) y dos subunidades beta ( $\beta$ ). Más recientemente se consiguió la secuenciación de estos dos péptidos junto con el péptido del receptor para la glicina, y se mostró la existencia de estrechas homologías entre estos y con el péptido del receptor colinérgico nicotínico. Lo cual sugiere que las proteínas de membrana responsables de la transmisión de información en el cerebro son una familia de proteínas genéticamente relacionadas (Stevens<sup>108</sup>, 1987). Por otro lado, los ligandos endógenos para los sitios de unión de las benzodiazepinas y la picrotoxina no son aún conocidos, pero se sugieren, diferentes péptidos y compuestos de bajo peso molecular. Por ejemplo, el péptido 104-amino llamado péptido inhibidor del enlace de diazepam (DBI), se propuso como ligando o precursor del ligando endógeno del sitio de benzodiazepinas. Las sustancias más útiles que confirmaron la participación del GABA en la inhibición neuronal, son la bicuculina y la picrotoxina; incluso, los convulsionantes químicos, cuyas acciones eran inexplicables (la penicilina y el pentilentetrazol) actúan como antagonistas no competitivos del GABA (MacDonald y Mc Lean<sup>109</sup>, 1982). Los efectos provocados mediante la aplicación de agentes que mimetizan al GABA (agonistas directos; muscimol), o los agonistas indirectos tanto que inhiben la recaptura activa del trasmisor (2,4-diaminobutirato, ácido

nipecótico e isoguvacina; Johnston<sup>110</sup>, 1978), como los que alteran la tasa de síntesis del GABA (ácido aminooxiacético; Iversen, 1978), son bloqueados por la picrotoxina y la bicuculina. En resumen, se conocen a la fecha dos tipos distintos de receptores para el GABA; los receptores GABA<sub>A</sub>, en donde el muscimol es el agonista más potente y la bicuculina es el antagonista competitivo más selectivo y en donde el enlace del GABA puede ser aumentado por las benzodiazepinas interactuando en un sitio receptor cercano al mismo sitio receptor del GABA. Y los receptores GABA<sub>B</sub>, en donde el baclofeno es el agonista más potente y el GABA tiene poca potencia y en donde las benzodiazepinas no tienen ninguna eficacia.

#### j) Planteamiento del problema.

La primera generación de antiepilépticos sintetizados en la E.N.C.B.<sup>1</sup> por el Dr. Guillermo Carvajal et al<sup>111</sup> (1964) -la 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil-butiramida (HEPB), la 4-hidroxi, 4-fenil-butiramida (HDPB) y la 4-hidroxi, 4-metil, 4-fenil-butiramida (HMPB)- fueron diseñados para inhibir la enzima que cataboliza el GABA, la GABA-Transaminasa, sin embargo resultaron débiles inhibidores de la GABA-T. Más tarde, Tapia et al<sup>112</sup> (1979) propusieron que su potencia anticonvulsiva de la HEPB se relacionaba con sus acciones como agonista parcial del GABA. Sin embargo, el mismo grupo rechazó tal hipótesis al probar que dicho

---

<sup>1</sup> Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

fármaco no modificaba: los niveles de GABA, la liberación, la recaptura, ni los receptores postsinápticos. Por lo tanto, una segunda generación de fármacos antiepilépticos fueron sintetizados por el Dr. Carvajal et al<sup>113</sup> (1990), estos fueron una serie homóloga a la HEPB y fueron ya motivo de amplias evaluaciones en relación a su acción farmacológica y toxicológica subaguda (Martínez de Muñoz<sup>114</sup>, 1990). Además se efectuaron numerosos estudios, cuyos resultados permitieron establecer el siguiente perfil farmacológico:

- A. Los anticonvulsivos homólogos de la HEPB (3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil-propionamida = HEPP y 2-hidroxi, 2 etil, 2-fenil-acetamida = HEPA), son mezclas racémicas que tienen una estructura química diferente a la de los antiepilépticos que actualmente se utilizan en la terapia humana.
  
- B. El espectro de acción antiepiléptica de los tres compuestos es similar y muy amplio, se parece al de valproato y al de fenobarbital, lo que los hace buenos candidatos como antiepilépticos (ver TABLA IV).

TABLA IV. Potencia anticonvulsionante de HEPB y homólogos Tomada de Martínez de Muñoz<sup>115</sup>, 1991.

MODELO EXPERIMENTAL	ANTICONVULSIVO					
	HEPB		HEPP		HEPA	
	DE <sub>50</sub>	IT	DE <sub>50</sub>	IT	DE <sub>50</sub>	IT
Electrochoque (30-35 mA/200mseg.)	148	0.75	144	1.4	126	1.04
Pentilentetrazol (72 mgkg <sup>-1</sup> )	63	1.76	63	3.3	67	1.97
4-Aminopiridina (15 mgkg <sup>-1</sup> )	29	3.82	19	11.2	24	5.5
Bicuculina (3.35 mgkg <sup>-1</sup> )	30	3.7	38	5.6	29	4.5
Tiosemicarbazida (20 mgkg <sup>-1</sup> )	73	1.5	43	4.9	47	2.8
Estricnina (2 mgkg <sup>-1</sup> )	106	1.04	NP	NP	56	2.3
Picrotoxina (16 mgkg <sup>-1</sup> )	NP	NP	NP	NP	NP	NP

DE<sub>50</sub> = Dosis efectiva media, DT<sub>50</sub> = Dosis tóxica media, IT = Índice terapéutico y NP = No protección. IT = (DT<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>).

- C. Los estudios toxicológicos han demostrado que la HEPB y la HEPA tienen toxicidad aguda y subaguda similar a la de algunos antiepilépticos en uso y que la HEPP es incluso menos tóxica que la mayoría de los antiepilépticos prototipo (ver TABLA V).

TABLA V. Características toxicológicas de HEPB y homólogos\*Tomada de  
 Martínez de Muñoz, 1991.

	TD <sub>50</sub> *	LD <sub>50</sub> *	LD <sub>50</sub> **
HEPB	111 (100-122) [1.34]	395 (367-425) [1.15]	483 (438-533) [1.17]
HEPP	214 (203-226) [1.20]	767 (665-886) [1.26]	858 (734-1003) [1.57]
HEPA	132 (119-146) [1.37]	269 (234-308) [1.25]	474 (402-557) [1.18]

TD<sub>50</sub> = Dosis tóxica media y LD<sub>50</sub> = dosis letal media

\* = Administración i.p.; \*\* = Administración oral.

() = 95% intervalo de confianza.

[] = Pendiente de la línea de regresión.

- D. Las pruebas morfológicas preliminares de hepatotoxicidad mostraron que la HEPP es la más segura, la HEPA es intermedia y la única que presenta toxicidad a dosis altas es la HEPB.

- E. La mayoría de los estudios fisiológicos se han hecho con la HEPB. Sin embargo, las investigaciones recientes han demostrado que HEPP es más efectiva que los otros dos compuestos en el kindling y en otros modelos experimentales de epilepsia.
- F. Por lo expuesto previamente, la HEPP es la que presenta los índices terapéuticos más elevados y por ello se ha seleccionado para terminar los estudios preclínicos de seguridad y eficacia, así como para determinar su posible mecanismo de acción.

En un estudio previo Solís et al<sup>116</sup> (1979) evaluaron la potencia anticonvulsiva de la HEPB en un grupo de gatos sometidos a la estimulación diaria tipo kindling de la amígdala del lóbulo temporal. Por lo que nos pareció interesante utilizar en este estudio el modelo del "kindling" ya que se consideró el modelo más útil para el análisis de las propiedades anticonvulsivas de estas drogas. La estabilidad del fenómeno, así como el control graduado de los cambios producidos por la estimulación eléctrica iterativa (kindling), permiten el estudio de los posibles efectos protectores de la droga ya sea sobre el desarrollo de las crisis convulsivas o sobre el umbral convulsivo cuando las crisis ya están establecidas (Wada<sup>117</sup>

,1977). Por otro lado, el hipocampo es una estructura importante para la generación de las crisis convulsivas (Mc Namara et al<sup>118</sup>.,1985).

#### **x) Objetivos.**

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar los cambios en la inhibición neuronal temprana en el giro dentado del hipocampo después de la estimulación de la vía perforante (kindling en la corteza entorrinal) cada hora.
- 2) Examinar los efectos anticonvulsivos del HEPP en ratas sometidas a la estimulación tipo kindling y sobre el estado de la inhibición neuronal temprana en el giro dentado.
- 3) Valorar el efecto agudo de la HEPP sobre la excitabilidad del hipocampo y comparar este efecto con el de la butiramida (HEPB).

#### **1) Hipótesis.**

- 1) Si la estimulación con pulsos simples desde la corteza entorrinal (vía del patrón perforante) permite provocar el potencial sináptico en las células granulares del giro dentado entonces la estimulación iterativa con trenes de alta

frecuencia, tanto de la corteza entorrinal (kindling en la corteza entorrinal) como en el giro dentado (kindling del giro dentado) provocarán de igual modo la desaparición gradual de la inhibición neuronal temprana en las células granulares del giro dentado del hipocampo.

2) Si la estimulación iterativa de la vía perforante provoca la desaparición gradual de la inhibición neuronal temprana en el giro dentado entonces se producirá un cambio permanente y estable en el umbral convulsivo cuando las crisis convulsivas generalizadas ya están presentes.

3) Si la activación de las descargas de la población de espigas en el giro dentado son indispensables para la propagación de la actividad convulsiva en el hipocampo entonces los agentes farmacológicos que selectivamente bloqueen esta activación serán los agentes más específicos para el tratamiento de las crisis parciales.

4) Si la depresión por par de pulsos refleja inhibición mediada por el GABA entonces la potencia anticonvulsiva debe estar directamente relacionada con la disminución de la excitabilidad de las células granulares (IMI).

## 2. MATERIAL Y METODOS.

a) **Kindling en la corteza entorrinal.** Se utilizaron ratas adultas macho de la cepa Wistar con peso corporal entre 250 a 300 gramos, alimentadas Ad Libitum, y mantenidas en condiciones de humedad (45%), temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), y ciclo de luz-obscuridad constantes [luz artificial (100 a 120 lux) de las 8:00 a las 20:00 h]. Previa anestesia con uretano (1 grkg<sup>-1</sup>) cada rata fue colocada en el marco estereotáxico (DKI 911). El cráneo fue expuesto y se colocó en la corteza entorrinal un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable 0.01 mm aislado excepto en la punta [coordinada anteroposterior= -7.5; lateral= 4.5; y vertical= -4.5] y un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable para el registro del giro dentado ipsilateral (AP= -3.3; Lat= 2.0; y Vert= -3.5) de acuerdo al bregma de la rata (Paxinos y Watson<sup>19</sup>, 1982), adicionalmente fueron colocados un par de electrodos para el registro de la actividad de la corteza somatosensorial. Después de la recuperación postoperatoria se provocó el cambio en el umbral convulsivo mediante la aplicación de estímulos subumbrales (Estimulador GRASS S11 con unidad de aislamiento PSIU6) en la corteza entorrinal lateral (CEL) hasta obtener crisis convulsivas generalizadas. Los estímulos se aplicaron cada hora (28 a 32) de tal forma que después de que los animales alcanzaron el estado conductual "5" según la clasificación del fenómeno kindling, que

consiste en que los animales presenten crisis convulsiva generalizada por la aplicación de un estímulo y por lo tanto, muestran ya un cambio permanente en la excitabilidad neuronal.

**b) Ensayo anticonvulsionante.**

Los animales fueron colocados en una caja de acrílico transparente de 20 x 40 x 20 cm., por lo menos durante una hora antes de la administración de los fármacos según el caso (ver tabla IV).

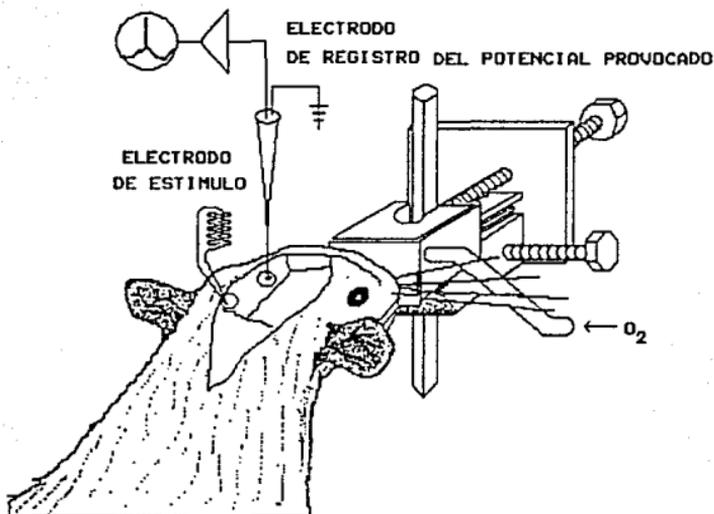
Las ratas fueron observadas **TABLA IV. Tratamientos**

continuamente y sometidas a una sesión de registro electroencefalográfico durante un periodo de dos horas después de la administración de cada fármaco. Cada animal recibió una dosis intraperitoneal y fueron comparados con los animales que recibieron solución salina únicamente. Durante este tiempo

---

-salina 0.1 ml/100 g de peso corporal, i.p.; n=6
-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida 25, 50 y 100 mgkg <sup>-1</sup> , i.p.; n=6
-4-hidroxi-4-etil-4-fenil-butiramida* 60 mgkg <sup>-1</sup> , i.p.; n=6

---



**Figura 2.01 Modelo experimental agudo usado para registrar y estimular.** La ratona está anestesiada e inmobilizada y mantenida con respiración artificial hasta el final del experimento.

fue calificada la presencia o ausencia de los siguientes estados: 1) clonus facial (movimientos del hocico y/o la cara); 2) sacudidas de la cabeza (movimientos oscilatorios de la cabeza o nodding); 3) clonus de las extremidades anteriores (sacudidas clónicas de las patas anteriores); 4) erección de la ratona (el animal se yergue y se sostiene sobre sus patas posteriores); y 5) erección y caída hacia atrás de la ratona (crisis generalizada con pérdida del control postural).

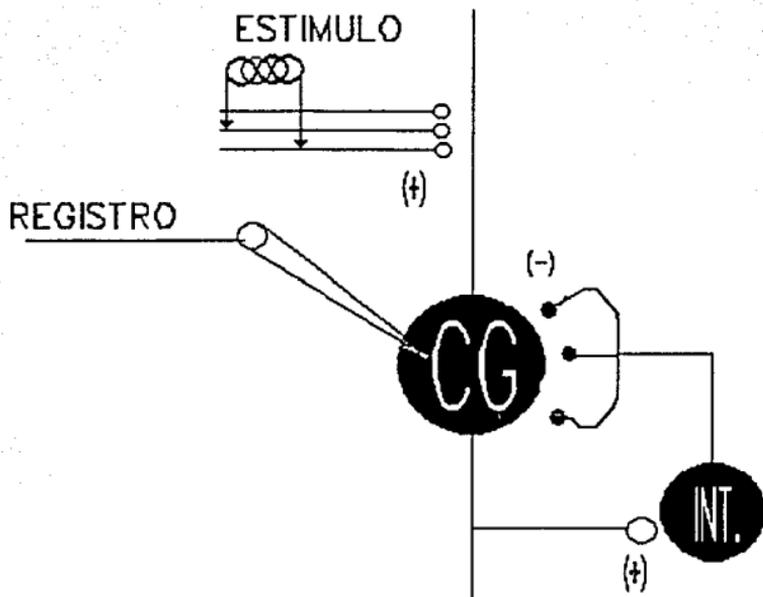


Figura 2.02 Los potenciales de campo fueron registrados en el giro dentado (REGISTRO) en respuesta al estímulo (pulsos bifásicos) en la corteza entorrinal ipsilateral (ESTIMULO).

### c) Prueba de pulsos pares.

En estos experimentos se utilizaron ratas previamente estimuladas con kindling ya permanente (kindleadas) o en condiciones normales (controles o testigos), las cuales fueron anestesiadas con uretano ( $1.2 \text{ grkg}^{-1}$ , i.p.; Sigma) e inmovilizadas con bromuro de pancuronio ( $0.2 \text{ mgkg}^{-1}$ , i.m.; Pavulon, Organon) e inmediatamente colocadas en el estereotáxico (DKI 911). El cráneo fue expuesto y se colocó un

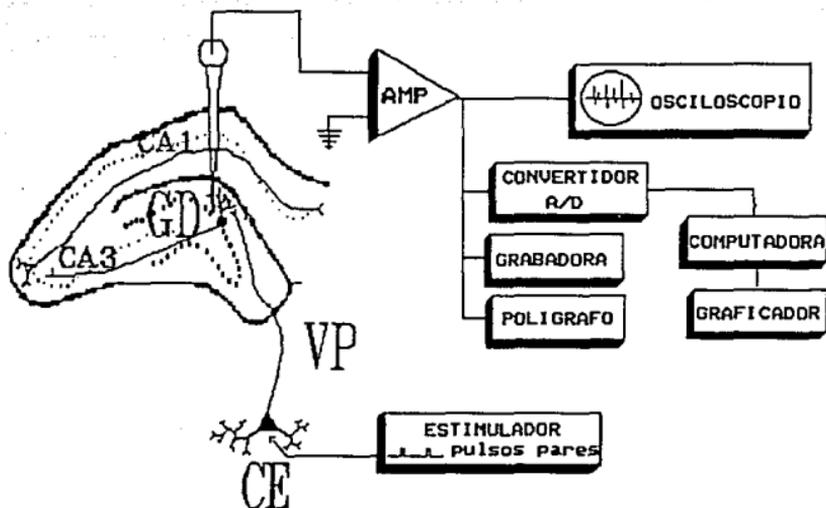
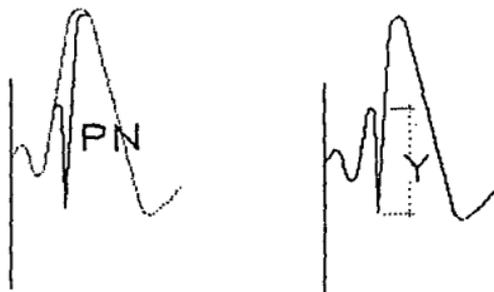


Figura 2.03 Diagrama del sistema de registro y análisis de las señales bioeléctricas.

electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable 0.01 mm, en la corteza entorrinal lateral ( $AP = -7.5$ ;  $Lat = 4.5$ ; y  $Vert = -4.5$ ). La profundidad fue ajustada de acuerdo a la respuesta máxima provocada en el giro dentado ipsilateral, adicionalmente fueron colocados electrodos para el registro de la actividad de la corteza somatosensorial (GRASS 78B). Los potenciales de campos fueron registrados a través de una micropipeta de vidrio, previamente llena con azul de pontamina al 2.5 % en KCl 2 Molar. Se colocó en el giro dentado del hipocampo ( $AP = -3.3$ ; y  $Lat = 2.0$ ) ver figura 2.02, y se introdujo mediante un micromanipulador manual (DKI 1207B), hasta llegar a la posición final del electrodo de registro, la cual fue ajustada de acuerdo a los potenciales de campo

obtenidos al inicio del experimento ( $\approx 3,500\mu\text{m}$ ). Los animales durante todo el experimento fueron mantenidos con temperatura a  $37^\circ\text{C}$  y la posición final de los electrodos era confirmada de acuerdo al método histológico descrito por Solís<sup>120</sup> (1988) Figura 3.14. La señal fue amplificada (Amplificador AC/DC e inyector de corriente; Solís et al<sup>121</sup> ,1985) y observada en un osciloscopio (para la observación de la respuesta provocada). Los potenciales extracelulares de campo (PPSE) fueron registrados en el giro dentado del hipocampo en respuesta al estímulo (pulso bifásico simple 0.2 mseg de duración y entre 4 a 8 Volts) en la corteza entorrinal ipsilateral al hipocampo (Figura 2.03). Se valoró la amplitud de la población de espigas en el giro dentado que depende directamente del número de células granulares activadas (Andersen et al<sup>122</sup> ,1971; Lomo<sup>123</sup> ,1971). Además, se aplicaron un par de pulsos o estímulos a la corteza entorrinal separados temporalmente en forma precisa, con el fin de provocar la inhibición mediada interneuronalmente en el giro dentado del hipocampo y medirla posteriormente. Cuando el intervalo entre pulsos se mantuvo fijo, la magnitud de la depresión por par de pulsos alcanzó su máximo al llegar a la intensidad umbral. Cuando la intensidad del estímulo se mantuvo fija, se alcanzó una inhibición máxima a un intervalo mínimo de 25 mseg. entre pulsos. En todos los casos después de la amplificación de la señal (preamplificador AC/DC), los potenciales fueron observados en un osciloscopio (Tektronix 5113) y en un polígrafo (GRASS 78B), y paralelamente grabados (Hewlett Packard 3968A). Mediante una interfase analógica-digital (RC electronics,

Modelo SC18) se alimentaron a una computadora (At, Hewlett Packard Vectra ES/12) y transmitidos para su promediación y análisis en línea (Figura 2.03). Posteriormente se midió la relación entre la amplitud promedio de la población de espigas provocadas por el segundo estímulo [PN(T)] y la amplitud promedio de la población de espigas provocada por el estímulo condicionante [PN(C)] (Figura 2.04). Como consecuencia del uso de la relación  $PN(T) / PN(C)$  se obtuvo el "índice de máxima inhibición".



AMPLITUD PROMEDIO =  $\Delta Y$

Figura 2.04 Sistema de medición de la amplitud promedio ( $\Delta Y$ ) en la computadora (N=5). Las líneas punteadas (Y) indican la situación de los cursores mediante los cuales se calcula la amplitud según corresponda.

d) **Análisis Estadístico.** Los resultados del estudio se analizaron en una computadora pc IBM compatible utilizando el programa STATA (Hamilton<sup>124</sup>, 1990). Las pruebas de hipótesis que se utilizaron para comparar las medias de los datos, previo análisis de tendencias con un ANOVA para variables independientes, fueron la prueba "F" de Scheffe y "t" de Students.

### 3. RESULTADOS.

#### a) **Kindling en la corteza entorrinal.**

En la Figura 3.01A se muestra el desarrollo del estado convulsivo después de la estimulación tipo kindling cada hora en la corteza entorrinal y en el giro dentado del hipocampo. En un primer grupo de 24 ratas con electrodos implantados crónicamente, se estimuló la corteza entorrinal con trenes tetanizantes cada hora que provocó cambios en la conducta a partir de la séptima sesión de estimulación. En estos animales se alcanzó el estado convulsivo "2", que se mantuvo hasta la decimo quinta sesión de estimulación para alcanzar entonces el estado convulsivo "3" seguido posteriormente en la vigesimo segunda sesión el estado convulsivo "4" y finalmente se llegó en la trigesima sesión al estado

convulsivo "5" en todos los animales. En un segundo grupo de animales se estimuló el giro dentado del hipocampo con trenes tetanizantes cada hora. Se encontró que a partir de la quinta sesión de estimulación, se alcanzó el estado convulsivo "2",

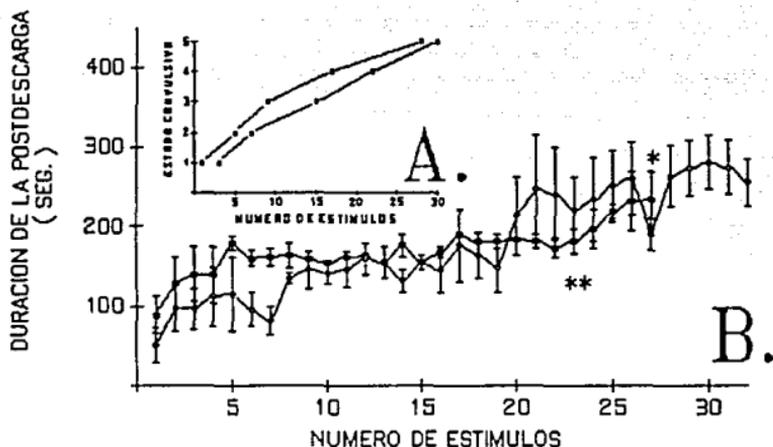


Figura 3.01 A) Estado convulsivo alcanzado tanto por el grupo de ratas estimuladas sólo en la corteza entorrinal (o) y para el grupo estimulado sólo en el giro dentado (●). En la abscisa, se indica el número de estímulo aplicado (horas) y en la ordenada se indica el estado convulsivo. B) Aumento en la duración de la postdescarga durante la estimulación de la corteza entorrinal (o) o el giro dentado (●). En la abscisa, se indica el número de estímulo aplicado (horas) y en la ordenada se indica la duración promedio de la postdescarga en segundos (ANOVA  $F_{8,31} = 50.03$  y  $21.13$   $p < 0.0001$ ). Los asteriscos indican el estímulo en el que aparecieron las crisis convulsivas generalizadas en todas las ratas.

seguido por un aumento al siguiente estado convulsivo en la novena sesión (el estado convulsivo "3") posteriormente se alcanzó en la decimo séptima sesión el estado convulsivo "4" y finalmente en la vigesimo octava sesión se llegó al máximo estado convulsivo "5" en todos los casos (ver Figura 3.01A). En la Figura 3.01B también se muestra la evolución de la duración de la postdescarga para las mismas ratas, en las cuales se encontró diferencias estadísticamente significativas (ANOVA,  $F_{8,31} = 21.13$   $p < 0.0001$ ). Posteriormente a cada grupo de seis ratas se les administró HEPP una sola dosis (0, 25, 50 ó 100 mg/kg<sup>-1</sup>) por vía intraperitoneal, inmediatamente después de recibir 5 sesiones de estímulos eléctricos en la corteza entorrinal lateral de intensidad umbral para desencadenar la postdescarga en el hipocampo y el estado convulsivo "5" según la clasificación conductual del fenómeno kindling, que consiste en que los animales presentan crisis convulsiva generalizada por la

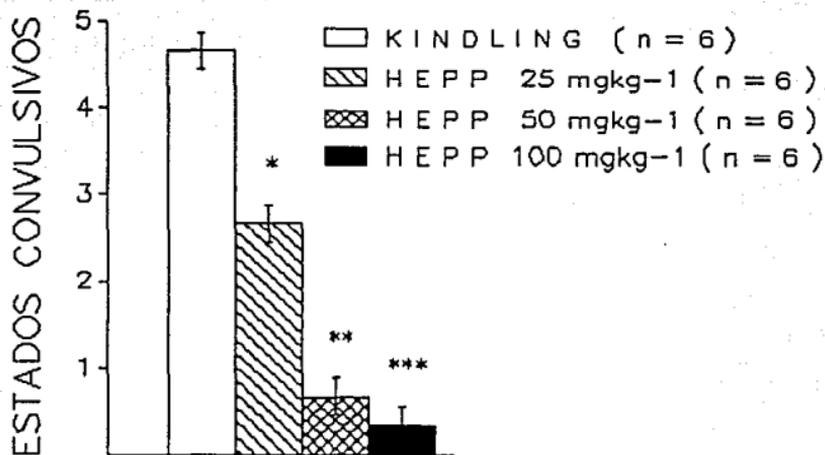


Figura 3.02 Efectos de las diferentes dosis de la 3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP) sobre el estado convulsivo de la rata en el kindling establecido en la corteza entorrinal.

Nótese la reducción más significativa con la dosis de 100 mgkg<sup>-1</sup>; \* p < 0.01, \*\* p < 0.001 y \*\*\* p < 0.0001, Prueba "t" de Students con 10 g.l. 6.707, 13.416 y 14.534 respectivamente.

aplicación de un sólo estímulo y por lo tanto, muestran un cambio permanente en la excitabilidad neuronal. En estos animales la propionamida o HEPP a la dosis de  $25 \text{ mgkg}^{-1}$  (i.p.) provocó una disminución en el estado convulsivo, es decir, los animales ya no mostraron crisis convulsiva generalizada y sí un patrón conductual que consistió en una crisis focal que en términos de clasificación del "kindling" corresponde al estado convulsivo "3" estadísticamente significativa (prueba "t" de Students = 6.707, g.l. = 10 y  $p < 0.01$ ; ver Figura 3.02). De igual manera la administración de la propionamida a dosis de 50 y  $100 \text{ mgkg}^{-1}$  provocaron una reducción muy clara del estado convulsivo ya que sólo se observó como máximo, el estado convulsivo "1" en todos los animales (prueba "t" de Students = 13.416 y 14.534, g.l. = 10;  $p < 0.001$  y  $0.0001$  respectivamente). La Figura 3.03 muestra la duración de la postdescarga cuando los animales ya presentaban el estado convulsivo "5" ( $\bar{x} = 319 \pm \text{d.s.} = 41$  segundos). La administración de HEPP a la dosis de  $25 \text{ mgkg}^{-1}$  antes de la aplicación del estímulo tetanizante, disminuyó ligeramente la duración de la postdescarga en un 29% ( $\bar{x} = 225 \pm \text{d.s.} = 9$  segundos), mientras que la propionamida a la dosis de  $50 \text{ mgkg}^{-1}$  la disminuyó un 61% ( $\bar{x} = 123 \pm \text{d.s.} = 22$  segundos), y la dosis de  $100 \text{ mgkg}^{-1}$

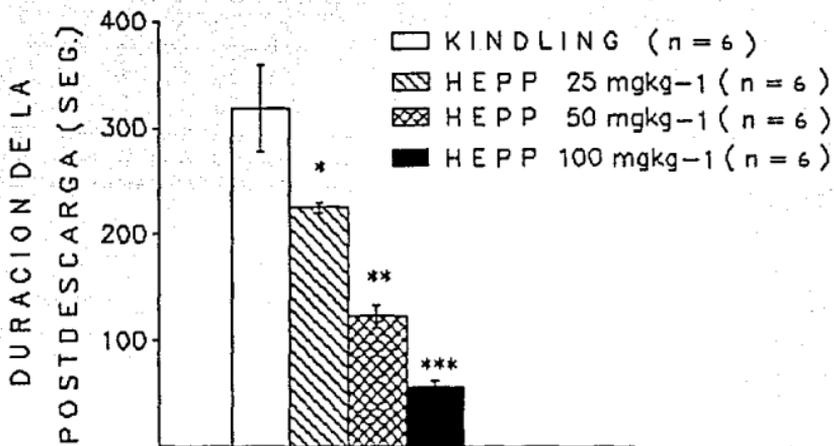


Figura 3.03 Efectos del HEPP sobre la duración de la postdescarga en el kindling establecido en la corteza entorrinal. Efecto de la propionamida (HEPP 25, 50 o 100 mgkg<sup>-1</sup>) sobre la duración de la postdescarga en ratas estimuladas en la corteza entorrinal. El régimen de estimulación consistió en pulsos eléctricos bifásicos con 60 Hz de frecuencia, 0.2 mseg de duración del pulso y con un tren de estímulos de 1 segundo. Los estímulos se aplicaron cada hora y las postdescargas se registraron en el giro dentado del hipocampo. Se consideró que el kindling ya estaba establecido cuando la rata mostraba crisis convulsivas generalizadas (cinco sesiones de estimulación consecutivas que presentaba el estado convulsivo "5"). \* p < 0.06, \*\* p < 0.003 y \*\*\* p < 0.0007 prueba "t" de Students con 10 g.l. = 2.258, 4.602 y 6.344 respectivamente.

provocó una disminución de un 82% estadísticamente significativa ( $\bar{x} = 55 \pm \text{d.s.} = 11$  segundos; prueba "t" de Students = 6.344, g.l. = 10 y  $p < 0.0007$  ; ver Figura 3.03).

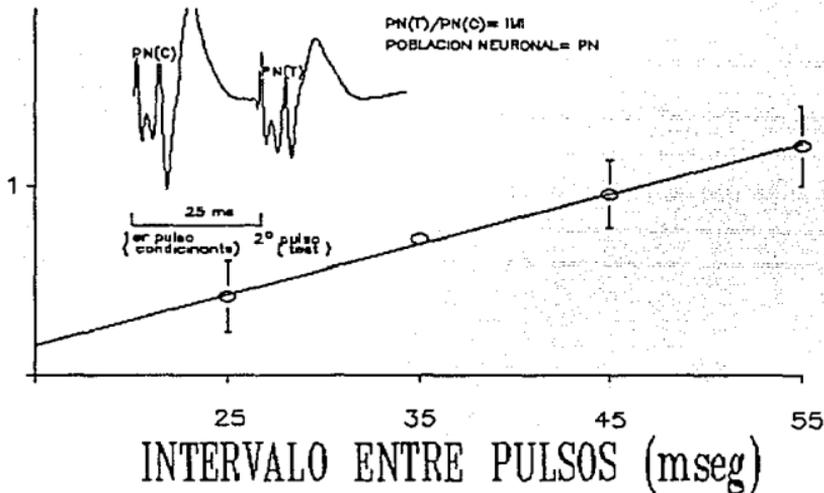


Figura 3.04 Índice de máxima inhibición definido en función del intervalo entre el potencial provocado por el pulso condicionante (C) y el pulso prueba (T). Nótese que con intervalos que están dentro de los 20 a 40 mseg., el  $IMI = PN(T)/PN(C)$  muestra siempre valores menores de 1. En nuestros estudios utilizamos un intervalo de 25 mseg. para valorar particularmente la inhibición neuronal temprana.

**b) Prueba de pulsos pares.**

En un segundo grupo de 30 ratas, anestesiadas con uretano, inmovilizadas con pancuronio y mantenidas con respiración mecánica se valoró la inhibición recurrente. En estos animales previamente se provocó el cambio en la excitabilidad neuronal por la aplicación de 32 estímulos eléctricos a la corteza entorrinal. Se cuantificó el grado de inhibición mediante el índice de máxima inhibición (IMI) que se definió como la razón

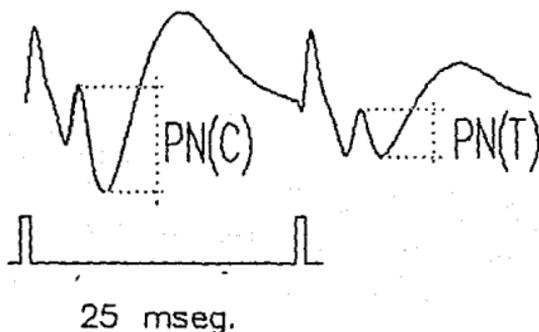


Figura 3.05 Las características típicas de las respuestas a los pulsos pares antes de iniciar las sesiones de estimulación tipo kindling.

entre la amplitud del potencial neuronal del segundo potencial provocado prueba [PN(T)] a la amplitud del potencial neuronal del primer potencial provocado condicionante [PN(C)] ( $IMI=PN(T)/PN(C)$ ); Figura 3.04). Como se muestra en la Figura 3.04, cuando el intervalo entre el pulso condicionante (C) y el pulso prueba (T) está entre 25 a 55 milisegundos, el IMI siempre muestra valores menores que uno. Las características principales de las respuestas a los pulsos pares en el periodo control o sea antes de iniciar las sesiones de estimulación tipo kindling (K1) [Figura 3.05]:

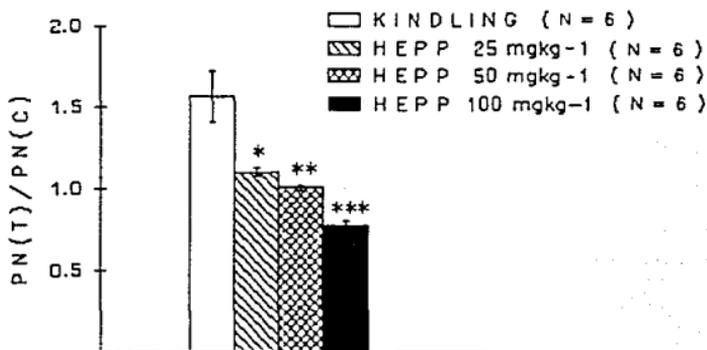


Figura 3.06 Índice de Máxima Inhibición.

1.- Si el estímulo es de intensidad umbral, la respuesta al primer pulso se caracteriza por una deflexión negativa (Potencial Sináptico = PS) seguida por una deflexión positiva-negativa (Población Neuronal=PN) y es seguida por una positividad más lenta. La duración es de alrededor de 10 a 12 mseg. (Figura 3.05).

2.-La respuesta al segundo pulso, el cual es dado cada 25 mseg. después del primer pulso, mostró también una deflexión negativa seguida por un componente positivo-negativo claramente menor que la respuesta al primer pulso y finalmente una onda más lenta de polaridad opuesta. Esta respuesta sólo se correlacionó con una disminución de la actividad unitaria o potenciales extracelulares de las células granulares del giro dentado en algunos animales (Figura 3.05).

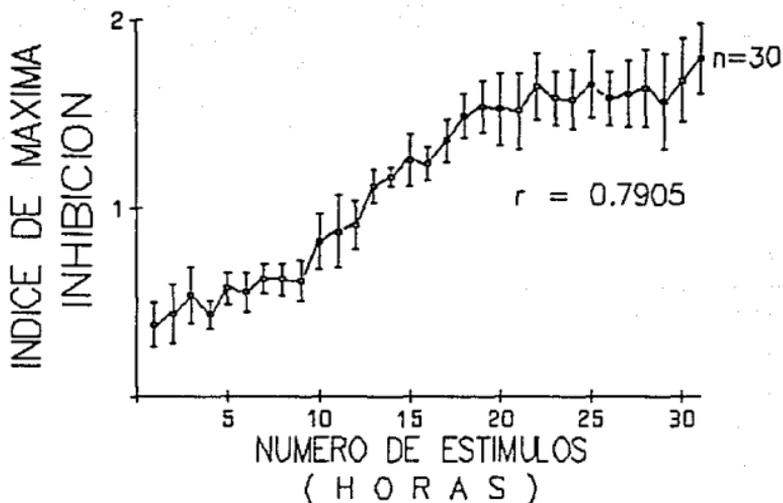


Figura 3.07 Índice de Máxima Inhibición (IMI) durante la estimulación de la corteza entorrinal de la rata. En la abscisa, se indica el número y/o horas de estimulación y en la ordenada se indican los valores del IMI.

En este grupo de animales implantados crónicamente, se estimuló la corteza entorrinal con trenes tetanizantes cada hora lo que provocó cambios en el índice de máxima inhibición a partir de la novena sesión de estimulación. En estos animales se incrementaron

gradualmente los valores del índice de máxima inhibición hasta alcanzar valores mayores que 1, y que consecuentemente se llegó al estado convulsivo "5" en todos los animales en la trigésima sesión (ANOVA,  $F_{1,30} = 113.21$   $p < 0.0001$ ; ver Figura 3.07). La estimulación tipo kindling siempre llevó a la aparición de la postdescarga en el giro dentado del hipocampo, la cual se incrementó en duración conforme se aplicaron las estimulaciones (Figura 3.08). En la figura 3.07 se muestra la evaluación del estado de la excitabilidad dentro de la vía perforante, utilizando el método de los estímulos pares para analizar los cambios que, ocurren en los potenciales de campo al inicio del kindling (K1), durante el desarrollo del kindling (K13) y en las etapas finales del kindling (K21). Dentro de las características más importantes de las respuestas a los pulsos pares en las últimas sesiones de estimulación tipo kindling (K21-30) son las siguientes:



Figura 3.08 Evolución temporal de los cambios en el potencial provocado por la aplicación de estímulos pares a la corteza entorrinal. Los potenciales se registraron en el giro dentado del hipocampo y la corteza entorrinal se estimuló eléctricamente de manera intermitente (un estímulo cada hora) con intensidad umbral para desencadenar una postdescarga en el hipocampo. Los cambios en la amplitud del segundo componente del segundo potencial provocado reflejan la ausencia de la inhibición neuronal. Los números indican el tiempo en horas que se corresponde con el número de estímulos aplicados.

1.- Las amplitudes de los PN aumentaron en respuesta al primer estímulo, así como la duración, particularmente la constante de tiempo (Figura 3.08).

2.-El componente tardío tiende a desaparecer y es substituido por potenciales de polaridad negativa-positiva.

3.-La relación entre las amplitudes del PN provocado por el primer y segundo estímulos cambia drásticamente en favor de la segunda respuesta. Estos cambios se correlacionan con mayor duración de la postdescarga y aumentos muy significativos de los potenciales extracelulares de las células granulares en el giro dentado (Figura 3.08).

En la Figura 3.09 se muestran los valores del índice de máxima inhibición después de la estimulación de la corteza entorrinal. En estos experimentos farmacológicos siempre utilizamos el intervalo de 25 mseg. con el fin de valorar la inhibición neuronal temprana. La administración de HEPP a las dosis de 25  $\text{mgkg}^{-1}$  y de 50  $\text{mgkg}^{-1}$  disminuyeron un 30% y 34% respectivamente el IMI ( $\bar{x} = 1.03 \pm \text{d.s.} = 0.05$  y  $\bar{x} = 1.035 \pm \text{d.s.} = 0.035$ ; prueba "t" de Students= 2.087 y 2.48, g.l.= 10 y  $p < 0.08$  y  $0.04$ ) en las ratas que previamente mostraban valores mayores que 1 como consecuencia de la estimulación eléctrica iterativa de la corteza entorrinal ( $\bar{x} = 1.77 \pm \text{d.s.} = 0.3$ ) y por lo tanto se consideró que el cambio en la excitabilidad ya estaba establecido. El HEPP a la dosis de 100  $\text{mgkg}^{-1}$  disminuyó

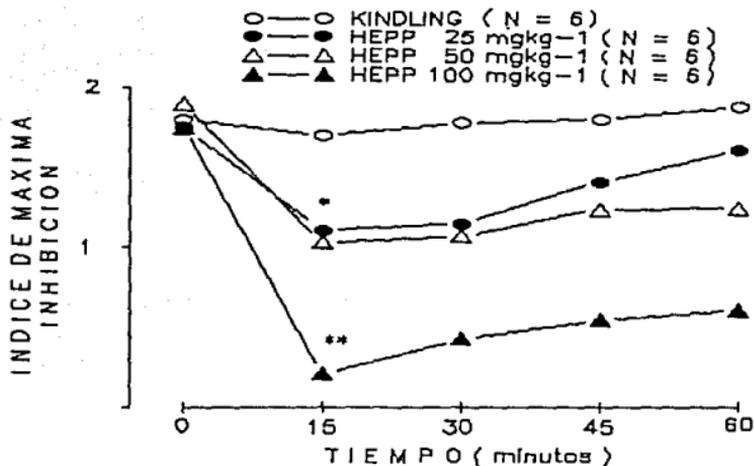


Figura 3.09 Evolución temporal de los efectos de la propionamida (HEPP 0, 25, 50 ó 100 mgkg<sup>-1</sup>) sobre el índice de máxima inhibición (IMI) en ratas estimuladas (kindling) en la corteza entorrinal. En todos los casos se evaluó el IMI utilizando un intervalo de 25 mseg. para valorar particularmente la inhibición neuronal temprana. Los potenciales de campo, se registraron en el giro dentado del hipocampo y la corteza entorrinal se estimuló eléctricamente de manera intermitente (un estímulo cada hora), con intensidad umbral para desencadenar una postdescarga en el giro dentado del hipocampo.

significativamente un 90% el valor del IMI ( $\bar{x} = 0.21 \pm 0.05$ ; prueba "t" de students = 2.553, g.l. = 10 y  $p < 0.01$ ; ver Figura 3.09).

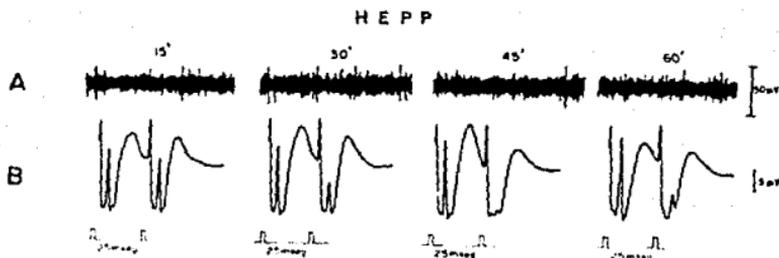


Figura 3.10 Evolución temporal de los efectos de la propionamida (HEPP) sobre los potenciales provocados por la aplicación de un par de estímulos a la corteza entorrinal. Se ilustran los potenciales obtenidos 15, 30, 45 y 60 minutos después de la aplicación de HEPP ( $50 \text{ mgkg}^{-1}$ , i.p.) a la rata. Nótese la disminución en la amplitud del segundo componente PN(T) del segundo potencial provocado, lo que refleja mayor depresión neuronal en el giro dentado cuando el intervalo entre el pulso condicionante y el pulso prueba es de 25 mseg.

El efecto máximo se observó a los 15 minutos después de la administración de HEPP. Estos efectos mostraron una duración máxima de aproximadamente 60 minutos (Figura 3.09).

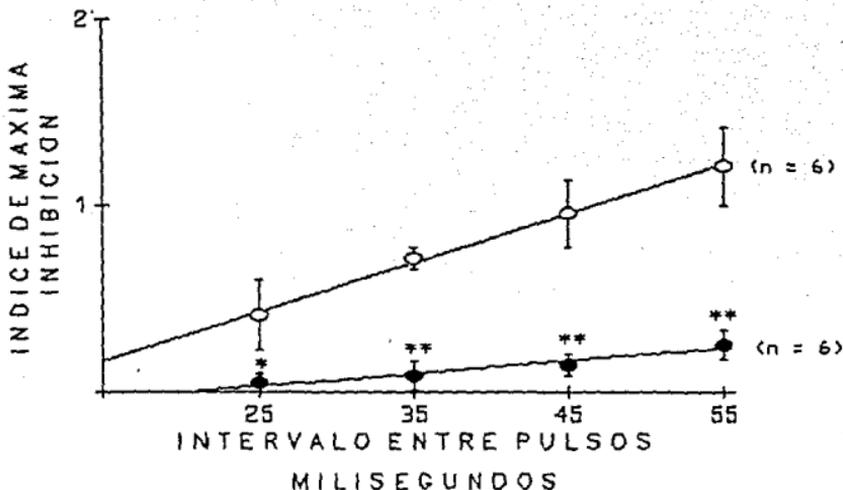


Figura 3.11 Efecto de la propionamida (HEPP) sobre el índice de máxima inhibición neuronal cuando se incrementa el intervalo entre el pulso condicionante (C) y el pulso prueba (Test). En estas condiciones el IMI siempre muestra valores menores que uno, en los animales testigo (o) entre los intervalos de 25 a 45 msec. Nótese que en las ratas tratadas con HEPP (e) hasta en el intervalo de 55 ms se alcanzan valores muy cercanos al cero. Los valores de significancia estadística \*  $p < 0.001$  y \*\*  $p < 0.0001$ ; Prueba "t" de Students con 10 g.l. = 4.262, 16, 9.132 y 7.986 respectivamente.

En un último grupo de animales se cuantificaron los efectos de la propionamida y la butiramida en la prueba de pulsos pares variando el intervalo entre pulsos. Cuando la intensidad de los pulsos se mantuvo fija, la magnitud de la depresión por par de pulsos alcanzó su máximo al llegar a un intervalo mínimo de 25 mseg. entre pulsos (prueba "t" de Students= 4.262, g.l.= 10 y  $p < 0.0001$ ; ver Figura 3.10). En estos animales simultáneamente se observaron los potenciales extracelulares espontáneos de las células granulares en el giro dentado del hipocampo y paralelamente se registró el electrocortigrama para evidenciar efectos depresores (Figura 3.10). En la figura 3.10 también se muestra la evolución temporal de los efectos del HEPP o propionamida a la dosis de  $50 \text{ mgkg}^{-1}$  sobre la depresión neuronal por aplicación de pulsos pares cuando el intervalo entre el pulso condicionante (C) y el pulso prueba (Test) es de 25 mseg. Se observó una correlación directa entre la actividad extracelular espontánea y los potenciales provocados en el giro

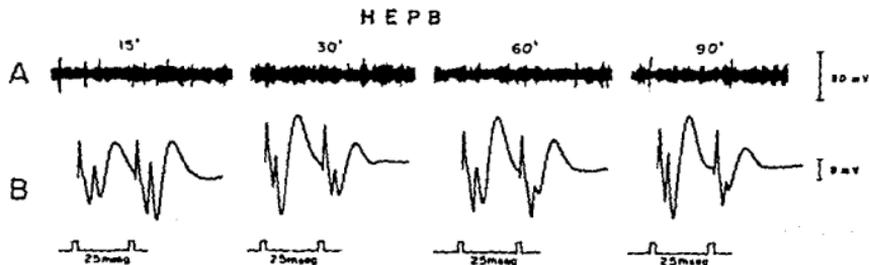


Figura 3.12 Evolución temporal de los efectos de la butiramida (HEPB) sobre el promedio de los potenciales provocados por la aplicación de un par de estímulos a la corteza entorrinal. Se ilustran los potenciales obtenidos 15, 30, 60 y 90 minutos después de la aplicación de HEPB ( $60 \text{ mgkg}^{-1}$ , i.p.) a la rata. Nótese la disminución en la amplitud del segundo componente del segundo potencial provocado = PN(T).

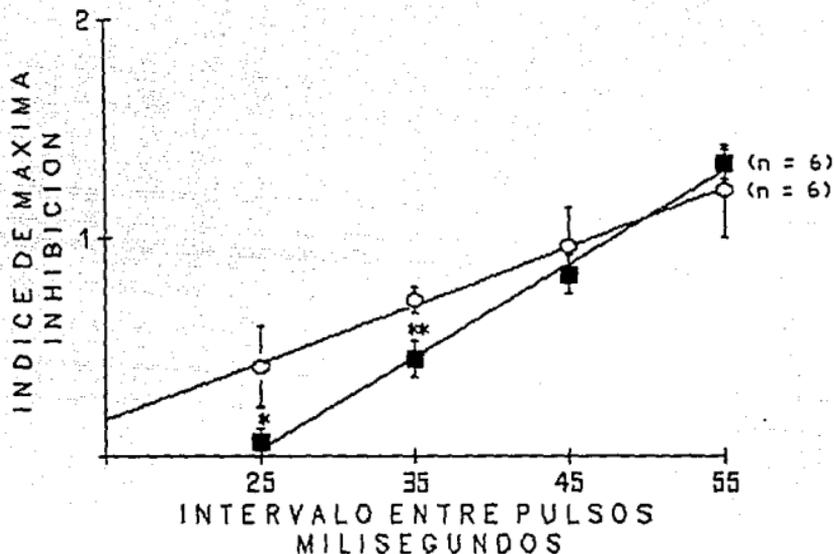


Figura 3.13 Efecto de la butiramida (HEPB) sobre el índice de máxima inhibición neuronal cuando se incrementa el intervalo entre pulsos. Nótese que en las ratas tratadas con HEPB (■) en el intervalo de 45 mseg. ya se alcanzan valores mayores que 1. Los valores de significancia estadística \*  $p < 0.002$  y \*\*  $p < 0.005$ , Prueba "t" de Students con 10 g.l. 4.04 y 3.581 respectivamente.

dentado del hipocampo asociada con una actividad electroencefalográfica sin modificaciones importantes. El efecto máximo también se observó a los 15 minutos después de la administración de HEPP. Estos efectos mostraron una duración máxima de aproximadamente 60 minutos (Figura 3.10). En el tiempo de efecto máximo, entonces se procedió a evaluar el IMI con la prueba de pulsos pares variando el intervalo entre pulsos (Figura 3.11). En estas mismas condiciones cuando la intensidad de los pulsos pares se mantuvo fija, la magnitud de la depresión por par de pulsos alcanzó su máximo al llegar al intervalo mínimo de 25 mseg. entre pulsos y en estas condiciones los animales se mantuvieron con valores muy cercanos a cero, aún con el intervalo entre pulsos de 55 mseg. (prueba "t" de Students = 7.986, g.l. = 10 y  $p < 0.0001$ ; ver Figura 3.11). En cambio, con la administración de la HEPB o butiramida a la dosis de  $60 \text{ mgkg}^{-1}$ , se encontró que tenía una menor potencia en la depresión por pulsos pares. En la figura 3.12 se muestra la evolución temporal de los efectos del HEPB o butiramida a la dosis de  $60 \text{ mgkg}^{-1}$  sobre la depresión neuronal por aplicación de pulsos pares cuando el intervalo entre el pulso condicionante (C) y el pulso prueba (T) es de 25 mseg. El efecto máximo se observó tardíamente a los 90 minutos después de la administración de HEPB y no se correlacionó con cambios en la actividad unitaria o extracelular de las células granulares en el giro dentado (Figura 3.12). Finalmente, en estos mismos animales se procedió a evaluar también el IMI con la prueba de pulsos pares variando el intervalo

entre pulsos (Figura 3.13). Se encontró una menor potencia en la depresión por pulsos pares (Figura 3.13), y además se encontró un índice de máxima inhibición mayor a 1 en el intervalo entre pulsos de 45 mseg. (ver Figura 3.13).



Figura 3.14 Fotomicrografía del hipocampo. Nótese la marca dejada por la micropipeta de registro (solución de azul de pontamina 2.5% en KCl 2 M; corriente de eyección de 10  $\mu$ A durante 20 minutos) en la población de las células granulares del giro dentado del hipocampo ipsilateral a la corteza entorrinal estimulada. Tinción de Nissl-tionina.

#### 4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En este estudio se observó que el HEPP tiene un efecto anticonvulsivo en el modelo experimental de epilepsia aquí utilizado. Los inconvenientes metodológicos del paradigma habitual (estimulo diario), nos hicieron pensar en que este modelo no nos permitiría una adecuada evaluación farmacológica, debido a que la preparación animal con electrodos implantados a permanencia se deteriora con el tiempo, y por lo tanto no se obtienen buenos registros de las variables electrofisiológicas. Es importante recalcar que en un estudio previo se prefirió la estimulación diaria de la amígdala, debido a que era el modelo que permitía observar la progresión de las crisis convulsivas generalizadas en una forma rápida (15-18 días) y en estas condiciones se establecieron los efectos preventivos de la butiramida. Sin embargo, nosotros utilizamos un método para establecer en una forma más rápida y eficiente el kindling; la estimulación de la corteza entorrinal y el giro dentado del hipocampo de la rata (28-32 horas). En el trabajo previo del Dr Solis et al<sup>116</sup> (1979) se evaluaron la potencia anticonvulsiva de la butiramida en un grupo de gatos sometidos a la estimulación diaria tipo kindling de la amígdala del lóbulo temporal. Es interesante hacer notar que el kindling del hipocampo en la rata, puede provocar no solamente las crisis motoras focales, sino también se asocia comunmente a pérdida de la memoria (Lopes da Silva<sup>125</sup>, 1987), lo cual puede estar relacionado a la observación clínica que los pacientes epilépticos

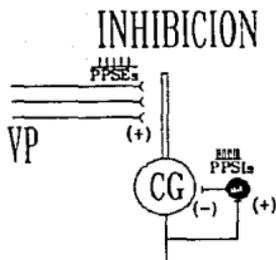
con focos límbicos, suelen tener pérdida de la memoria verbal (Wieser et al<sup>126</sup>, 1985).

Finalmente se prefirió la estimulación de la corteza entorrinal (cada hora) para evaluar los efectos anticonvulsivantes del HEPP ya que nos pareció el más eficiente para evaluar fármacos antiepilépticos con acción específica sobre las crisis parciales complejas y crisis parciales secundariamente generalizadas. A diferencia de otros autores que prefieren la estimulación de la neocorteza, lo cual ofrece la posibilidad de evaluar fármacos eficaces sólo contra las crisis parciales simples. De tal modo que la estimulación subumbral iterativa en forma aguda (cada hora) progresivamente provocó crisis convulsivas generalizadas (estado 5) en todas las ratas. Al mismo tiempo se hicieron constantes los cambios electroencefalográficos (postdescarga), hasta obtener un cambio permanente en la excitabilidad neuronal, al cual le denominamos "kindling establecido". En estas condiciones, el HEPP mostró un franco efecto protector ya que disminuyó la manifestación de las crisis convulsivas generalizadas tanto del estado convulsivo como en la duración de la postdescarga. De esta manera, el kindling establecido en la corteza entorrinal nos sirvió para evaluar la actividad antiepiléptica en un estado epiléptico crónico y estable. En cuanto a las posibilidades de este modelo experimental específico de dicho tipo de epilepsia, nos sirvió adicionalmente para darnos información acerca de la patofisiología de la epilepsia. Además nos fue posible evaluar los cambios observados en la inhibición recurrente y estudiada a través del

procedimiento de los pulsos pares. Pensamos que el HEPP puede estar aumentando la inhibición recurrente ya que este fenómeno es modulado importantemente por el sistema local de interneuronas (posiblemente GABAérgicas); que como se sabe, son las primeras que se destruyen en el tejido cerebral sometido a la estimulación eléctrica iterativa para producir la epilepsia en monos y ratas (Johnston<sup>110</sup> ,1978; Noebels y Prince<sup>127</sup> ,1977 y Sloviter<sup>128</sup> ,1983 y <sup>129</sup> ,1987).

Además, otros autores han mostrado que en condiciones "in vitro", la estimulación tetanizante en rebanadas de hipocampo que incluyen al giro dentado son capaces de generar actividad paroxística; trenes de espigas de gran amplitud en forma muy semejante a la postdescarga encontrada en el animal integro (Slater et al<sup>130</sup> .,1985). La amplitud de estas "espigas epilépticas" se sabe que depende del número de células granulosas que se activan, y que por lo general, al estimular con intensidad umbral la corteza entorrinal por vía del patrón perforante , se activa toda la capa molecular intrapiramidal de las células granulosas. Finalmente, con base en los resultados obtenidos en nuestros estudios y después de examinar los cambios en los potenciales de campo extracelulares provocados en el giro dentado, nos es posible tentativamente explicar la fisiología básica de dichas respuestas. En condiciones normales, un estímulo de intensidad umbral provoca potenciales postsinápticos excitadores (PPSEs) a nivel de las sinapsis formadas por los axones de la corteza entorrinal y las dendritas apicales de las células granulares. Este estímulo puede ser suficiente para

provocar la descarga celular y por lo tanto, activar las interneuronas inhibitorias que son excitadas por las colaterales de los axones de las células granulares, y pueden entonces estar más activas (Andersen et al<sup>131</sup>, 1978; Figura 4.01). Además, se sabe que en este tiempo es cuando los



potenciales postsinápticos inhibitorios tempranos (PPSIs) pueden ser registrados (Knowles y Schwartzkroin<sup>132</sup>, 1984). Por lo tanto, cuando la intensidad del primer estímulo es suficiente para provocar descargas celulares, la vía recurrente inhibitoria puede ser activada y entonces los potenciales postsinápticos inhibitorios pueden ocurrir (Figura 4.01). Si el segundo estímulo es dado durante estos PPSIs, el potencial de campo resultante puede ser de menor amplitud. Por lo que el segundo estímulo provoca potenciales de campo extracelulares de menor amplitud, probablemente debido a la liberación del neurotransmisor inhibitorio que en este caso bien pudiera ser el GABA (Creager et al<sup>133</sup>, 1980). En esta interpretación, no consideramos la posibilidad de que el estímulo también provoca inhibición anterógrada (Buzsáki<sup>134</sup>, 1984), ya que este es un componente inhibitorio que sólo contribuye a la respuesta inicial. Sin embargo, no podemos excluir que otros tipos de hiperpolarización causados por cambios intrínsecos en la

permeabilidad de membrana puedan contribuir al componente tardío del potencial provocado. En un estudio bioquímico preliminar, el grupo de la Dra. Martínez de Muñoz examinó en forma amplia la capacidad del HEPB y sus homólogos para desplazar al GABA de sus receptores y el de otros neurotransmisores para hacer un cernimiento sobre el probable mecanismo de acción de estos antiepilépticos. De esta manera utilizando ligandos radiactivos específicos, encontraron que el HEPB inhibe en forma dependiente de la dosis, la formación del complejo ligando-receptor de benzodiazepinas, y la HEPP modifica el polireceptor GABA<sub>A</sub> en condiciones "in vitro". Además, estos fármacos no modificaron el de otras sustancias neuroactivas tales como la noradrenalina (NA), la serotonina (5-HT), y el de péptidos opioides (Chávez y Martínez de Muñoz<sup>135</sup>, 1990).

Ahora bien, desde el punto de vista electrofisiológico se describen dos tipos de inhibición GABAérgica en las células granulares del hipocampo: dado que el GABA aplicado en el soma inhibe generalmente el disparo de la célula completa y el GABA aplicado en las dendritas disminuye selectivamente la activación de las sinapsis

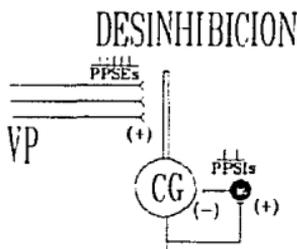


Figura 4.02 Modelo de funcionamiento de la sinapsis después del Kindling (Desinhibición neuronal).

locales. Entonces ambos tipos de inhibición GABAérgica se asocian con el consecuente aumento de la conductancia al ión cloro. En

consecuencia la reducción de ambos tipos de inhibición GABAérgica podrían ser factores importantes para la generación de la actividad epiléptica (Figura 4.02).

## 5. REFERENCIAS.

1. Hipócrates. Medical works of Hippocrates. Traduction of J. Chadwick y W.N. Mann. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1950, p. 301.
2. Galeno de Pérgamo. (Arton G.) University of Kansas Press, Lawrence, Kansas, 1954, p. 112.
3. Badiano, Juan y Martín de la Cruz. Badianus manuscript, Emily Walcott Emmart. John Hopkins Press, Baltimore, 1940, p. 341.
4. Jackson, J. H. Epilepsy & epileptiform convulsions. Vol I. James Taylor (Eds) Hodder and Stroughton, Londres, p. 500
5. Berger, H. "Über das Electrenkephalogramm des Meschen" Arch. Psychiat. 100: 301-320, 1933.
6. Gastaut, H. Diccionario de Epilepsia. Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, 1973.
7. The Commission on classification and Terminology of the International League Against Epilepsy: "Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures" Epilepsia 22: 480-501, 1981.
8. Commission on classification and Terminology of the International League Against Epilepsy: "Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures: Classification of epilepsies and epileptic syndromes". Epilepsia 30: 389-398, 1989.
9. Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Woodbury, D. M. y Porter, R. J. New wave of research in the epilepsies. En: Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Woodbury, D. M. y Porter, R. J. (Eds) "Basic Mechanisms of the Epilepsies: Molecular and Cellular Approaches." Advances in Neurology. Vol 44 Raven Press, New York, 1986. pp 3-43.
10. Nelson, K. B. y Ellenberg, J. H. Pediatric aspects of epilepsy. Epilepsia 28, Supl. 1, S1-S109, 1987.
11. Shorvon, S. D. Epilepsy octet: Epidemiology, classification, natural history and genetics of epilepsy. Lancet 336: 93-96, 1990.
12. Rubio-Donnadieu, F. Generalidades y clasificación de la epilepsia. En: Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., y Rubio-Donnadieu, F. (Eds). Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario. Trillas, México, 1986 pp. 19-27.

13. Rubio-Donnadieu, F., García-Pedroza, F. y Velasco-Fernández, R. Prevalencia de epilepsia en escolares en México. Arch. I.N.N.N. 5(1): 32, 1990.
14. Bancaud, J., Henrikson, O., Rubio-Donnadieu, F., Seino, M., Dreifuss, F.E. y Penry, J.K. Proposal for revised seizure classification. Epilepsia 22: 493-495, 1981.
15. Dreifuss, F.E., Martínez-Lage, M., Roger, J., Seino, M., Wolf, P. y Dam, M., Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 26: 268-278, 1985.
16. Doose, H. E. Völzke and Scheffer D. Arch. Psychiat. Uzd ges Neurol. 207: 394-397, 1965.
17. Shorvon, S. D. y Reynolds, E. H. Early prognosis of epilepsy Br. Med J. 285: 1699-1701, 1982.
18. Bouchet, C., y Cazauviehli, B. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'alienation mentale Arch. Gen. Méd. 9: 510-542, 1825.
19. Meynert, T. Der Bau der Grosshirnrinde und seine örtlichen Verschiedenheiten nebst einem pathologisch-anatomischen corollarium. Vierteljahrsscher. Psychiatr. 3: 381-402, 1868.
20. Sommer, W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches moment der epilepsie Arch. Psychiat. Nervenkr. 10: 631-675, 1880.
21. Spielmeier, W. Die pathogenese des epileptischen krampfes Z. Dt. Gesellsch. Neurol. Psychiatr. 109: 501-520, 1927.
22. Scholz W. Über die entstehung des hirnbefundes bei der epilepsie Z. ques. Neurol. Psychiatr. 145: 471-515, 1933.
23. Haymaker, W. A., Pentschew, A., Margoles, C., y Bingham, W. G. Occurrence of lesions in the temporal lobe in the absence of convulsive seizures. En: Baldwin, M. y Bailey P. Temporal Lobe Epilepsy Charles C Thomas Springfield, Illinois, 1958, pp. 166-202.
24. Gibbs, E. L., Gibbs, F. A. y Fuster, B. Psychomotor epilepsy. Arch. Neurol Psychiatry 60: 331-339, 1948.
25. Margerison, J. H. y Corsellis, J. A. N. Epilepsy and temporal lobes: A clinical electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy with particular reference to the temporal lobes Brain 89 (2): 499-530, 1966.
26. Dam Mouritzen, A. Neuropathology of hippocampus in epilepsy. En: Wolf, P., Dam M., Janz, D. y Dreifuss F. E. (Eds.) "Advances in Epileptology" Vol. 16. Raven Press, New York, 1987, pp. 9-14.

27. Babb, T. L.; Brown, W. J.; Pretorius, J.; Davenport, C.; Lieb, J. P. y Crandall, P. H. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25: 729-740, 1984.
28. Escobar, A. Nuevos conceptos sobre la significación del sistema límbico. *Bol. Est. Med. Biol.* 34: 25-39, 1986.
29. Waalas, I. The hippocampus. En: Emson, P.C. (Eds). *Chemical Neuroanatomy*. Raven Press, New York, 1983, pp. 337-358.
30. Schaffer, K. Beitrag Aum Histologie der Ammons Horn Formation. *Arch Mikroskop. Anat.* 39: 611-632, 1892.
31. Andersen, P., Bland, B. H. y Pujar, J. D. Organization of the hippocampal output. *Brain Res.* 17: 152-168, 1973.
32. Hjört-Simonsen, A. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: An experimental analysis. *J. Comp. Neurol.* 147: 145-162, 1973.
33. Swanson, L. W. y Cowan, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172: 49-84, 1977.
34. Meibach, R. C. y Siegel, A. Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* 124: 197-224, 1977.
35. Lorente de Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neur.* 46: 113-177, 1934.
36. Ramón y Cajal, S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol. II Instituto Ramón y Cajal, Madrid, 1955.
37. Gaarskjaer, F. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi II. Experimental analysis of fiber distribution impregnation methods. *J. Comp. Neurol.* 178: 73-88, 1978.
38. Golgi, C. Sulla fina Anatomia degli Organi Centrali del Sistema Nervoso. U. Hoepli, Milano, 1886.
39. Green, E. J. y Juraska, J. M. The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: A quantitative Golgi study. *Exp. Brain Res.* 59: 582-586, 1985.
40. Andersen, P., Holmquist, B. y Vorhoeve, P. E. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.* 66: 448-460, 1966.

41. Blackstad, T. W. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. An experimental study in the rat. Acta Anat. (Basel) 35: 202-214, 1958.
42. Hjörth-Simonsen, A. Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. J. Comp. Neurol. 146: 219-232, 1972.
43. Hjörth-Simonsen, A. y Jeune, B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. J. Comp. Neurol. 144: 215-232, 1972.
44. Blackstad, T. W., Brink, K., Henn, J. y Jeune, B. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat: An experimental study with silver impregnation methods. J. Comp. Neurol. 130: 433-450, 1970.
45. Gotlieb, D.I. y Cowan, W. M. Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connections of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The commissural connection. J. Comp. Neurol. 149: 393-422, 1973.
46. Hjörth-Simonsen, A. y Laurberg, S. Commissural connections of the dentate area in the rat. J. Comp. Neurol. 174: 591-606, 1977.
47. Laurberg, S. Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. J. Comp. Neurol. 184: 685-708, 1979.
48. Swanson, L. W., Wyss, J. M. y Cowan, W. M. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. J. Comp. Neurol. 181: 681-716, 1978.
49. Zimmer, J. Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata. Demonstration in decommisurated rats by silver impregnation. J. Comp. Neurol. 142: 393-416, 1971.
50. Blackstad, T. W. y Kjaerheim, A. Special axodendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. J. Comp. Neurol. 117: 133-160, 1961.
51. Andersen, P., Blackstad, T. W. y Lomo, T. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. Exp. Brain Res. 1: 236-248, 1966.
52. Blackstad, T. W. Commissural connection of the hippocampal region in the rat with special reference to their mode of termination. J. Comp. Neurol. 105: 417-537, 1956.
53. Domesick, V. B. Projections from the cingulate cortex in the rat. Brain Res. 12: 296-320, 1969.

54. Herkenham, M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. J. Comp. Neurol. 177: 589-610, 1978.
55. Wyss, J. M., Swanson, L. W. y Cowan, W. M. To the hippocampal formation in the rat. Neurosci. 4: 463-476, 1979.
56. Pasquier, D. A. y Reinoso-Suárez, F. Direct projections from hypothalamus to hippocampus in the rat demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. Brain Res. 108: 165-169, 1976.
57. Azmitia, E. C. y Segal, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. 179: 641-668, 1978.
58. Segal, M. Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. Brain Res. 94: 115-131, 1975.
59. Segal, M. y Landis, S. Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. Brain Res. 78: 1-15, 1974.
60. Poletti, C.E., Kliot, M. y Boytin, G. Metabolic influences of the hippocampus on hypothalamus, preoptic and basal forebrain is exerted through amygdalofugal pathways. Neurosci. Lett. 45: 211-216, 1984.
61. Störm-Mathisen, J. Localization of putative neurotransmitters in the hippocampal formation. En: "Functions of the Septo-hippocampal system". (Ciba Foundation Series; Vol 58) Amsterdam, Elsevier, 1978, pp. 49-86
62. Collingridge G.L. The hippocampus (Review)  
Curr. Opinion Neurol. Neurosurg. 2(4): 495-498, 1989.
63. Ribak, C. E. y Seress, L. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: A combined Golgi and electron microscopic study. J. Neurocytol. 12: 577-597, 1983.
64. Walther, H., Lambert, J.D.C., Jones, R. S. G., Heinemann, U. y Hamon, B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with a low magnesium medium. Neurosci. Lett. 69: 156-161, 1986.
65. Wilson, R. C., Levy, W.B. y Steward, O. Functional effects of lesion-induced plasticity: Long-term potentiation in normal and lesion-induced temporo-dentate connections. Brain Res. 176: 65-78, 1979.

66. McNaughton, B.L. y Miller, J.J. Medial septal projections to the dentate gyrus of the rat: Electrophysiological analysis of distribution and plasticity. Exp. Brain Res. 56: 243-256, 1984.
67. Bliss, T. V. P. y Lomo, T. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentata area of the anaestitized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. (London) 232; 331-356, 1973.
68. Douglas, R. M. y Goddard, G. V. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. Brain Res. 86; 205-215, 1975.
69. Schwartzkroin, P. y Wester, K. Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. Brain Res. 89: 107-119, 1975.
70. Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O. y Wigström, H. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. Nature 266: 736-737, 1977.
71. Lynch, G., Dunwiddie, T. y Gribkoff, V. Heterosynaptic depression: A postsynaptic correlate of long-term potentiation. Nature 266: 737-739, 1977.
72. Lovinger, D. y Routtenberg, A. Synapse-specific protein kinase C activation enhances maintenance of long-term potentiation in rat hippocampus. J. Physiol. 400: 321-335, 1988.
73. McNaughton, B.L., Douglas, R.M. y Goddard, G.V. Synaptic enhancement in fascia dentata: Cooperativity among coactive afferents. Brain Res. 157: 277-293, 1978.
74. Levy, W. B. y Steward, O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. Brain Res. 175: 233-245, 1979.
75. Lynch, M.A. Biochemical correlates of long-term potentiation in the hippocampus -New Vistas. Alan R. Liss. New York, 1989 pp. 363-378.
76. Racine, R.J., Milgram, N.W., y Hafner, S. Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. Brain Res. 260: 217-231, 1983.
77. Winson, J. y Abzug, C. Neuronal transmission through hippocampal pathways dependent on behavior. J. Neurophysiol. 41: 716-732, 1978.

78. Tuff, L.P., Racine, R.J. y Adamec R. The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. Paired-pulse depression. Brain Res. 277: 79-90, 1983.
79. Stasheff, S. F., Bragdon, A. C. y Wilson, W. A. Induction of epileptiform activity in hippocampal slices by trains of electrical stimuli. Brain Res. 344: 296-302, 1985.
80. Anderson, W. W., Swartzwelder, H. S. y Wilson, W. A. The NMDA receptor antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate blocks stimulus train-induced epileptogenesis but not epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. J. Neurophysiol. 57 (1); 1-21, 1987.
81. McNamara, J.O., Bryne, M.C., Dasheiff, R.M. y Fitz J.G. The kindling model of epilepsy: a review. Prog. Neurobiol. 15: 139-159, 1980.
82. Racine, R. Kindling: the first decade. Neurosurgery 3: 234-252, 1978.
83. Goddard, G. V., McIntyre, P. C. y Leech, D. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Expl. Neurol. 25; 295-330, 1969.
84. Wada, J. A., Mizoguchi, T. y Osawa, T. Secondarily generalized convulsive seizures induced by daily amygdaloid stimulation in rhesus monkeys. Neurology 28: 1026- 1036, 1978.
85. Goldensohn, E. S. The relevance of secondary epileptogenesis to the treatment of epilepsy: kindling and mirror focus. Epilepsia 25 (Supl.2): 156-168, 1984.
86. Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizure. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 32: 281-294, 1972.
87. Le Gal La Salle, G. Inhibition of kindling-induced generalized seizures by aminooxyacetic acid. Can. J. Physiol. Pharmacol. 58; 7-11, 1980.
88. Tanaka, T. Progressive changes of behavioral and electroencephalographic responses to daily amygdaloid stimulation in rabbits. Fukuoka Acta Med. 63: 152-163, 1972.

89. Wada J. A., Sato M. y Corcoran, M. E. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia* 15: 465-478, 1974.
90. Fitz, J. G. y McNamara, J. O. Spontaneous interictal spiking in the awake kindled rat. *Electroencephalography Clin. Neurophysiol.* 47: 592-596, 1979.
91. Leung, L. S. Hippocampal interictal spikes induced by kindling: Relations to behavior and EEG. *Behavioural Brain Res.* 31: 75-84, 1988.
92. Pinel, J. P. J. y Rovner, L. I. Electrode placement and kindling-induced experimental epilepsy. *Exp. Neurol.* 58: 335-346, 1978.
93. Krnjević, K. Loss of synaptic inhibition as a cause of hippocampal seizures. En: Klee, M.R. (Ed.) "Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena". Raven Press, New York, 1982. pp. 123-130.
94. Heinemann, U., Konnerth, A., Lourel, J., Lux, D.H. y Pumain, R. Changes in extracellular free Ca<sup>2+</sup> in normal and epileptic sensorimotor cortex of cats. En: Klee M.R., Lux D. H. y Spekmann, J.E. (Eds.). "Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena". Raven Press. New York, 1982, pp. 29-35.
95. Mc Carren, M. y Alger, B. E. Use dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro *J. Neurophysiol.* 53: 557-571, 1985.
96. Ben-Ari, Y., Krnjević, K. y Reinhardt, W. Hippocampal seizures and failure of inhibition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 1462-1466, 1979.
97. Finch, D. M. y Babb, T. L. Response decrement in a hippocampal basket cell. *Brain Res.* 130: 354-359, 1977.
98. Miles, R. y Wong, R. K. S. Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J. Physiol.* (London) 388: 611- 629, 1987.
99. Steltzer, A., Slater, N. T. y Ten Bruggencate, G. Activation of NMDA-receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. *Nature*(London) 326: 701- 704, 1987.

100. Sömjen, G. G., Aitken, P.G., Giacchino, J. L. y McNamara, J. O. Interstitial Ion Concentrations and paroxysmal discharges in hippocampal formation and spinal cord. En: Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Woodbury, D. M. y Porter, R. J. (Eds) *Advances in Neurology*. Vol 44, Raven Press, New York, 1986 pp.663-680.
101. Kapur, J. y Lothman W.E. Loss of inhibition precedes delayed spontaneous seizures in the hippocampus after tetanic electrical stimulation. *J. Neurophysiol.* 61 (2): 427-434, 1989.
102. Kravitz, E. A., Iversen, I. L., Otsuka, M. y Hall, Z. W. Gamma-aminobutyric acid in the lobster nervous system: Release from inhibitory nerves and uptake into nerve-muscle preparations. En: Von Euler C., Skoglund, S. y Soderberg, U.(eds) "Structure and Function of Inhibitory Neuronal Mechanisms". New York, Pergamon Press, 1966, pp. 371-376.
103. Otsuka, M. Gamma-aminobutyric acid and some other transmitter candidates in the nervous system. *Proc. Int. Cong. Pharmacol.* 4, 186, 1973.
104. Kelly, J. S. y Beart, P.M. Amino acid receptors in CNS. II. GABA in supraspinal regions. En: Iversen L. L., Iversen, S. D. y Snyder, S. H. (eds); "Handbook of Psychopharmacology" Vol 4, New York, Plenum Press, 1975, pp. 129-209.
105. Hill, D. R. y Bowery, N. G. 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>A</sub> sites in rat brain. *Nature (London)* 290: 119-152, 1981.
106. Iversen, L. I. Biochemical psychopharmacology of GABA. En: Lipton, M. A., DiMascio, A. y Killam, K. F.(eds) "Psychopharmacology: A generation of progress". New York, Raven Press, 1978, pp. 25-38.
107. Olsen, R. W. Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 245-277, 1982.
108. Stevens, C. F. Channel families in the brain. *Nature (London)* 328: 198-199, 1987.
109. MacDonald, R. L. y McLean, M. J. Cellular basis of barbiturate and phenitoin anticonvulsants drug action. *Epilepsia.* 23: S7-S18, 1982.
110. Johnston, G. A. R. Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol.* 18: 269-289, 1978.

111. Carvajal, G., Russek, M., Tapia, R. y Massieu, G. Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of gamma-aminobutyric acid-alfa-ketoglutaric acid transaminase. Biochem. Pharmacol. 13: 1059-1069, 1964.
112. Tapia, R., Drucker-Colin, R., Meza-Ruiz, G., Durán, L. y Levi, G. Neurophysiological and neurochemical studies on the action of the anticonvulsant gamma-hydroxi, gamma-ethyl, gamma-phenylbutyramide. Epilepsia 20: 135-145, 1979.
113. Meza-Toledo, S. E., Zenteno-García, M. T., Juárez-Carvajal, E., Martínez de Muñoz, D. y Carvajal-Sandoval, G. A. A new homologous series of anticonvulsant: Phenyl alcohol amides. Synthesis and pharmacological evaluation. Arzneim. Forsch. Drug. Res. 40 (12): 1289-1291, 1990.
114. Martínez de Muñoz, D. Simposio: "Fármacos antiepilépticos sintetizados en México. Estudios de Seguridad y Eficacia" Colima, Col. 1990. En prensa.
115. Martínez de Muñoz D. Cernimiento de anticonvulsivos. En: Brailowsky S. y Otero-Siliceo E. Epilepsia Experimental. Series de Neurología No. 2, SMCF y Academia Mexicana de Neurología, México, D.F. 1991 pp.257-266.
116. Solís, H., Jurado, J.L. y Fernández-Guardiola, A. La acción de la butiramida sobre el desarrollo del "kindling" y el "kindling" amigdalinó va establecido en el gato. En: Velasco-Suárez, M. y Escobedo-Ríos, F. eds. Neurobiología (Symposium Internacional). I.N.N.N. México, Ed. Progreso, 1979 pp. 83-94.
117. Wada, J. A. Pharmacological prophylaxis in the kindling model of epilepsy. Arch. Neurol. 34 : 389-395, 1977.
118. McNamara, J.O., Bonhaus, D.W., Shin, C., Crain, B.J., Gellman, R.L. y Giacchino, J.L. The kindling model of epilepsy: critical review. CRC Crit. Rev. Neurobiol. 1: 341-392, 1985.
119. Paxinos, G. y Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press Australia, Sydney, 1982.
120. Solís, H. Modelos experimentales de epilepsia: Estudio microiontoforético en un modelo de epilepsia experimental. Tesis Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM, 1988.
121. Solís, H., Danglada, O. y Schneider S. Diseño y construcción de un sistema para ser usado en estudios de microiontoforesis. Bol. Est. Med. Biol. Méx. 33: 47-55, 1984/1985

122. Andersen, P., Bliss, T. V. P. y Skrede, K. K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. Exp. Brain Res. 13: 222-238, 1971.
123. Lomo, T. Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: The perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. Exp. Brain Res. 12: 18-45, 1971.
124. Hamilton L. C. Modern Data Analysis : A First course in Applied Statistics. Brooks/Cole Pub. Co., Pacific Grove, California. p171
125. Lopes da Silva, F. H. Hippocampal kindling: physiological evidence for progressive disinhibition. En: Wolf, P., Dam, M., Janz, D. and Dreifuss, F. E. "Advances in Epileptology" Vol. 16 Raven Press, New York, 1987, pp. 57-62.
126. Wieser, H. G., Hailemariam, S., Regard, M. y Landis, T. Unilateral limbic epileptic status activity: stereo-EEG, behavioural and cognitive data Epilepsia 26: 19-29, 1985.
127. Noebels, J.L. y Prince, D.A. Presynaptic origin of penicillin afterdischarges at mammalian nerve terminals. Brain Res. 138: 59-74, 1977.
128. Sloviter, R.S. "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiology and light microscopic study. Brain Res. Bull. 10: 675-697, 1983.
129. Sloviter, R.S. Decreased hippocampal inhibition and selective loss of interneurons in experimental epilepsy. Science 235: 73-76, 1987.
130. Slater, N.T., Stelzer, A. y Galvan, M. Kindling-like stimulus patterns induce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus. Neurosci. Lett. 60: 25-31, 1985.
131. Andersen, P., Bie, B., Ganes, T. y Mosfeldt Laursen, A. Two mechanisms for effects of GABA on hippocampal pyramidal cells. En: Ryall, R.W. y Kelly, I. S. (Eds.) "Iontophoresis and transmitter mechanisms in the Mammalian Central Nervous System". Elsevier/ North-Holland, 1978, pp. 179-184.
132. Knowles, W. D. y Schwartzkroin, P. A. Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. J. Neurosci. 1: 318-322, 1984.

133. Creager, R., Dunwiddie, T., y Lynch, G. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. J. Physiol. 299: 409-424, 1980.

134. Buzsáki, G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. Prog. Neurobiol. 22: 131-153, 1984.

135. Chávez, J. L. y Martínez de Muñoz, D. Efecto de HEPP sobre varios receptores en membranas de corteza cerebral de rata. Simposio: "Fármacos antiepilépticos sintetizados en México. Estudios de Seguridad y Eficacia" Colima, Col. 1990.