



03086 12
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA
Campus UNAM-UAQ

PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO (ON) COMO MENSAJERO NEURONAL
EN EL MODELO DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL
KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias Fisiológicas

Presenta
M. en C. Rosalva Esther Talavera Cuevas

Asesor
Doctor Miguel Condés y Lara

Juriquilla Queretaro, Qro. 1997

**TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA**



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 esta 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.

Esta tesis de doctorado fue realizada en los Departamentos de Neurofisiología, y en el Laboratorio de Histología de la División de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría y en el Centro de Neurobiología de la UNAM, con la dirección del Doctor Miguel Condés y Lara.

Para llevar a cabo parte del trabajo experimental se estableció un proyecto en colaboración con el Laboratorio de Análisis de Imágenes del Centro de Instrumentos de la UNAM a cargo del Dr. Gabriel Corkidi.

Esta tesis fue parcialmente apoyada por los proyectos: 0660P-M9506 y 400335-5-5-3458PM de CONACYT, 030348 de la UACP y P, IN202196DGAPA y por la beca de CONACYT 89246.

A Arturo mi compañero, mi esposo

A mis hijos Alejandro y Emilio

**A Esperanza quien desde siempre
me ha brindado su apoyo, cariño y
confianza**

A la memoria de mi Padre

A mi madre y a mis hermanos Cristina y Oscar

De manera especial a mi hermano Francisco

A mis familiares en especial a ti Queta

Y va por ti Manolo

RESUMEN DE LA TESIS: PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO (ON) COMO MENSAJERO NEURONAL EN EL MODELO DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO.

El óxido nítrico (ON) es una molécula que se ha descrito como mensajera en el sistema nervioso central y está relacionada con procesos de plasticidad sináptica, flujo sanguíneo cerebral, neuroprotección, así como con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la Corea de Huntington y la Epilepsia.

Existen evidencias de que el ON está involucrado en los procesos epilépticos y se ha estudiado su participación, tanto en la inhibición como en la activación de las crisis en diferentes modelos experimentales de epilepsia. Sin embargo, no se conoce como actúa esta molécula en las crisis ni tampoco se ha determinado si su vía biosintética está alterada como un mecanismo regulatorio de su síntesis en los procesos epilépticos.

Los estudios realizados en esta tesis doctoral estuvieron encaminados a conocer si la vía de síntesis del ON se modifica en las crisis epilépticas. Para lo cual utilizamos el modelo de epilepsia experimental *kindling* que se induce por estimulaciones eléctricas repetidas de baja intensidad en la amígdala del lóbulo temporal en la rata. Dichas estimulaciones culminan con la aparición de crisis convulsivas generalizadas. Este fenómeno una vez establecido es permanente. Por su evolución progresiva y gradual el *kindling* permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos, histológicos y bioquímicos concomitantes al proceso de propagación y generalización de la actividad epiléptica.

La enzima que sintetiza al ON es la sintetasa del óxido nítrico (SON). Esta regula la producción del ON en diferentes procesos fisiológicos entre los que está la epilepsia. De esta forma, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el número de neuronas que contienen esta enzima por el método histoquímico de la NADPH-diaforasa y analizar su presencia en el caudo putamen, la amígdala y el hipocampo de la rata en grupos control, implantado no estimulado y *kindling*. El conteo de las neuronas se llevó a cabo mediante análisis de imágenes.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en las tres estructuras existen células con diferente morfología, tamaño y grado de tinción. Por la intensidad de la tinción las neuronas fueron agrupadas en claras y oscuras y de acuerdo con esta clasificación encontramos un patrón de distribución característico para cada estructura estudiada. También determinamos que el número de células claras se incrementa significativamente

en las ratas sometidas al procedimiento del *kindling*, a diferencia de las células oscuras las cuales no se modifican. Estos resultados muestran que en el *kindling* eléctrico amigdalino aumenta la cantidad de enzima detectable por el método histoquímico.

Con el objetivo de determinar si se producen cambios en la vía de síntesis del ON cuantificamos a su precursor, la arginina; a su coproducto de reacción, la citrulina (1:1) y al ácido glutámico, que es un activador de esta ruta biosintética. Las estructuras analizadas fueron las mismas que para el estudio histológico, pero adicionamos el cerebelo como una estructura control. Las determinaciones se llevaron a cabo en grupos de ratas: control, implantadas no estimuladas y *kindling* (10 crisis convulsivas generalizadas). La cuantificación fue realizada por el método de cromatografía líquida de alta presión. En el estriado y en el cerebelo no se encontró modificación alguna. En la amígdala cerebral se encontró un incremento estadísticamente significativo en la concentración de arginina, citrulina y ácido glutámico al comparar el grupo control y el implantado no estimulado con el grupo *kindling*. En el hipocampo se encontraron incrementos en las concentraciones de arginina y glutámico. La citrulina no mostró variaciones.

Con base en estas evidencias podemos decir que el óxido nítrico puede estar involucrado en el *kindling*, principalmente en la amígdala, a diferencia del hipocampo y del estriado donde la regulación de su síntesis podría ser diferente ya que hay un incremento en la cantidad de células que muestran concentraciones detectables de SON, pero no se produce ningún cambio en la concentración de citrulina. Esta falta de correlación de mayor densidad de células en las que se detecta a la SON sin cambios en la concentración de citrulina puede deberse a cambios en la actividad de la enzima lo cual ha sido sugerido en algunos trabajos donde se reporta que la actividad de la SON es menor en animales epilépticos.

Por lo que es necesario realizar otros estudios que permitan determinar si la expresión y la actividad de la SON cambian en el *kindling*, ya que se ha sugerido que debido a que el ON tiene un tiempo de vida corto y no es almacenado para ser liberado como sucede con los neurotransmisores clásicos, la SON juega un papel importante en la regulación de su síntesis.

PARTICIPATION OF NITRIC OXIDE AS A NEURONAL MESSENGER IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY, AMYGDALOID ELECTRIC KINDLING.

Nitric oxide is a molecule that has been described as a messenger in the SNC, and has been related to processes such as synaptic plasticity, cerebral blood flux, neuroprotection, as well as to degenerative disorders including Huntington's Chorea and epilepsy.

The studies carried out in this doctoral thesis were undertaken to know if NO synthesis is modified during epileptic seizures. We chose an experimental model of epilepsy, kindling, which was induced by repetitive, low intensity, electric stimulations in the amygdala of the temporal lobe of rats. Such stimulation ended with the onset of generalized convulsive seizures.

One of the objectives of this study was to determine the number of neurons that contain nitric oxide synthase by using the NADPH-diaphorase histochemical method. We analyzed the presence of this diaphorasic neurons in the following structures: caudo-putamen, amygdala and hippocampus in the following groups: control, sham-operated and kindled rats (10 generalized convulsive seizures). The quantification of the diaphorasic neurons was obtained by digitalization and image analysis. In this respect, our results showed differences in morphology, soma size and label intensity in the diaphorasic neurons contained in the above mentioned structures. We determined that the light labelled cells were significantly increased in the kindled rats, while the dark labelled cells were not modified. This result shows that kindling increased the amount of enzyme detected by the histochemical method.

We also quantified the NO precursor, arginine, and its reaction co-product, citrulline, as well as glutamic acid, which is an activator of this biosynthetic pathway. The cerebral structures used in the histological study were analyzed, and the cerebellum was added as a control structure. The groups analyzed were control, sham-operated and kindled rats. The high pressure liquid chromatography method (HPLC) was used. Our results showed no modification in the aminoacid concentrations in striatum and cerebellum among the different groups. In amygdala, a significative increase in arginine, citrulline and glutamic acid concentrations was found when comparing control and sham-operated groups with kindled rats. In hippocampus, we found increased concentrations of arginine and glutamic acid; citrulline was not modified.

With this evidence in mind we suggest that NO may participate in the kindling process, mainly in amygdala, since we found increments in the number of NO synthesizing cells, and in arginine and citrulline concentrations. Whereas in hippocampus and striatum, the regulation of NO synthesis may be different, since we found an increase in the quantity of diaphorasic cells, but no modification in the citrulline concentration.

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Condés y Lara, por el interés, el apoyo y las diarias enseñanzas en las tareas de investigación.

A los miembros del jurado por sus sugerencias y críticas que contribuyeron al enriquecimiento de esta tesis:

Dra. Carolina Escobar Briones

Dra. Martha León Olea

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Dr. Carlos Paz Tres

Dr. Francisco Pellicer Graham

Al Dr. Gabriel Corkidi por la asesoría y apoyo en la digitalización y análisis de imágenes.

A Arturo y Raúl Cardoso por su trabajo de ilustración y fotografía.

A Marcela, Martha, Lupita, Sheyla, Eduardo y Francisco: les agradezco su ayuda, sus críticas, sus consejos, su paciencia y sobre todo, los días que disfrutamos juntos el trabajo y las celebraciones.

Agradezco a las autoridades del Instituto Mexicano de Psiquiatría Dr. Ramón de la Fuente, Dr. Augusto Fernández Guardiola y a la Psic. Ana de la Parra por las facilidades que me dieron para concluir esta tesis que comprende además el proyecto de CONACyT 0660P-M9506.

TRABAJOS PUBLICADOS Y PARTICIPACIONES EN CONGRESOS REALIZADOS DURANTE EL TRANCURSO DE ESTA TESIS DOCTORAL

PUBLICACIONES

1. Talavera-Cuevas E., Reyes-Lezama A. (1993): Oxido Nítrico: Otra forma de comunicación neuronal? **Salud Mental 16**: (3).

2. Sánchez-Alvarez M., León-Olea M., Talavera E., Pellicer F., Sánchez Islas E., Martínez-Lorenzana G. (1994): Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of snail, *Helix aspersa*. **Neuroscience Letters 169**: 51-55.

3. Talavera E., Martínez-Lorenzana G., León-Olea M., Sánchez- Alvarez M., Sánchez-Islas E., Pellicer F. (1995): Histochemical distribution of NADPH-diaphorase in the cerebral ganglion of crayfish *Cambarellus montezumae*. **Neuroscience Letters 187**: 177-180.

DIVULGACION

1. Sánchez- Alvarez M., León-Olea M., Talavera E., Pellicer F., Sánchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. (1994): Distribución de la NADPH-diaforasa en el ganglio periesofágico del caracol *Helix aspersa*. Anales del Instituto Mexicano de Psiquiatría. Reseña de la IX Reunión de Investigación.

TRABAJOS A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. Martínez-Lorenzana G., Talavera E., Sánchez-Alvarez M., Sánchez-Islas E., Sitges M., León-Olea M. and Pellicer F. (1993): Distribution of putative nitric oxide in the brain of crayfish, *Cambarellus montezumae* using NADPH-diaphorase histochemistry. 23rd Annual Meeting Society for Neuroscience. Washington. D.C., Noviembre 7-12.

2. Sánchez-Alvarez M., León Olea M., Talavera E., Pellicer F., Sánchez-Islas, E., Alvarez-Leffmans F.J. and Martínez-Lorenzana G. (1993): Distribution of putative nitric oxide producing neurons in periesophageal ganglia of *Helix aspersa* 23rd. Annual Meeting Society for Neuroscience. Washington, D.C. Noviembre 7-12.

3. Talavera E., Sánchez-Alvarez G., Martínez-Lorenzana G., Sánchez-Islas E., León-Olea M., Pellicer F. and Condés-Lara M. (1994): Identification of putative nitric oxide neurons in amygdala and hippocampus in the electrical kindled rats using NADPH-diaphorase histochemistry. 24th Annual Meeting Society for Neuroscience Noviembre 13 - 18. Miami Beach.

4. E. Talavera., G. Martínez-Lorenzana., M. León-Olea., G. Corkidi and Miguel Condés-Lara.(1996): NADPH-diaphorasic cells in the caudate putamen after electrical amygdaloid *kindling*. Nitric Oxide Conference 13 - 17 de julio. Los Angeles, California.

CONGRESOS NACIONALES

1. Martínez-Lorenzana G., Talavera E., Sanchez-Alvarez M., Sánchez-Islas E., León-Olea M. y Pellicer F.(1993): Identificación de las neuronas productoras de óxido nítrico en el ganglio cerebroide del acocil, *Cambarellus montezumae*, mediante la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Universidad Americana de Acapulco. Acapulco, Guerrero. Agosto 15-20.

2. León-Olea M., Talavera E., Sánchez-Alvarez M., Pellicer F., Sánchez-Islas E. y Martínez-Lorenzana G. (1993): Distribución de las neuronas productoras de óxido nítrico en el SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Universidad Americana de Acapulco. Acapulco, Guerrero. Agosto 15-20.

3. Talavera E., Martínez-Lorenzana G., León-Olea M., Corkidi-Blanco G., Condés-Lara M. (1995): Identificación de neuronas que sintetizan óxido nítrico en el hipocampo, amígdala y estriado en el *kindling* amigdalino, mediante la técnica histoquímica para la NADPH-diaforasa. XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas. Universidad Autónoma de Querétaro. Agosto 27-31. Querétaro, Qro.

INDICE

1. RESUMEN.....	3
1.1 ABSTRACT	5
2. INTRODUCCION.....	6
3. ANTECEDENTES	
3.1 Generalidades del óxido nítrico.....	12
3.2 Oxido nítrico y epilepsia.....	17
3.3 <i>Kindling</i> y neurotransmisores.....	20
3.4 Estrés oxidativo, ácido glutámico y óxido nítrico.....	33
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
5. HIPOTESIS.....	40
6. OBJETIVOS.....	41
7. MATERIAL Y METODOS	
7.1 Sujetos experimentales.....	42
7.2 Grupos de trabajo.....	42
7.3 Procedimiento quirúrgico.....	42
7.4 <i>Kindling</i> eléctrico amigdalino.....	43
7.5 Análisis Histoquímico.....	44
7.5.1 Reacción histoquímica de la NADPH-diaforasa.....	47
7.5.2 Determinación del número de células NADPH-d reactivas por análisis de imágenes.....	45

7.6. Cuantificación de la arginina, la citrulina y el ácido glutámico por el método de cromatografía líquida de alta presión.	
7.6.1 Disección de estructuras cerebrales.....	48
7.6.2 Cromatografía líquida de alta presión.....	50
7.6.3 Condiciones cromatográficas.....	50
7.6.4 Gradiente.....	50
7.6.5 Curva patrón.....	51
7.6.6 Reacción de derivatización.....	51
7.6.7 Análisis estadístico.....	51
8. RESULTADOS	
8.1 <i>Kindling</i> eléctrico amigdalino.....	53
8.2 Reacción Histoquímica de la NADPH-diaforasa	
- Características histológicas.....	56
8.3 Cuantificación de las células NADPH-d reactivas	
- Digitalización y análisis de imágenes.....	60
8.4 Cuantificación de arginina, citrulina y ácido glutámico por cromatografía líquida de alta presión	66
9. DISCUSION.....	73
10. CONCLUSIONES	80
11. BIBLIOGRAFIA.....	81

1. RESUMEN

El óxido nítrico (ON) es una molécula que se ha descrito como mensajera en el sistema nervioso central y está relacionada con procesos de plasticidad sináptica, flujo sanguíneo cerebral, neuroprotección, así como con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la Corea de Huntington y la Epilepsia.

Existen evidencias de que el ON está involucrado en los procesos epilépticos y se ha estudiado su participación, tanto en la inhibición como en la activación de las crisis en diferentes modelos experimentales de epilepsia. Sin embargo, no se conoce como actúa esta molécula en las crisis ni tampoco se ha determinado si su vía biosintética está alterada como un mecanismo regulatorio de su síntesis en los procesos epilépticos.

Los estudios realizados en esta tesis doctoral estuvieron encaminados a conocer si la síntesis del ON se incrementa en las crisis epilépticas. Para lo cual utilizamos el modelo de epilepsia experimental *kindling* que se induce por estimulaciones eléctricas repetidas de baja intensidad en la amígdala del lóbulo temporal en la rata. Dichas estimulaciones culminan con la aparición de crisis convulsivas generalizadas. Este fenómeno una vez establecido es permanente. Por su evolución progresiva y gradual el *kindling* permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos, histológicos y bioquímicos concomitantes al proceso de propagación y generalización de la actividad epiléptica.

La enzima que sintetiza al ON es la sintetasa del óxido nítrico (SON). Esta regula la producción del ON en diferentes procesos fisiológicos entre los que está la epilepsia. De esta forma, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el número de neuronas que contienen esta enzima por el método histoquímico de la NADPH-diaforasa y analizar su presencia en el caudo putamen, la amígdala y el hipocampo de la rata en grupos control, implantado no estimulado y *kindling*. El conteo de las neuronas se llevó a cabo mediante digitalización y análisis de imágenes.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en las tres estructuras existen células con diferente morfología, tamaño y grado de tinción. Por la intensidad de la tinción las neuronas fueron agrupadas en claras y oscuras, de acuerdo con esta clasificación encontramos un patrón de distribución característico para cada estructura estudiada. También determinamos en el hipocampo, la amígdala y el caudo putamen que el número de células claras se incrementa significativamente en las ratas sometidas al procedimiento del *kindling*, a diferencia de las células oscuras las cuales no se modifican. Estos resultados muestran que en el *kindling* eléctrico amigdalino aumenta la cantidad de enzima detectable por el método histoquímico.

Con el objetivo de determinar si se producen cambios en la concentración del ON cuantificamos a su precursor, la arginina; a su coproducto de reacción, la citrulina (1:1) y al ácido glutámico, que es un activador de esta ruta biosintética. Las estructuras analizadas fueron las mismas que para el estudio histológico, pero adicionamos el

cerebelo como una estructura control. Las determinaciones se llevaron a cabo en grupos de ratas: control, implantadas no estimuladas y *kindling* (10 crisis convulsivas generalizadas). La cuantificación fue realizada por el método de cromatografía líquida de alta presión. En el estriado y en el cerebelo no se encontró modificación alguna. En la amígdala cerebral se encontró un incremento estadísticamente significativo en la concentración de arginina, citrulina y ácido glutámico al comparar el grupo control y el implantado no estimulado con el grupo *kindling*. En el hipocampo se encontraron incrementos en las concentraciones de arginina y glutámico. La citrulina no mostró variaciones.

Con base en estas evidencias podemos decir que el óxido nítrico puede estar involucrado en el *kindling*, principalmente en la amígdala donde se produce un aumento en el número de células que sintetizan ON, así como un incremento en la concentración de arginina, citrulina y glutámico a diferencia del hipocampo y del estriado donde la regulación de su síntesis podría ser diferente ya que aumentó la cantidad de células que muestran concentraciones detectables de SON, pero no se produce ningún cambio en la concentración de citrulina. Esta falta de correlación de mayor densidad de células en las que se detecta a la SON sin cambios en la concentración de citrulina puede deberse a cambios en la actividad de la enzima lo cual ha sido sugerido en algunos trabajos donde se reporta que la actividad de la SON es menor en animales epilépticos. Por lo que es necesario realizar otros estudios que permitan determinar si la expresión y la actividad de la SON cambian en el *kindling*, ya que se ha sugerido que debido a que el ON tiene un tiempo de vida corto y no es almacenado para ser liberado como sucede con los neurotransmisores clásicos, la SON juega un papel importante en la regulación de su síntesis.

Summary

Nitric oxide is a molecule that has been described as a messenger in the SNC, and has been related to processes such as synaptic plasticity, cerebral blood flux, neuroprotection, as well as to degenerative disorders including Huntington's Chorea and epilepsy.

The studies carried out in this doctoral thesis were undertaken to know if NO synthesis is modified during epileptic seizures. We chose an experimental model of epilepsy, kindling, which was induced by repetitive, low intensity, electric stimulations in the amygdala of the temporal lobe of rats. Such stimulation ended with the onset of generalized convulsive seizures.

One of the objectives of this study was to determine the number of neurons that contain nitric oxide synthase by using the NADPH-diaphorase histochemical method. We analyzed the presence of this diaphorasic neurons in the following structures: caudoputamen, amygdala and hippocampus in the following groups: control, sham-operated and kindled rats (10 generalized convulsive seizures). The quantification of the diaphorasic neurons was obtained by digitalization and image analysis. In this respect, our results showed differences in morphology, soma size and label intensity in the diaphorasic neurons contained in the above mentioned structures. We determined that the light labelled cells were significantly increased in the kindled rats, while the dark labelled cells were not modified. This result shows that kindling increased the amount of enzyme detected by the histochemical method.

We also quantified the NO precursor, arginine, and its reaction co-product, citrulline, as well as glutamic acid, which is an activator of this biosynthetic pathway. The cerebral structures used in the histological study were analyzed, and the cerebellum was added as a control structure. The groups analyzed were control, sham-operated and kindled rats. The high pressure liquid chromatography method (HPLC) was used. Our results showed no modification in the aminoacid concentrations in striatum and cerebellum among the different groups. In amygdala, a significative increase in arginine, citrulline and glutamic acid concentrations was found when comparing control and sham-operated groups with kindled rats. In hippocampus, we found increased concentrations of arginine and glutamic acid; citrulline was not modified.

With this evidence in mind we suggest that NO may participate in the kindling process, mainly in amygdala, since we found increments in the number of NO synthesizing cells, and in arginine and citrulline concentrations. Whereas in hippocampus and striatum, the regulation of NO synthesis may be different, since we found an increase in the quantity of diaphorasic cells, but no modification in the citrulline concentration.

2. INTRODUCCION

La epilepsia es un síndrome que afecta aproximadamente al 1% de la población. No existe una enfermedad específica que se llame "epilepsia", sino que es un grupo de signos y síntomas los que conforman esta disfunción del Sistema Nervioso Central. Las epilepsias, que tal vez comparten mecanismos fisiopatológicos semejantes pero que se originan en diferentes regiones anatómicas del encéfalo pueden tener diferentes causas que están asociadas con distintas manifestaciones electroencefalográficas, conductuales y bioquímicas. En la tabla I se muestra una clasificación de las epilepsias con la finalidad de ilustrar su diversidad (Sutherland et al.1982; Shin et al. 1994).

La epilepsia es considerada como un síndrome producido por un tipo de trastorno de la función cerebral, recurrente, caracterizado por la activación sincrónica de grupos neuronales que descargan a frecuencias más altas de las que presentan durante su funcionamiento normal. Se ha propuesto que dicha activación puede ser el resultado de un aumento en la neurotransmisión excitadora o de una falla en las funciones inhibitorias (Brailowsky et al.1989; Fernández-Guardiola 1986; McNamara et al. 1994).

La necesidad de conocer los mecanismos que producen esta patología, así como la limitación natural que existe al estudiarla en los seres humanos mediante técnicas invasivas, hicieron necesario el desarrollo de modelos experimentales que presentan características semejantes a las observadas en las epilepsias humanas.

Estos modelos son útiles en el estudio de la fisiopatología así como para el desarrollo de medicamentos útiles en el tratamiento de estas alteraciones.

En la tabla II se encuentran enlistados varios de los modelos experimentales de epilepsia, clasificados de acuerdo al tipo de actividad epileptógena que les caracteriza, la cual puede ser local o generalizada así mismo estos modelos pueden ser producidos en forma aguda o crónica. Es importante resaltar que al igual que existen diferentes tipos de epilepsia también hay una gran variedad de modelos experimentales, lo cual muestra que lo que se pretende modelar es un conjunto de signos, que aunque tienen algo en común, son muy distintos entre sí. (Brailowsky et al. 1989; Fernández-Guardiola A. 1986).

TABLA I CLASIFICACIÓN DE LAS EPILEPSIAS *

	Clase de ataque +	Caracteres
I. Ataques parciales (ataques focales)	A) Ataques parciales con sintomatología elemental (corticales focales)	Diversas manifestaciones, generalmente sin trastorno de la conciencia, que incluyen convulsiones circunscritas a una extremidad o un grupo muscular (epilepsia motora jacksoniana), trastornos sensoriales específicos y localizados (epilepsia sensorial jacksoniana), y otros signos y síntomas limitados, que dependen de la región cortical particular que produce la descarga anormal.
	B) Ataques parciales con sintomatología compleja (del lóbulo temporal, psicomotor)	Ataques de confusión de la conducta, generalmente con trastornos de la conciencia con gran variedad de manifestaciones clínicas, concomitantes con la actividad electroencefalográfica generalizada extraña durante el ataque pero con datos de anomalías focales de la porción anterior del lóbulo temporal incluso en el periodo entre convulsiones en muchos casos.
	C) Ataques parciales generalizados secundariamente	
II. Ataques generalizados (ataques bilaterales simétricos)	A) Ausencias (pequeño mal)	Inconciencia breve y repentina concomitante con cuadro electroencefalográfico de voltaje alto, bilateralmente sincrónico, de tres por segundo y espiga y onda, generalmente con actividad motriz clónica simétrica que varía desde el parpadeo hasta sacudidas de todo el cuerpo, a veces sin actividad motora.
	B) Mioclono epiléptico bilateral masivo	Estremecimientos clónicos aislados concomitantes con estallidos breves de espigas múltiples en el EEG.
	C) Espasmos infantiles	Trastorno progresivo en lactantes con espasmos motores u otros signos convulsivos, cambios difusos extraños en el EEG entre las convulsiones (hipsarritmia) y desmejoría mental progresiva.
	D) Convulsiones clónicas	En niños de corta edad, contracciones clónicas rítmicas de todos los músculos, inconciencia y manifestaciones neurovegetativas notables.
	E) Convulsiones tónicas	En niños de corta edad, opistótonos, inconciencia y manifestaciones autónomas notables.
	F) Convulsiones tónicoclónicas (gran mal)	Convulsiones mayores, generalmente sucesión de espasmo tónico máximo de todos los músculos corporales seguido de estremecimientos clónicos sincrónicos y depresión duradera de todas las funciones centrales.
	G) Ataques atónicos	Pérdida del tono postural, con caída de la cabeza o del cuerpo.
	H) Ataques Acinéticos	Trastorno de la conciencia y relajación completa de la musculatura, secundarias a descarga inhibitoria excesiva.

* Modificado de la Clasificación Internacional de Ataques Epilépticos (Gastaut, 1970).

Tabla II Modelos Experimentales de Epilepsia.

I. Modelos de actividad epileptógena localizada (con posibilidades de generalización secundaria)

- 1.1. Agudos : metales convulsivantes : cobalto, tungsteno, etcétera.
congelación
fármacos convulsivantes : penicilina
ouabaina
estricnina
estrógenos conjugados
ácido kainico
- 1.2. Crónicos : estimulación eléctrica focal
crema de aluminio
sales de hierro
kindling

II. Modelos de actividad epileptógena generalizada.

- 2.2. Modelos genéticos : gallina
ratón (cepas DBA/2, El (ep), tottering)
ciertas ratas Wistar
gerbiles
perro beagle
mandril senegalés (papiro papiro)
- 2.2. Crisis producidas por privación : barbitúricos
alcohol
bromuros, etcétera
- 2.3. Crisis inducidas por fármacos
- 2.3.4. Estimulantes de la excitación
- 2.3.1.5. Inespecíficos : pentilnetetrazol
anticolinesterásicos
fluorotil
sustancia P
- 2.3.1.2. Específicos : glutamato
aspartato
quinolinato (?)
ácido homocisteico
ácido pteroilglutámico
ibotenato
- 2.3.1.3. Indirectos : ácido 3-mercaptopropiónico
tiosemicarbazida
- 2.3.2. Bloqueadores de la inhibición
- 2.3.2.1. Acción sobre los sistemas gabaérgicos
- Bloqueadores de la síntesis : DL. alilglicina
3-mercaptopropinato
O₂ a alta presión
tiosemicarbamato
antagonistas del fosfato de piridoxina
- Bloqueadores del receptor : bicuculina
penicilina
β-carbolina
picrotoxina
barbitúricos convulsivantes
- 2.4. Convulsivantes metabólicos : metionina sulfoximina
ácido monofluoroacético
deoxiglucosa

Uno de los modelos experimentales de epilepsia es el *kindling* o encendido (Goddard et al. 1969) que se induce por la aplicación de estimulaciones eléctricas repetidas, subconvulsivas, en ciertas áreas cerebrales, principalmente del sistema límbico. Dichas estimulaciones producen cambios conductuales y electroencefalográficos que culminan en crisis convulsivas generalizadas.

El *kindling* ofrece varias ventajas para su estudio sobre otros modelos experimentales de epilepsia entre las que se pueden señalar las siguientes:

1) es un modelo que en las primeras fases de su desarrollo caracteriza a un tipo de epilepsia focal y posteriormente a un tipo de epilepsia generalizada en el que se presentan convulsiones tonicoclónicas (Kalichman 1982);

2) se puede inducir por la estimulación de un área específica del cerebro;

3) su desarrollo gradual permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos, histológicos y bioquímicos que son concomitantes a la evolución del proceso epiléptico; y

4) produce cambios permanentes.

El estudio de las modificaciones de los procesos neuroquímicos durante el *kindling* permite conocer la participación de sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras relacionadas con el fenómeno epiléptico, por ejemplo el GABA, la serotonina, las catecolaminas, los aminoácidos excitatorios, los neuropéptidos y el mensajero neuronal óxido nítrico (ON) (McNamara et al. 1980, 1987; Bajorek et al. 1986; Kalichman 1982). De estas sustancias que están implicadas en la neurotransmisión, se hará una revisión general en uno de los capítulos siguientes.

El grupo de trabajo en el cual se desarrolló esta tesis está interesado en el estudio de los cambios conductuales, histológicos, electrofisiológicos y neuroquímicos

que son concomitantes a la epilepsia experimental. Este grupo, ha descrito modificaciones en la concentración de los péptidos opioides metionina y leucina encefalinas (Talavera et al. 1989) y alteraciones en la bomba Na⁺K⁺/ATPasa, dependiente de serotonina y noradrenalina, como consecuencia del *kindling* eléctrico (Hernández y Condés-Lara 1989, 1992). En este sentido el presente proyecto tiene como objetivo principal determinar la participación del óxido nítrico en la epilepsia, utilizando como modelo experimental el *kindling* eléctrico de la amígdala cerebral.

El ON se ha estudiado en diferentes modelos experimentales de epilepsia y existen evidencias de su acción tanto inhibidora como facilitadora de la actividad epiléptica (Buisson et al. 1993; Grooms y Jones 1994; Mollance et al. 1991; Przegalinski et al. 1994; Rondoui et al. 1992, 1993). En el *kindling* eléctrico amigdalino se ha propuesto que el ON actúa como un inhibidor (Rondouin et al. 1992). Sin embargo, no hay estudios que expliquen el mecanismo por el que esta molécula actúa para producir la inhibición o la excitación. En la literatura se proponen al menos dos mecanismos de acción del ON: uno es mediante la regulación positiva o negativa del receptor NMDA (Manzoni et al. 1992; Mollance et al. 1991; De Sarro et al. 1993) y el otro es por la activación de la síntesis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (Buisson et al. 1993). El conocimiento de los mecanismos a través de los cuales el óxido nítrico actúa en la epilepsia, requiere de estudios multidisciplinarios por lo que esta tesis doctoral está enfocada a determinar mediante experimentos histológicos y bioquímicos qué etapa o etapas de la vía biosintética del ON se modifican en el *kindling* eléctrico amigdalino.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del Oxido Nítrico

El óxido nítrico (ON) es una molécula mensajera producida en células endoteliales, macrófagos, neuronas y otros tejidos. Su descubrimiento abrió un nuevo panorama en los procesos de comunicación celular y neuronal debido a que presenta características muy particulares como son su composición química, N y O su peso molecular pequeño y por ser un radical libre, altamente reactivo, con una gran liposolubilidad por lo que puede difundirse libremente a través de las membranas. Tiene una vida media de segundos y se sintetiza a demanda. Además, no tiene un sitio de almacenamiento específico en las células y su receptor es el Fe^{2+} o el S^{4+} de diversas metaloproteínas a las cuales se une (Marletta 1989; 1993; Moncada et al. 1992; Nathan 1992; Snyder 1992; Dawson et al. 1992).

El ON y su coproducto de reacción, la citrulina, se sintetizan en la célula a partir del aminoácido L-arginina mediante la acción de la sintetasa del óxido nítrico (SON) (Palmer et al. 1988). De esta enzima se han aislado tres isoformas: la neuronal (I), la de los macrófagos (II) y la endotelial (III) (Marletta 1993; Lowestein y Snyder, 1992). Las SON neuronal y endotelial son producidas constitutivamente, son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y al ser activadas sintetizan picomoles de ON; a diferencia de la SON de los macrófagos que es expresada a bajas concentraciones en condiciones basales pero

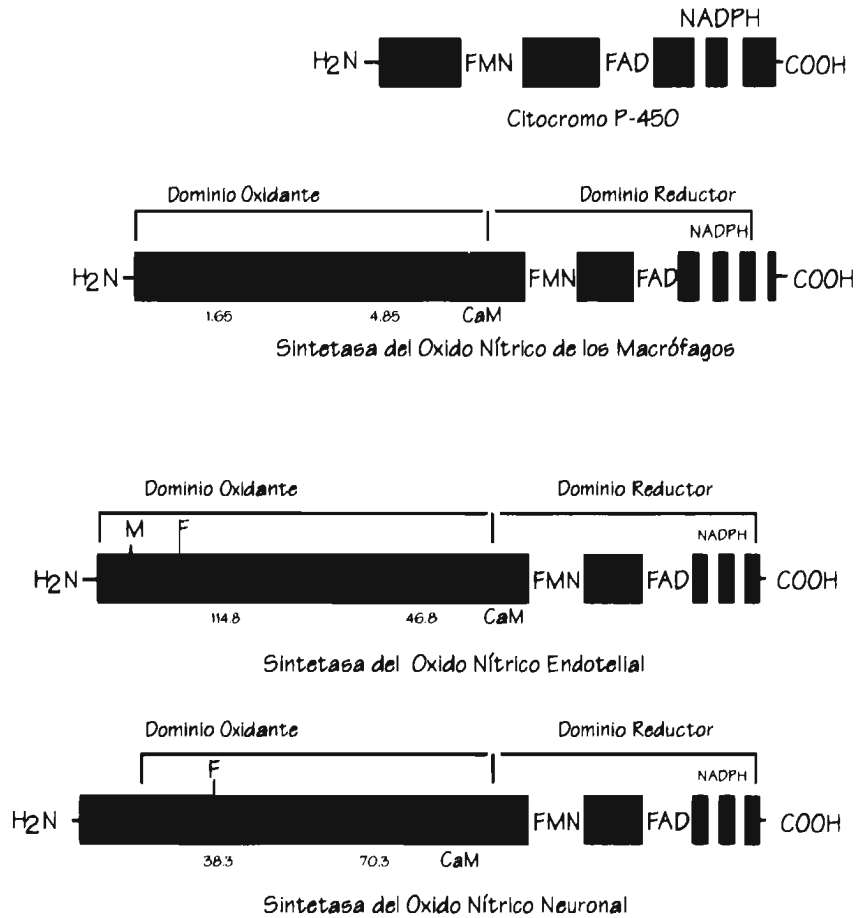


Fig. 3.1.1 Esquemas de la secuencia de aminoácidos de las isoformas de la sintetasa del óxido nítrico y de la P-450 reductasa. Estas cuatro proteínas tienen varias características en común; su secuencia carboxilo (-COOH) terminal es muy similar y constituye el dominio reductor, que presenta sitios de unión para FMN, FAD, y NADPH. La parte amino (NH₂) terminal contiene el dominio oxidante que en las SON endotelial y neuronal tiene un sitio de fosforilación (F). Todas las SON están constituidas por una región de 320 aminoácidos que se ha propuesto posee los sitios de unión para el grupo hemo, las tetrahydrobiopterinas y la arginina. Los dominios oxidante y reductor están separados por un sitio de unión para el complejo Ca⁺⁺/ Calmodulina (CaM). FMN=mononucleótido de flavina, FAD= dinucleótido de flavina, NADPH= nicotina adenina dinucleótido fosfato, CaM = sitio de unión para calmodulina.

al ser inducida por interferon gama y lipopolisacáridos; sintetiza nanomoles de ON durante largos periodos, además no depende de calcio para su actividad (Stuehr y Griffith 1992) (Ver Fig.3.1.1).

En el sistema nervioso se ha encontrado que la forma constitutiva de la SON está localizada en neuronas, mientras que la forma inducible se encuentra en el tejido glial. Aunque la distribución de ambas enzimas es diferente y necesitan distintas señales para ser activadas, ambas requieren de los cofactores; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH); tetrahidrobiopterina (TBH4) y flavinas (FAD/FMN) (Bredt y Snyder 1990a; Fortsterman et al. 1991; Murphy et al. 1993).

La reacción enzimática que cataliza la SON puede ser inhibida de manera endógena por fosforilación y exógenamente por diversas sustancias con estructura molecular análoga a la L-arginina, pero que producen efectos opuestos como N-monometil-L-arginina (L-NMMA), nitroarginina (NOArg) y nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) entre otras.

En el sistema nervioso central el óxido nítrico se libera en grupos neuronales que presentan receptores sinápticos para los aminoácidos excitadores como el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el kainato (Garthwaite et al. 1989 a, b; Bredt y Snyder 1989). La estimulación del receptor NMDA genera una corriente entrante de Ca^{2+} que incrementa la concentración de este ión en la terminal postsináptica (Mc Demont et al. 1986). El Ca^{2+} al unirse a la proteína calmodulina forma el complejo Ca^{2+} /calmodulina, que modula a la SON, para sintetizar a partir de L-arginina, el óxido nítrico y a su coproducto de reacción la citrulina (Bredt y Snyder 1990a; Moncada 1992).

El óxido nítrico producido en el citoplasma de la célula postsináptica, se difunde a través de la membrana en dirección retrógrada hacia la neurona presináptica y es la razón por la que se le ha denominado el mensajero retrógrado. Una vez que se ha difundido en el citoplasma de la célula presináptica, se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa (GC) para activar la síntesis de GMPc produciendo un incremento en la concentración de este nucleótido (Gally et al. 1990; Garthwaite et al. 1988)(Fig 3.1.2).

La localización de las células que sintetizan ON se puede determinar por tres técnicas: a) la hibridización *in situ*, con la cual se detecta al ARNm de la sintetasa del óxido nítrico; b) la inmunohistoquímica, que se basa en la utilización de anticuerpos específicos que reconocen a la SON; y c) la histoquímica, en la cual el NADPH de la porción carboxilo terminal de la sintetasa del óxido nítrico transfiere electrones a un colorante (azul de nitrotetrazolio) reduciéndolo, lo cual produce una sal insoluble de color azul que se precipita en el sitio en donde se encuentra la SON (Vincent 1986).

Por estudios bioquímicos e histológicos se ha demostrado que la NADPH-diaforasa y la sintetasa del óxido nítrico son la misma enzima, aunque existen evidencias de que su localización no es idéntica en algunas estructuras cerebrales de la rata. Esto puede deberse al tipo de fijador y a la concentración utilizada para la perfusión, así como a la diferente sensibilidad que tienen los métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos en la detección de la SON (Dawson et al. 1992; Hope et al. 1991).

En el sistema nervioso la sintetasa del óxido nítrico se localiza en poblaciones discretas de neuronas en el cerebelo, bulbos olfatorios, hipocampo, corteza, caudo putamen, amígdala, islotes de Calleja, cerebro medio y médula. También se ha encontrado en la glándula pituitaria, en los núcleos hipotalámicos, supraóptico y paraventricular y en células ganglionares de médula adrenal (Bredt et al. 1990b).

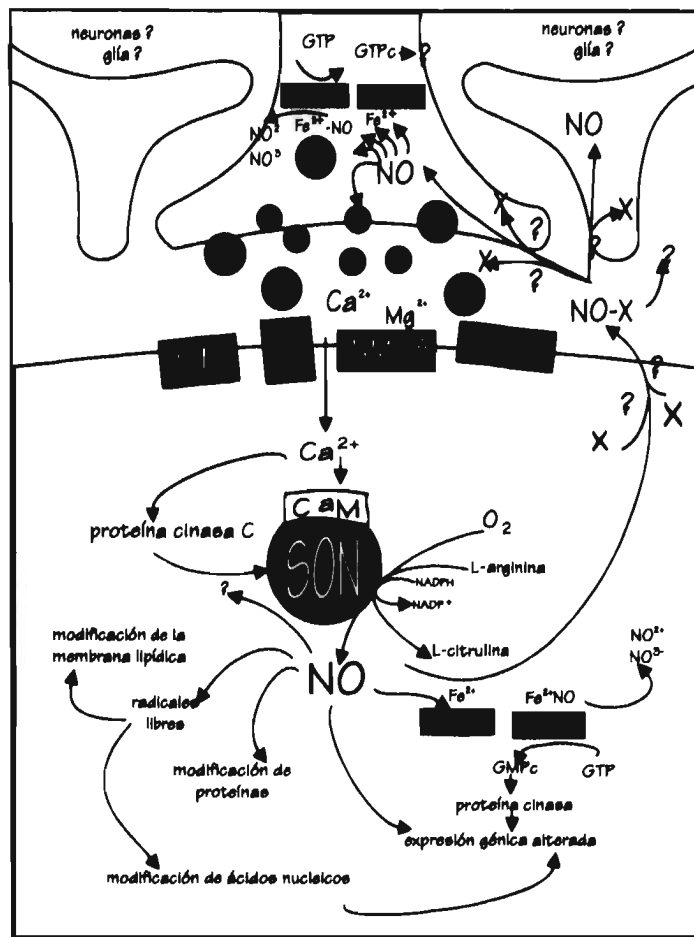


Fig.3.1.2 Mecanismo de síntesis y acción del óxido nítrico en las neuronas. Este diagrama muestra la activación de la síntesis del óxido nítrico por el aminoácido glutámico, así como las diferentes acciones propuestas que puede tener esta molécula al difundirse a través de la membrana, ya sea en las células presinápticas o en la célula donde fue sintetizado. NO=fórmula química del óxido nítrico, SON=sintetasa del óxido nítrico, GC-S=guanilato ciclasa soluble, glu=glutámico (Esquema tomado de Meller y Gebhart 1993).

3.2 Oxido Nítrico y Epilepsia

El estudio sobre la participación del ON en la epilepsia es reciente y se han realizado varios trabajos en diferentes modelos experimentales. Mollance et al. (1991) reportaron que la inyección por vía intracerebroventricular (i.c.v.) de 300 microgramos de L-arginina 1 min antes de inyectar NMDA (0.5 mg i.c.v.), produce, en la rata, cambios conductuales y electroencefalográficos característicos de la actividad epiléptica. Con estos resultados, ellos sugirieron que la L-arginina posee un efecto proconvulsivante probablemente mediado por el aumento en la síntesis de ON, ya que la inyección de L-arginina o NMDA no induce el mismo efecto.

Al utilizar el *kindling* eléctrico amigdalino (KEA), Rondouin et al. (1992), demostraron que la inyección intraperitoneal de nitroarginina (25 mg/kg), administrada dos veces al día, acelera las primeras fases del desarrollo, es decir, incrementa la duración de la posdescarga y la severidad de los estadios conductuales (fases 2-3), pero no modifica dichos parámetros en el *kindling* ya establecido (fase 5).

En otro estudio, este mismo grupo de investigación (Rondoui et al. 1993) demostró que el tratamiento previo con el inhibidor nitroarginina (25 mg/kg, 2 veces al día) altera los efectos de la inyección intraamigdalina de ácido kaínico (2.5 nmol) en la rata y ocasiona crisis más severas y mayor daño neuronal que en las ratas tratadas únicamente con ácido kaínico.

Buisson et al. (1993), inyectaron NMDA (i.c.v.) para producir convulsiones en ratones y probaron los efectos de los inhibidores de la SON: L-NAME 1-10 mg/kg, azul de metileno (10-50 nmol) y del inhibidor de la GC 8-Br-GMPc (50-200 nmol). Estos autores encontraron que la duración de las crisis se incrementa por inhibición de la síntesis de ON o de la enzima guanilato ciclasa. Este efecto se revierte al administrar L-arg o GMP cíclico. Ellos proponen que el ON sintetizado por la activación del receptor

NMDA incrementa la concentración de GMPcíclico, el cual induce la terminación de las crisis.

Grooms y Jones (1994) utilizaron un modelo *in vitro* de *kindling* en cortes de hipocampo para determinar el efecto de L-arg y Nitro-L-arg 100 mM en la génesis de las espigas interictales producidas en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Sus resultados muestran que la inhibición de la síntesis de ON facilita la iniciación de las espigas espontáneas interictales.

Balcioğlu y Maher (1993) determinaron que después de 100 min de la administración de ácido kainico (13 mg/kg, i.p.), se produce un incremento en la concentración de ON en hipocampo 5.3 veces mayor con respecto a la concentración basal (de 2.2 ± 0.5 nM a 11.8 ± 0.2 nM). Así mismo este efecto fue atenuado con el pretratamiento del inhibidor de la SON; la L-NMMA (50 mg/kg, 30 minutos antes de ácido kainico). Sin embargo, los autores no reportan cambios conductuales o electroencefalográficos.

En cuanto a los trabajos histológicos, Seidel et al. (1991) utilizaron el modelo del *kindling* farmacológico con pentilinetetrazol (45 mg/kg) en la rata, y realizaron un conteo, de las células NADPH-d reactivas que presentaban tinción clara y oscura para esta enzima, en todo el cerebro. Sus resultados indicaron que no se producen cambios significativos en la expresión de dicha enzima entre las ratas control y las epileptizadas.

El grupo de Miettinen (1995) encontró que la inyección i.p. de ácido kainico en la rata, produce un descenso en la tinción y en el número de células que presentan reacción positiva para la NADPH-diaforasa en el hilus y en el área CA1 del hipocampo, pero no encontraron modificación alguna en la capa molecular, en la granular y en el subcampo CA3. Ellos proponen que las diferencias encontradas pueden deberse a que en el hipocampo existen regiones que son más resistentes a la acción del kainato, lo cual puede deberse a la distribución diferencial de su receptor.

Recientemente Al-Ghoul et al. (1995) demostraron que el número y la intensidad de la tinción de las células NADPH-d reactivas permanece aumentado en el núcleo supraóptico y en los núcleos amigdalinos, en ratas que presentaron varias crisis convulsivas generalizadas, producidas por estimulación tipo *kindling*. Estos autores muestran la permanencia del fenómeno ya que el incremento en la tinción celular fue analizada un mes posterior a la presentación de la última crisis generalizada.

En la tabla III se señalan los diferentes modelos de epilepsia utilizados para probar si el óxido nítrico está involucrado en la epilepsia. Como se puede apreciar se han probado distintos inhibidores de la SON, así como diferentes vías de administración y dosis.

Tabla III Resumen de los trabajos farmacológicos sobre epilepsia y óxido nítrico.

Autor	Modelo Experimental	Fármaco	Dosis	Vía	Resultados
Mollance, 1991	Inyección i.c.v.	L-NMDA, L-arg	0.5 mg -2.5mg	i.c.v.	L-arg proconvulsiva
Rondouin 1992	<i>kindling</i> eléctrico	L-NOarg	25 mg/kg/2 veces al día	i.p.	facilitación del <i>kindling</i>
Rondouin 1993	estatus epiléptico	L-NOarg	25 mg/kg/2 veces al día	i.p.	crisis y daño neuronal mayor.
Buisson, 1993	inyección NMDA i.c.v.	NMDA, L-NAME, azul metileno	2nmol 1,3,10 mg/kg 10-50 nmol.	i.c.v.	L-NAME>wr azul met.> wr
Grooms, 1994	<i>kindling in vitro</i>	metil-L-arg Nitroarg	100 mM 100 mM	in vitro	facilitación de las espigas interictales.
Przegalinski 1994	kainico	L-arginina D-arginina *L-NAME *L-NMMA	150-600 mg/Kg 150-600 mg/Kg 3-30 mg/Kg 3-30 mg/Kg	i.p. i.p. i.p. i.p.	> umbral -no hay efecto *disminuyen umbral conv.

wr= carrera loca, *ambas, NO-arg= nitroarginina, L-NAME= L-nitroarginina metil éster

3.3 Kindling y Neurotransmisores

Diversos estudios morfológicos (Houser et al. 1990; Isokawa et al. 1993; Sutula et al. 1988, 1989) electrofisiológicos (Masukawa et al. 1989; Mody et al. 1988; Urban et al. 1990; Trainelis et al. 1989) y farmacológicos (Dingledine et al. 1990, Morrisett et al. 1989; Yeh et al. 1989; Martin et al. 1992) han encontrado similitud entre el *kindling* y la epilepsia del lóbulo temporal. En este contexto, el *kindling* puede considerarse como un modelo de plasticidad que es dependiente de la actividad celular, el cual produce alteraciones a nivel celular y de redes neuronales. Así mismo, el estado *kindling* es caracterizado por formas de excitabilidad neuronal aberrantes, sostenidas, responsables de las convulsiones generalizadas las cuales se ha propuesto pueden ser originadas por un desequilibrio en la neurotransmisión inhibitoria o activadora (Brailowsky et al. 1989; Fernández-Guardiola 1986; Mody et al. 1993; McNamara et al. 1995).

Con este modelo se han realizado estudios bioquímicos en los que se analizan diferentes etapas de la neurotransmisión como son la síntesis, la liberación, la unión a receptores, la actividad de las enzimas de síntesis y degradación. También, se han llevado a cabo estudios farmacológicos para probar el efecto de diversas sustancias agonistas y antagonistas de los receptores a los diferentes neurotransmisores y se ha valorado el efecto de diferentes fármacos anticonvulsivos.

En este capítulo se describen varios de los estudios sobre la participación de diferentes neurotransmisores en la epilepsia, llevados a cabo por diferentes grupos de investigación que utilizaron principalmente el modelo *kindling*.

3.3.1 Acetilcolina

La inyección repetida del agonista colinérgico carbamilcolina en diferentes estructuras cerebrales como la amígdala, el hipocampo y el estriado, producen crisis convulsivas similares a las que se observan en el *kindling* eléctrico amigdalino, es decir crisis que son de mayor intensidad conforme se administra el fármaco (Vosu y Wise 1975; Wasterlain y Jonec 1983).

Burchfield et al. (1979) encontraron que una sola aplicación de acetilcolina por iontoforesis en el fórnix, incrementa la sensibilidad del área CA1 del hipocampo a la estimulación tipo *kindling* y el efecto dura por lo menos 4 horas, estos resultados apoyan la hipótesis de que el incremento en la sensibilidad neuronal a la acetilcolina acompaña el desarrollo del *kindling*.

Sin embargo, la administración sistémica del antagonista muscarínico atropina produce únicamente un pequeño incremento en el número de estimulaciones requeridas para producir el *kindling* (Arnold et al. 1973; Albright et al. 1979) o no tiene ningún efecto en el desarrollo de éste (Corcoran et al. 1976; Blackwood et al. 1982) ni suprime las crisis cuando el *kindling* está establecido. El tratamiento sistémico con el inhibidor de la colinesterasa, el paration, tampoco modifica la velocidad del *kindling* (Joy 1981).

Si bien los estudios con los antagonistas antes mencionados muestran que el sistema colinérgico no es esencial para el desarrollo del *kindling* ni lo modifica cuando ya está establecido, los estudios bioquímicos de la neurotransmisión colinérgica muestran alteraciones después del *kindling*. La actividad de la acetiltransferasa de colina disminuye en diversas estructuras cerebrales como corteza, amígdala e hipocampo (Noda et al. 1982; McNamara 1980). Se ha propuesto que el descenso en la actividad de esta enzima es debido a un efecto compensatorio en la velocidad de síntesis de la acetilcolina.

El número de receptores colinérgicos es menor cuando se analizan preparaciones de animales *kindling* -rata- que presentaron la primera crisis convulsiva (Byrne et al. 1980; Dasheiff y McNamara 1980; Dasheiff et al. 1982; Noda et al. 1982). Sin embargo, esta disminución no está asociada con el efecto duradero del *kindling* ya que desaparece poco después de haber alcanzado la fase cinco del *kindling* (Dasheiff et al. 1982; Blakwood et al. 1982; Noda et al. 1982). Además, cuando se utilizan otros modelos de epilepsia, también se produce descenso en el número de los mismos receptores por lo que se propone que este efecto es debido a las crisis y no precisamente al *kindling* (Dasheiff et al. 1982; Lerer et al. 1983).

3.3.2 Serotonina

La concentración de serotonina en el cerebro se puede reducir por diferentes métodos experimentales: a) lesión electrolítica del núcleo raquídeo que produce un descenso del 25 al 40% de este neurotransmisor comparado con los valores control, b) lesión electrolítica por radiofrecuencia, c) destrucción de las neuronas serotoninérgicas

por inyecciones i.c.v. de 5,7 dihidroxitriptamina (Akari et al. 1983a), d)utilización del inhibidor de la síntesis de serotonina, la p-clorofenilalanina (PCPA). Estos métodos se han utilizado para determinar si los cambios en la concentración de serotonina afectan el desarrollo del *kindling*.

La lesión electrolítica del rafe dorsal no cambia el número de estimulaciones requeridas para producir el *kindling* del hipocampo y de la amígdala (Akari et al. 1983b). Sin embargo, la lesión por radiofrecuencia de este mismo núcleo disminuye en un 35% el número de estimulaciones requeridas para inducir el *kindling* (Racine y Coscina 1979).

Así mismo, la destrucción de neuronas con inyecciones i.c.v. de 5,7, dihidroxitriptamina o la utilización de PCPA, previos a la utilización del *kindling* no modifican el número de estimulaciones necesarias para producir la primera crisis fase cinco (Wilkison y Halpern 1979; Racine y Coscina 1979; Akari et al 1983b).

En general la reducción de la neurotransmisión serotoninérgica no tiene efectos en el desarrollo del *kindling*.

Otra estrategia experimental utilizada es aumentar la función serotoninérgica. La inyección diaria del precursor de la serotonina el 5HT-triptofano facilita el *kindling* en ratas (Munkebek y Schwork 1982) pero no en conejos (Stach et al. 1981) y el tratamiento con el agonista serotoninérgico quipazina no tiene efectos en la adquisición de las crisis en la rata (Bowyer 1982). Estos trabajos muestran que el aumento en la concentración de serotonina no da resultados consistentes.

La estimulación del núcleo raquídeo dorsal por aplicación de pulsos eléctricos de baja frecuencia producen liberación de serotonina. Cuando se efectúa este procedimiento una hora antes de dar el estímulo *kindling* se produce un efecto anticonvulsivo ya que el umbral a las crisis es mayor -en el gato- (Segal y Bloom, 1976) y disminuye la duración de la posdescarga -en la rata- (Kovacs y Zoll, 1974). Estos estudios sugieren que el núcleo raquídeo dorsal puede ejercer una influencia inhibitoria sobre las estructuras responsables de las crisis inducidas por *kindling*.

En cuanto a los estudios bioquímicos Munkenbeck y Schwark (1982) reportaron que en ratas *kindling*, sacrificadas siete días después del último estímulo la concentración de serotonina desciende en el cerebro medio, pero no en hipotálamo y amígdala.

En lo que respecta a los estudios efectuados sobre receptores serotoninérgicos Ashton et al. (1980) determinaron que la unión de ^3H -espiperona es igual en preparaciones de membranas de cerebros de ratas control y *kindling* en hipocampo, corteza frontal y área olfatoria, 30 minutos después de la última crisis convulsiva.

Con base en la información existente hasta la fecha, se ha sugerido que la neurotransmisión serotoninérgica no es esencial para el desarrollo, expresión o permanencia del *kindling*. Aunque es posible que el aumento en la función serotoninérgica por estimulación del raquídeo dorsal produzca un efecto inhibitorio de las crisis .

3.3.3 GABA

El ácido gamma aminobutírico (GABA), es probablemente el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro de los mamíferos. La distribución ubicua de GABA y la habilidad de sus antagonistas para producir convulsiones han permitido proponer la hipótesis de que la disfunción de GABA puede estar relacionada con la presentación de crisis epilépticas (Melbrum 1975; McNamara 1987).

El receptor del GABA_A es el complejo molecular GABA-benzodiazepinas (GABA/BZD) que tiene acoplado el sitio de unión para las benzodiazepinas, barbitúricos y un canal de cloro. Este puede ser manipulado farmacológicamente de diferentes maneras:

- 1) por administración de fármacos agonistas o antagonistas
- 2) permitiendo que el GABA permanezca más tiempo en la sinapsis
al inhibir a la enzima que lo degrada, la GABA-transaminasa

La inyección de los agonistas del receptor GABA/BZD como el pentobarbital y las benzodiazepinas suprimen totalmente las crisis convulsivas generalizadas producidas por el *kindling* (Babington y Wadeking 1973; Wise y Chinerman 1974; Racine et al. 1975; McIntyre et al 1982; Kalichman et al. 1982; Bowyer et al. 1983). Este efecto puede ser revertido por RO15-1788 que es un antagonista benzodiazepínico (Albertson et al. 1982; Le Gal La Salle y Feldblum 1983).

El tratamiento sistémico con los inhibidores de la GABA-transaminasa, por ejemplo el gaba-vinil- gaba, suprime las posdescargas focales y las crisis sistémicas (Shin et al. 1984) además el ácido gamma amino oxiácético suprime el componente

motor de las crisis convulsivas generalizadas (Le Gal La Salle 1980). La vigabatrina incrementa el contenido de GABA en el líquido cerebrospinal y reduce la frecuencia de las crisis en pacientes resistentes a los anticonvulsivos (Kälviäinen et al. 1993; Löscher y Siemens 1985).

Todas estas evidencias muestran que la neurotransmisión gabaérgica juega un papel importante en los mecanismos de inhibición de las crisis epilépticas.

En lo que respecta a los estudios bioquímicos, se ha determinado la actividad de la enzima de síntesis del GABA, la glutamato descarboxilasa, así como la de la GABA transaminasa que metaboliza al GABA y se ha reportado que no se modifica la actividad de ninguna de estas enzimas en focos epilépticos ni en el hipocampo de pacientes epilépticos (McGeer et al. 1971; Schmidt et al. 1984; Sherving et al. 1987).

La liberación de ^3H -GABA en cortes de el hipocampo de ratas *kindling* se incrementa (Liebowitz et al 1978; Kamphius et al. 1990).

Los trabajos en los que se analiza la unión a receptor son contradictorios ya que algunos reportan incremento en la afinidad a benzodiazepinas en hipocampo y amígdala pero no en caudado en ratas *kindling* dos semanas después de la última crisis (Tuff et al. 1983 a). En otros trabajos no encuentran cambios en las mismas estructuras (Burnham et al. 1983).

La cuantificación directa de GABA en corteza frontal, cerebelo o cerebro medio una semana después de la última crisis, no muestra cambios significativos (Fabisiak y Schwark 1982).

Si bien los experimentos farmacológicos muestran que los agonistas del receptor GABA/BZD, así como los inhibidores de la GABA descarboxilasa, producen un efecto inhibitorio de las crisis, los experimentos bioquímicos no muestran un efecto claro. Por ejemplo la concentración de GABA no se encontró aumentada. Los trabajos de unión al receptor por benzodiazepinas dan resultados contradictorios y la enzima descarboxilasa del ácido glutámico no se modifica.

3.3.4 Acido Glutámico

El ácido glutámico está ampliamente distribuido en el cerebro y tiene efectos predominantemente excitatorios. Su efecto como sustancia convulsivante fue demostrado por Hayashi (1952) quien encontró que la aplicación focal de este neurotransmisor, en la neocorteza o en núcleos subcorticales, induce crisis. La posibilidad de que el metabolismo anormal del glutamato pueda contribuir a la epilepsia se originó por observaciones de que los niveles de glutamato en plasma son más altos en pacientes con epilepsia generalizada así como en sus parientes de primer grado - padres- (Janjua et al. 1992a). Este incremento también se ha observado en modelos de epilepsia genéticos en roedores (Janjua 1992 b) y en ratas *kindling*, en hipocampo y en corteza (Minamoto et al., 1992).

La expresión anormal o el incremento en la función de los subtipos de receptores a glutamato es importante en varias formas de epilepsia adquirida (McNamara 1994; Meldrum 1994). Las propiedades funcionales de los receptores NMDA se modifican en ratas *kindling* (Köhr et al. 1993; Kraus et al. 1994; Lee et al. 1994; Mody et al. 1988). Así

mismo en cortes de focos epilépticos de corteza de humanos se ha encontrado un aumento en la respuesta de dichos receptores (Louvel 1992).

Los antagonistas competitivos del receptor NMDA son potentes inhibidores de epilepsias reflejas en modelos de roedores y en crisis inducidas químicamente (Croucher et al. 1982; Meldrum 1992; Chapman 1995). Administrados i.c.v. son más potentes que las drogas antiepilépticas (Meldrum et al. 1983; Patel et al. 1990; Chapman 1991) bloquean el proceso del *kindling* pero no son tan efectivos cuando el fenómeno se ha establecido (Dürmüller et al. 1994).

Los antagonistas del receptor NMDA como el anestésico penciclidina, la ketamina y el MK-801 que bloquean el canal del receptor NMDA, son anticonvulsivantes en modelos animales, pero producen estereotipos y otras anomalías a dosis anticonvulsivantes (Rogawski 1993).

Los antagonistas del glutamato y del aspartato suprimen las crisis del *kindling* (Peterson et al. 1983).

3.3.5 Péptidos opioides

Las evidencias farmacológicas que muestran que los péptidos opioides participan en los procesos epilépticos, fueron presentadas por varios trabajos en los que se reportó que la administración i.c.v. de metionina encefalina (Urca et al. 1977; Frenk et al. 1978), leucina encefalina (Frenk et al. 1978; Snead et al. 1980, 1982) D-ala-metionina encefalina (Tortella et al. 1978, 1981; Frenk et al. 1984), D-ala-leucina encefalina (DALE) (Tortella et al. 1981) β -endorfina (Henriksen et al. 1978; Snead et al.

1982) y morfina (Urca et al. 1977; Frenk et al. 1978, 1983; Tortella et al. 1978; Snead et al. 1982) producen alteraciones electroencefalográficas (EEG) características de la actividad epiléptica, las cuales van acompañadas por conductas como catatonía, sacudidas de perro mojado y movimientos mioclónicos.

Estos mismos efectos se han observado al administrar dichas sustancias en el hipocampo (Elazar et al. 1979; Sprick et al. 1981), núcleo dorsomedial del tálamo (Frenk et al. 1978) y núcleo caudado (Neal y Keane, 1978). Los efectos epilépticos producidos por todas estas sustancias pueden ser total o parcialmente antagonizados mediante la administración sistémica de naloxona (Frenk et al. 1978; Tortella et al. 1978).

Cain y Corcoran (1984, 1985) lograron producir un efecto *kindling* mediante la aplicación de inyecciones locales repetidas de metionina encefalina y β -endorfina en la amígdala posterior y el hipocampo ventral, en dosis subconvulsivas. Sin embargo, la inyección de morfina produjo tolerancia. Todos estos efectos fueron antagonizados por naloxona aplicada en forma intraperitoneal.

Bioquímica

Vindrola et al. (1981a) encontraron que la concentración de metionina y leucina encefalina se incrementa 28 horas después de producirse crisis generalizadas repetidas (cinco ó más) en ratas con *kindling* eléctrico amigdalino. Posteriormente cuantificaron ambos pentapéptidos durante el desarrollo del *kindling* y encontraron que la leucina encefalina se incrementa de manera progresiva, lo cual sugiere que este péptido está correlacionado con la duración de la posdescarga y con las etapas

conductuales, mientras que la metionina encefalina aumenta como consecuencia de varias crisis generalizadas (Vindrola et al. 1981 b).

El *kindling* puede ser inducido también por sustancias químicas administradas localmente tales como la carbamilcolina, la penicilina y otras. Así mismo, por la administración sistémica de cocaína, pentilentetrazol y ácido kaínico (Vosu y Wise 1975; Collins 1978; Post y Kopanda 1976; Ito et al. 1977).

Utilizando el modelo del *kindling* químico con pentilentetrazol Vindrola et al. (1983) encontraron que ambas encefalinas se incrementan en el estriado, el septum y la amígdala 24 horas después de que los animales presentaron la quinta crisis generalizada. Así mismo determinaron que la metionina encefalina esta relacionada con cambios duraderos inducidos por este modelo, mientras que la leucina encefalina está asociada a la posdescarga y al desarrollo de las etapas conductuales (Vindrola et al 1984).

McGinty et al. (1986), reportaron que los niveles de inmunorreactividad a la metionina encefalina se incrementaron en un 43% en el hipocampo de ratas sacrificadas 24 horas después de producirse 2 crisis generalizadas. Sin embargo, en el hipotálamo, en el estriado, en la corteza frontal, así como en cerebro medio no detectaron modificaciones. Además, determinaron que 28 días después de haberse producido el *kindling* amigdalino, la metionina encefalina había regresado a valores control.

Naranjo et al. (1986) describieron que durante el desarrollo del *kindling* eléctrico amigdalino en la rata, se produce un incremento del ARN mensajero para la

proencefalina A, así como para el octapéptido Met-encefalina-Arg-Gli-Leu en el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal y núcleo acumbens

Talavera et al. (1989) determinaron que la leucina encefalina aumenta principalmente en el hipocampo y la amígdala desde las fases 2-3 del *kindling*, en cambio la metionina encefalina aumenta después de varias crisis convulsivas también en estas dos estructuras. Este efecto es transitorio ya que 28 días después de la última crisis convulsiva la concentración de ambos péptidos regresa a valores control.

En un trabajo reciente, Shinoda et al. (1991) determinaron que el ARNm para la proencefalina aumenta en respuesta a la primera estimulación eléctrica tipo *kindling*.

En humanos la morfina y los péptidos opioides a bajas dosis son predominantemente anticonvulsivantes (Frenk, 1983). Además se ha propuesto que participan en la inhibición post ictal de las crisis (Tortella et al. 1985).

En esta revisión se describieron algunos de los estudios llevados a cabo con el propósito de determinar cuales son las modificaciones en la neurotransmisión que se producen en la epilepsia utilizando como modelo el *kindling*. Aunque el fenómeno es bastante complejo se han encontrado modificaciones en las rutas de síntesis, en los receptores, y se ha determinado que sucede cuando se depleta la concentración de un neurotransmisor o se inhibe su recaptura etc. Si bien no se conoce específicamente como participa cada uno de los neurotransmisores en el fenómeno epiléptico si se ha determinado su efecto inhibitor o activador de varios de ellos como sucede con el GABA y el glutámico respectivamente. Y se han sintetizado diferentes fármacos

agonistas ó antagonistas de estos que han probado tener efectos inhibidores de las crisis.

En cuanto al óxido nítrico su acción como mensajero en las crisis todavía no es clara, esto se debe probablemente a varias de sus características: es un mensajero retrógrado que puede producir activación ó retroalimentación positiva en las crisis y también es un radical libre que dependiendo de su estado de oxido-reducción puede tener acciones neuroprotectoras ó neurodegenerativas. En el siguiente capítulo se destaca la acción que tiene el óxido nítrico como radical libre y se describe la regulación que puede tener esta molécula sobre el receptor NMDA para ejercer su efecto neuroprotector, mecanismo que se ha propuesto sucede en la inhibición de las crisis.

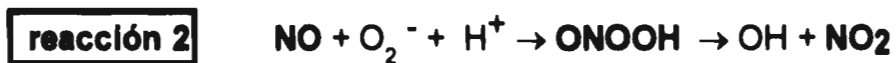
3.4 Estrés oxidativo, ácido glutámico y óxido nítrico.

Por su estructura molecular el óxido nítrico es un radical libre ya que en su última órbita contiene un electrón no apareado. Pertenece a la familia de los radicales de oxígeno, que son moléculas altamente reactivas y sintetizadas por las células como productos secundarios de las reacciones metabólicas que utilizan oxígeno molecular (O_2). Entre éstos se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Todos ellos se sintetizan como parte del metabolismo celular normal, pero en condiciones patológicas se producen en cantidades que son citotóxicas y ocasionan lo que se ha denominado estrés oxidativo (Coyle y Puttfarcken 1993).

Los radicales de oxígeno pueden actuar sobre proteínas, ácidos desoxirribonucleicos y lípidos de las membranas produciendo daños en las funciones celulares que han sido asociados con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Huntington así como con la isquemia y la epilepsia, entre otras (Lipton et al. 1993).

En el cerebro existen enzimas como la monoamino oxidasa, la tirosina hidroxilasa y la L-aminoxidasa que sintetizan peróxido de hidrógeno como coproducto de su actividad normal. Así mismo, la autooxidación del ácido ascórbico y las catecolaminas producen H_2O_2 .

Algunas enzimas neuronales al ser activadas sintetizan además del producto de reacción principal, sustancias oxidantes, como sucede con las lipooxigenasas y las ciclooxigenasas que, al metabolizar al ácido araquidónico, inducen la formación del anión superóxido. Otro ejemplo es la activación de la sintetasa del óxido nítrico -ver reaccion 1- que cataliza la formación del óxido nítrico, el cual puede reaccionar rápidamente con aniones superóxido para formar el anión peroxinitrito que se transforma en radicales hidroxilo -ver reacción 2- (Graham, 1978).



Entre los radicales, el hidroxilo es la especie más reactiva y citotóxica. Aunque su mecanismo de síntesis no se conoce, se sabe que la descomposición lenta del peróxido de hidrógeno da origen a esta molécula (Halliwell y Gutteridge 1989).

Si bien la síntesis de los radicales de oxígeno forma parte del metabolismo celular, su sobreproducción es lo que ocasiona el daño. Sin embargo, las células poseen mecanismos de defensa como las vitaminas "C" y "E" que son agentes antioxidantes (Bieri et al. 1983; Stampfer et al. 1993).

Aunque existen múltiples factores implicados en el desencadenamiento del estrés oxidativo en las células del Sistema Nervioso Central el ácido glutámico es el más involucrado en este proceso a través de la activación de los receptores ionotrópicos.

El óxido nítrico es otra de las moléculas involucradas en el estrés oxidativo sin embargo, su reactividad y propiedades dependen de su estado de oxido-reducción, ya que se puede encontrar en la célula como óxido nítrico neutro (NO^\bullet), catión nitrosonio (NO^+) o como anión nitrosilo (NO^-) (Stamler et al. 1992).

El óxido nítrico neutro reacciona en soluciones acuosas con el anión superóxido para formar peroxinitritos y radicales hidroxilo. También forma complejos con metaloproteínas como la hemoglobina y puede reaccionar con enzimas de la cadena del transporte electrónico y la aconitasa para producir efectos citotóxicos.

El catión nitrosonio reacciona con nucleófilos como son las bases ricas en electrones y compuestos aromáticos. De esta manera produce compuestos metalo nitrosilos, los cuales pueden inducir respuestas fisiológicas como la vasodilatación o cambios patológicos como por ejemplo la carcinogénesis (Stamler et al. 1992).

El papel fisiológico del anión nitrosilo es desconocido ya que en soluciones acuosas es rápidamente convertido a óxido nítrico (Kam y Govender, 1994).

Aparte del efecto citotóxico que tiene el ON como radical de oxígeno hay evidencias de su efecto neuroprotector, que depende del medio en donde se encuentre. Recientemente, Lipton et al. (1993) encontraron que un ambiente celular rico en aniones superóxido, favorece la formación de peroxinitritos y por lo tanto

produce citotoxicidad, a diferencia de un ambiente reductor que favorece la S-nitrosilación del receptor NMDA, el cual produce un efecto de "baja actividad" del receptor y por lo tanto confiere protección contra la neurotoxicidad. En la figura 3.4.1 se presenta un modelo propuesto por Lipton et al. (1993) en el que se describe cual es el mecanismo por el que el óxido nítrico actúa como sustancia neuroprotectora o bien como molécula neurotóxica, dependiendo de su estado de oxidación.

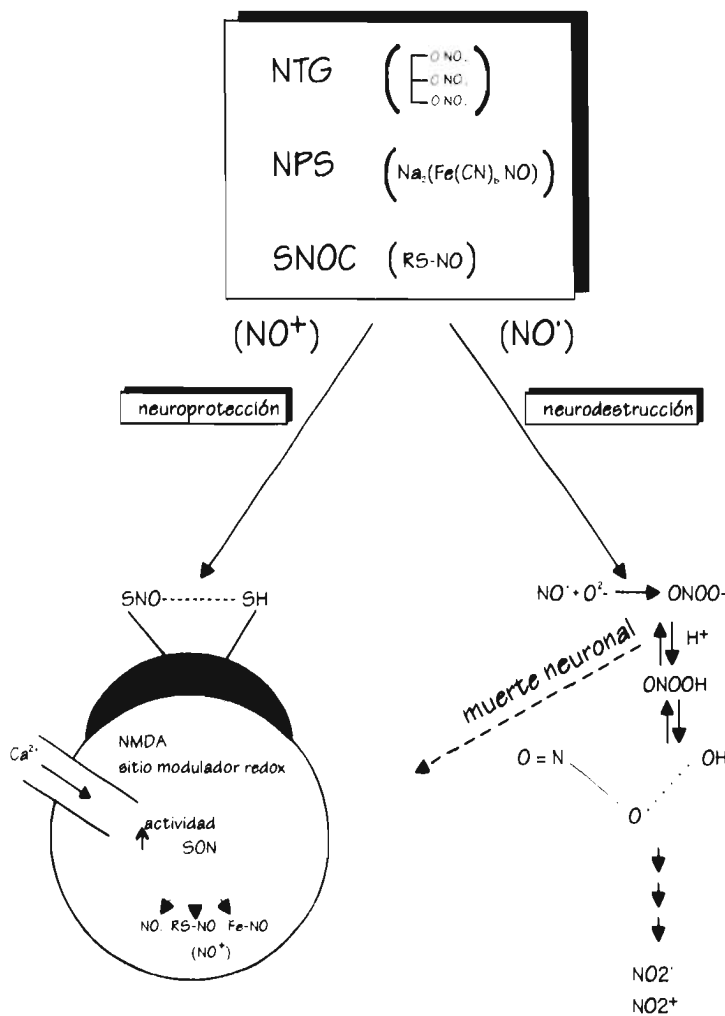


Fig. 3.4.1 Modelo de acción propuesto para el óxido nítrico en las neuronas. La parte superior muestra diferentes moléculas que pueden donar ON en diferentes estados de oxidación, ya sea como catión NO^+ o en su estado neutro, $\text{NO}\cdot$. Estos pueden producir diferentes efectos en la célula ya sea neuroprotección ó neurodestrucción. El sitio que modula la actividad del receptor NMDA (parte inferior izquierda) puede ser regulado por S-nitrosilación con NO^+ para formar RS-NO esta reacción favorece la formación de uniones disulfuro que bloquean la entrada de Ca^{++} a la célula ayudando así a la neuroprotección. Por el contrario cuando el radical NO es reducido a su estado neutro $\text{NO}\cdot$ (parte inferior derecha) puede reaccionar con aniones superóxido para transformarse en neurotóxico al formar peroxinitritos. NTG=nitroglicerina, SNP=nitroprusiato de sodio, SNOC= S-nitrocisteína, SON=sintetasa del óxido nítrico (esquema tomado del artículo de Lipton et al. 1993).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en los antecedentes podemos decir que si bien el ON participa en el fenómeno epiléptico, su papel como activador o inhibidor sobre las crisis epilépticas depende de diferentes factores, como son el modelo de estudio, la estructura estimulada o analizada, la dosis y la vía de administración de los fármacos empleados (Buisson et al. 1993; De Sarro et al. 1993; Grooms et al. 1994; Mollance et al. 1991; Przegalinski et al. 1994; Rondoui et al. 1992, 1993)

Como se mencionó antes, cuando se inhibe a la SON durante el desarrollo del *kindling* eléctrico amigdalino, se presentan las primeras fases conductuales en un menor número de estímulos, es decir, se produce una facilitación del fenómeno; sin embargo, en el *kindling* establecido no hay cambios (Rondoui et al. 1992). Otra evidencia es la reportada por Grooms y Jones (1994) en el que utilizan el *kindling* "in vitro" en hipocampo y prueban inhibidores de la SON los cuales facilitan la presencia de espigas espontáneas. Estas evidencias indican que el ON puede estar relacionado con los procesos de hiperexcitabilidad neuronal que pueden desencadenar en el fenómeno epiléptico. Sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo de acción de esta molécula en las crisis epilépticas.

En el *kindling* eléctrico amigdalino sólo se han utilizado inhibidores de la síntesis del ON para probar su relación con las crisis, pero no se ha analizado si su vía de síntesis se modifica como otro de los factores que activen su acción inhibidora o

excitadora. En este contexto uno de los objetivos principales de esta tesis es, determinar si el número de células que contienen concentraciones detectables de SON se modifica en estructuras cerebrales como la amígdala, el hipocampo y el estriado. Estas áreas se seleccionaron por que pertenecen al sistema límbico y están relacionadas con la actividad epiléptica. En relación con la vía de síntesis del ON, se cuantificará por cromatografía líquida de alta presión a la arginina que es la molécula precursora del óxido nítrico, a su coproducto de reacción la citrulina y al ácido glutámico. Este último nos interesa debido a la relevancia que tiene como neurotransmisor excitador en las crisis epilépticas y por su acción activadora sobre la vía de síntesis del ON.

5. HIPOTESIS

El glutamato se ha asociado con estados de hiperexcitabilidad en el Sistema Nervioso Central incluyendo las crisis convulsivas generalizadas. Así mismo, este aminoácido activa la síntesis del mensajero neuronal óxido nítrico. La hipótesis de esta tesis es que en la epilepsia generalizada producida por el *kindling* eléctrico amigdalino, la vía de síntesis del ON se encuentra activada. De esta forma la óxido nítrico sintetasa determinada por la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa se encontrará aumentada. Así mismo la concentración del óxido nítrico, de su precursor la arginina y de su coproducto de reacción la citrulina estará aumentada. Este efecto dependerá de cada estructura analizada.

6. OBJETIVOS

El objetivo principal fue determinar la participación del óxido nítrico en la epilepsia para lo cual utilizamos el modelo del *kindling* eléctrico amigdalino y realizamos estudios histológicos y bioquímicos.

De esta manera se propusieron los siguientes objetivos:

1) determinar si en el *kindling* establecido (10 crisis convulsivas generalizadas) se producen modificaciones en el número de células que contienen a la sintetasa del óxido nítrico en las siguientes estructuras: caudo putamen, amígdala e hipocampo en condiciones control, implantado no estimulado y *kindling*. Para lo cual se llevó a cabo la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa y las neuronas marcadas fueron contadas por el método de cartografía digital.

2) analizar si la síntesis del óxido nítrico se modifica por lo que se cuantificó a su precursor la arginina, así como a su coproducto de reacción la citrulina y al ácido glutámico debido a su papel excitatorio en las crisis y a su acción activadora de la síntesis del ON. Las estructuras cerebrales en las que se cuantificaron los aminoácidos son el caudo putamen, la amígdala, el hipocampo y el cerebelo. La cuantificación se llevó a cabo en grupos control, implantado no estimulado y *kindling*.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Sujetos experimentales: se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar, de 290 a 310 g de peso, los cuales fueron mantenidos en condiciones de temperatura y luz controladas (23 ± 3 °C, con 12 horas de iluminación comenzando a las 6.00 hr), con agua y alimento a libre demanda.

7.2 Grupos de trabajo: para llevar a cabo los experimentos histológicos y la cuantificación de los aminoácidos se formaron grupos constituidos cada uno por 10 ratas, con las características que se describen a continuación:

1. Control (C): animales sanos que no recibieron ningún tratamiento.
2. Implantado no estimulado (INE): ratas que fueron implantadas crónicamente en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda, pero que no recibieron estimulación alguna.
3. Kindling (K): ratas a las cuales se les implantó un electrodo bipolar trenzado, en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda y que fueron estimuladas con la técnica de kindling (que se describe más adelante) hasta producir 10 crisis convulsivas generalizadas.

7.3 Procedimiento Quirúrgico: Las intervenciones quirúrgicas para la implantación del electrodo bipolar de estímulo y registro, se llevaron a cabo

anestesiando a los animales con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso vía intraperitoneal. Una vez anestesiada, la rata se colocó en el aparato estereotáxico y se le implantó en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda un electrodo bipolar trenzado, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Paxinos y Watson (1982), tomando como referencia la línea interaural, anterior 6.2 mm; lateral 5.0 mm; altura 1.5 mm. La colocación del electrodo se llevó a cabo con la ayuda del registro de la actividad eléctrica, bajo el criterio de la actividad espontánea y de los potenciales evocados a la estimulación olfativa y somato sensorial. El electrodo y su conector fueron fijados en el cráneo de la rata con acrílico dental. Una vez terminada la implantación, los animales fueron sometidos a un período de recuperación posquirúrgica de una semana. Los animales se colocaron en cajas individuales durante toda la fase experimental.

7.4 Kindling Eléctrico Amigdalino .

Después del período de recuperación se inició el kindling amigdalino. Se aplicaron dos estímulos al día, el primero entre 9:00 y 10:00 a.m. y el segundo entre 3:00 y 4:00 de la tarde. Se emplearon los siguientes parámetros de estimulación, 1 tren de 1s de duración con pulsos de 1 ms y una frecuencia de 60 Hz, con una intensidad umbral para la estimulación amigdalina. Es decir, al aplicar la estimulación umbral se produce una posdescarga de 5 a 7 s acompañada de cierre del ojo ipsilateral en la mayoría de los casos. La evolución del kindling se evaluó por la duración y la frecuencia de la posdescarga presentada en cada estimulación. La frecuencia fue

considerada en los primeros 10 s de la posdescarga. Además, se valoraron los estadios conductuales de las ratas presentados en cada estimulación, que fueron calificados conforme a los criterios progresivos y acumulativos descritos por Racine et al. (1972) y que consisten en:

- ◆ Estadio 1 Movimientos de hocico y de la cara, cierre del ojo.
- ◆ Estadio 2 Movimientos oscilatorios de la cabeza, masticación
- ◆ Estadio 3 Sacudidas clónicas de las patas anteriores
- ◆ Estadio 4 Levantamiento con apoyo en las patas posteriores acompañado por clonus de los miembros anteriores.
- ◆ Estadio 5 Crisis generalizadas con pérdida del control de la postura.

7.5 Análisis Histoquímico

7.5.1. Reacción Histoquímica de la NADPH-diaforasa.

Los animales de experimentación fueron anestesiados y perfundidos por vía intracardíaca con 250 ml de solución salina al 0.9%, seguida por 250 ml de una solución fijadora hecha con paraformaldehído al 4 % en amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4). Una vez terminada la perfusión se disectaron los cerebros y se colocaron en la solución fijadora durante 2 h. Posteriormente, se pasaron a una solución de sacarosa al 15% y se mantuvieron en este medio por 24 h. Los cerebros fueron seccionados en un microtomo de congelación en rebanadas de 40 micras; se tomaron como referencia las coordenadas indicadas en el atlas de Paxinos y Watson (1982) para recolectar hipocampo, amígdala y caudo putamen (de rostral a caudal,

interaural 10.2 a 6.2). La reacción histoquímica para la NADPH-diaforasa se llevó a cabo de la siguiente manera: los cortes se incubaron en una solución amortiguadora de fosfatos con tritón X-100 al 0.3%, 0.1 mg/ml de azul de nitrotetrazolio y 1.0 mg/ml de β -NADPH, durante una hora. Después de la incubación los cortes se lavaron con solución amortiguadora, se montaron en portaobjetos gelatinados y se dejaron secar hasta el día siguiente para ser deshidratados en series de etanol (70%, 95%, 100%, 100%) y xilol (100%, 100%), para finalmente montarlos con resina sintética (Vincent y Kimura 1992).

7.5.2 Determinación del número de células NADPH-d reactivas por análisis de imágenes.

Para realizar el conteo de las células NADPH-d reactivas se usó un equipo computarizado de análisis de imágenes "Histo 2000" de Biocom, Francia (Corkidi 1989; Hirsch et al. 1992) el cual digitaliza la imagen que se observa en el microscopio óptico con la ayuda de una cámara de alta resolución. La imagen es visualizada en un monitor de computadora y ésta es procesada con la ayuda del programa "Histo 2000". Con este sistema se marcaron cada una de las células NADPH-d reactivas en forma manual en el hipocampo, el caudo putamen y la amígdala, diferenciándolas de acuerdo a su tipo de tinción en claras (x) y oscuras (∇). Posteriormente se obtuvo la suma total de las células contadas y se calculó la densidad por mm^2 . Debido a lo laborioso del conteo semiautomático el número de ratas analizadas fue de tres para cada condición

experimental y el número de cortes fue de nueve, en éstos se analizó cada una de las estructuras completas.

Para determinar si existen dos poblaciones de neuronas las claras y las oscuras se analizó el nivel de gris de una muestra de neuronas de las tres estructuras. Los resultados de los grupos fueron comparados con la prueba estadística de análisis de varianza. Esta prueba también se utilizó para comparar la densidad celular/mm² entre los grupos control, implantado no estimulado y kindling de cada una de las estructuras analizadas, cuando el análisis de varianza indicó una diferencia significativa se aplicó la prueba de la diferencia significativa mínima protegida.

En la Fig. 7.5.1 se muestra un esquema general que resume el método seguido para el análisis histológico.

A continuación se describe el método utilizado para la cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y posteriormente se describirán los resultados obtenidos para ambas metodologías.

Método

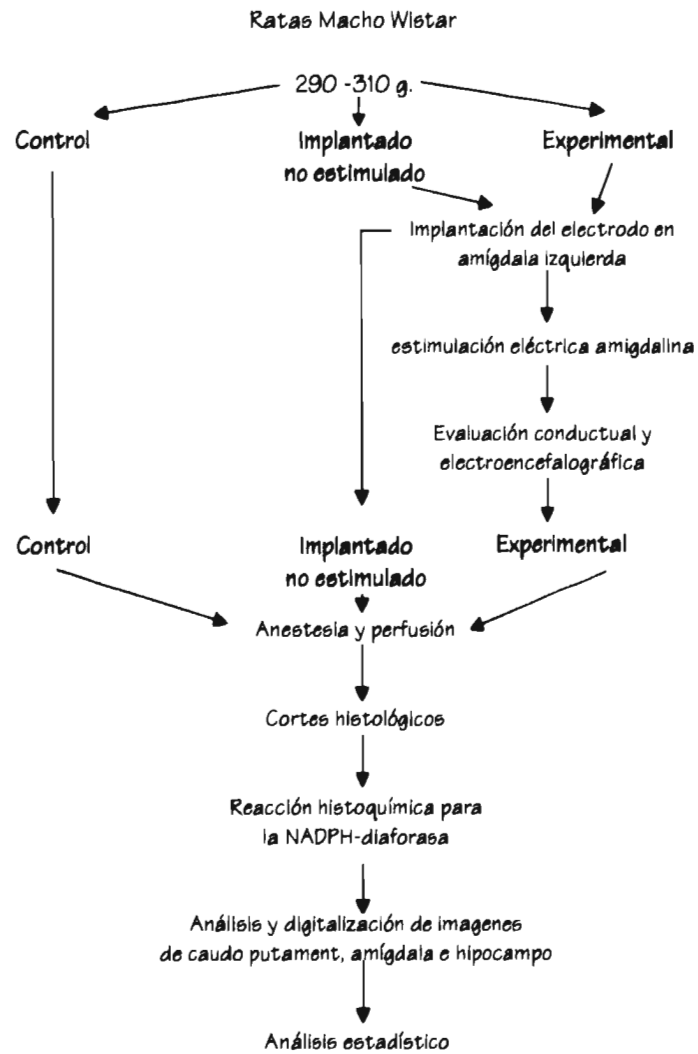


Fig. 7.5.1 Diagrama que muestra las principales etapas experimentales que se siguieron para el análisis de las células NADPH-d reactivas.

7.6 Cuantificación de la arginina, la citrulina y el ácido glutámico por el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

7.6.1 Disección de estructuras cerebrales.

Una vez que el grupo de ratas kindling presentó 10 crisis convulsivas, fue sacrificado por decapitación 24 horas después de la última crisis, junto con el grupo control y el implantado no estimulado .

Se obtuvieron muestras de las siguientes estructuras nerviosas: estriado, hipocampo y cerebelo de acuerdo al método de Glowinski e Iversen (1966). Ver fig. 7.6.1 y para la amígdala se siguió el método de Engel y Sharpless (1977). Inmediatamente las estructuras se colocaron en una caja con hielo seco pulverizado para mantenerlas a -30 °C, se pesaron y posteriormente se colocaron en 1 ml de una solución de ácido perclórico 0.1M y EDTA 0.01mM. Las muestras se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta continuar con el proceso. Para extraer los aminoácidos, las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas a 15,000 rpm durante 45 minutos a 4 °C, se descartó el precipitado y el sobrenadante se guardó en congelación para efectuar después el análisis de los aminoácidos.

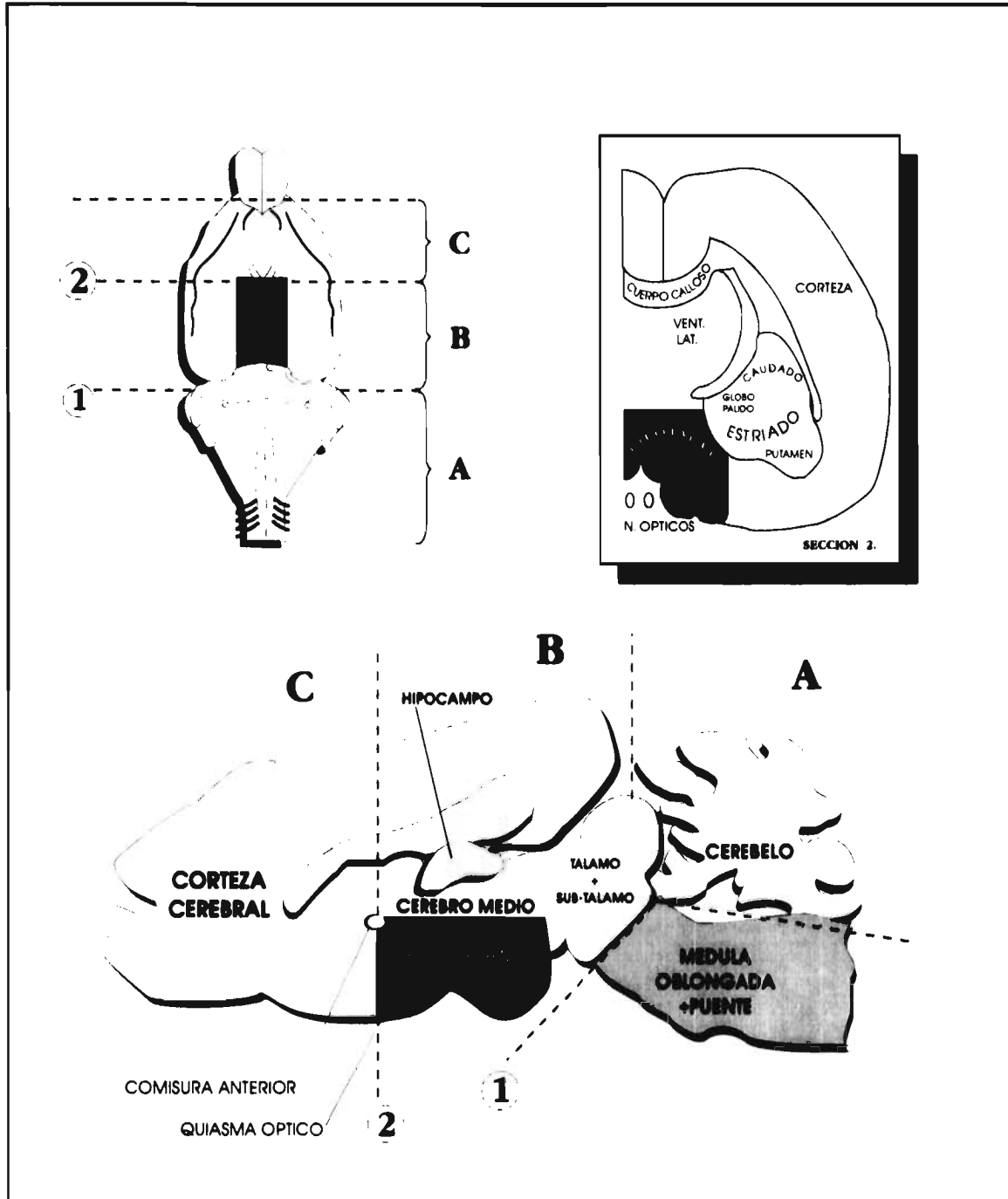


Fig. 7.6.1 Método descrito por Glowinski e Iversen (1966) para efectuar la disección de estructuras cerebrales. Los números indican los diferentes cortes que se efectúan para obtener el caudo putamen, al hipocampo y al cerebelo.

7.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Esta técnica se realizó en un cromatógrafo de líquidos Waters, constituido por un controlador automático de gradiente, dos bombas modelo 510, un inyector automático modelo Wisp 712, un detector de fluorescencia modelo 420 y un integrador modelo 745 B.

La detección se realizó a una longitud de onda de excitación de 254 nm y de emisión de 313 nm. Con una lámpara G4T5 de Hg.

7.6.3 Condiciones cromatográficas: Se utilizó una columna C-18 Nova-pack (Waters), de 3.9 X 150 mm. Para llevar a cabo la separación de los aminoácidos se probaron diferentes tipos de gradientes con el propósito de obtener la separación idónea de los estándares y las muestras, finalmente se decidió por el sistema que se muestra en la tabla, ya que además de separar a los aminoácidos permite eluirlos a tiempos muy cercanos. Para este sistema se utilizaron como disolventes la solución A: acetato de sodio 0.05M pH 3.6 y B: acetonitrilo grado HPLC

7.6.4 Gradiente

tiempo	Vel. de flujo	%A	%B	Curva
inicial	1.5	85	15	*
30 min	1.5	10	90	6
32	1.5	10	90	6
34	1.5	85	15	6

Todas las determinaciones cromatográficas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

7.6.5 Curva Patrón. Las curvas patrón de los aminoácidos fueron preparadas desde 1.33 hasta 21.33 ng/inyección. Estas se colocaron al inicio y al final de cada corrida. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

7.6.6 Reacción de derivatización con 9-fluoronilmetil cloroformato (FMOC).

Se tomó una alícuota de la curva patrón o del sobrenadante de cada una de las estructuras, para efectuar la reacción de derivatización. Esta se llevó a cabo en un vial en donde se colocó la alícuota en 0.025M de borato de sodio hasta ajustar un volumen de 1.1 ml, 1 ml de acetona y 100 microlitros de una solución de FMOC 0.01M en acetona. Se agitó la muestra y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de una mezcla hexano:acetato de etilo (1:1), se agitó nuevamente y se colocó el vial en el carrusel del inyector. El cálculo de la concentración de aminoácidos de cada muestra se realizó a partir de la altura de los picos y se comparó con los valores de la curva patrón.

Análisis Estadístico. Se utilizó la prueba de análisis de varianza y cuando resultó significativa se aplicó la prueba de la diferencia significativa mínima protegida.

La Fig. 7.6.2 Muestra el esquema que resume la metodología utilizada para la cuantificación de los aminoácidos: arginina, citrulina y ácido glutámico.

Cuantificación de aminoácidos

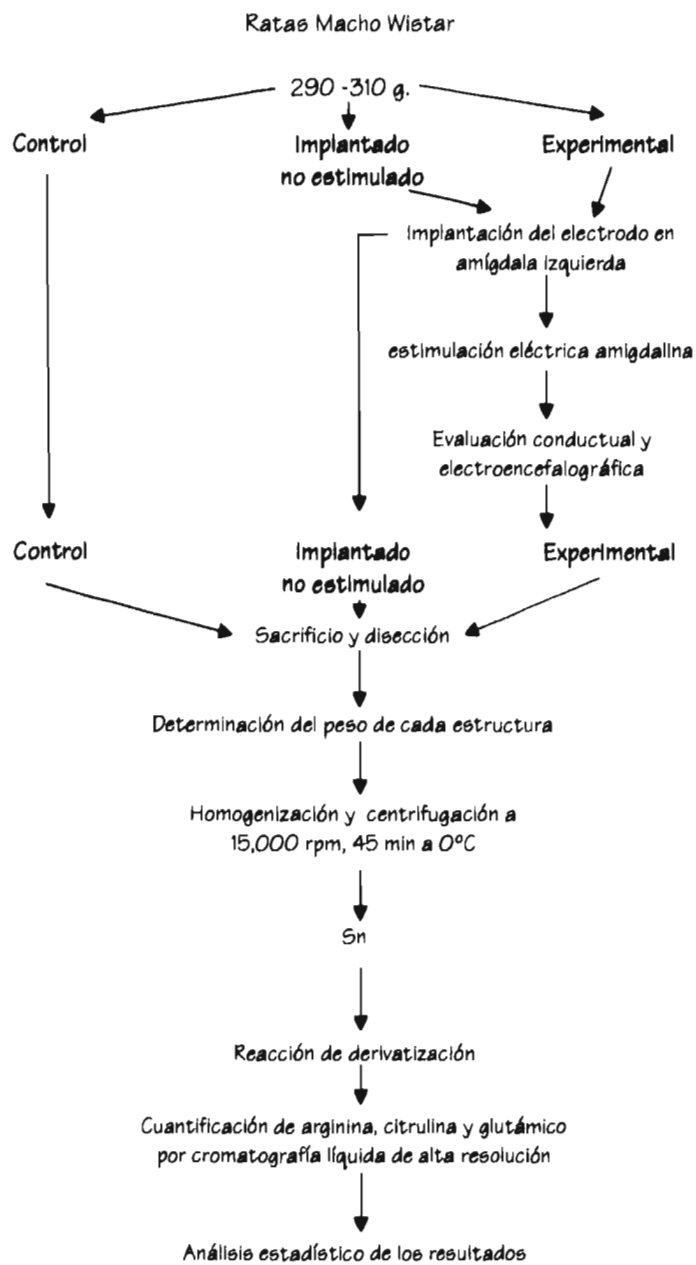


Fig. 7.6.2 Método seguido en la cuantificación de aminoácidos.

8. RESULTADOS

Los resultados serán descritos en el siguiente orden: primero, los correspondientes al *kindling* teniendo en cuenta los parámetros relativos a la frecuencia y duración de las posdescargas y los diferentes estadios conductuales; segundo, los relacionados con el estudio histoquímico sobre la densidad de las células NADPH-d reactivas; tercero, se mostrarán los resultados de la cuantificación, por HPLC, de las concentraciones de arginina, citrulina y el ácido glutámico en los grupos control, implantado no estimulado y *kindling*.

8.1 *Kindling* eléctrico amigdalino. La estimulación que se consideró umbral de la activación amigdalina, estuvo caracterizada por una pequeña posdescarga con duración de 5 a 7 segundos. Estas posdescargas se acompañaron inicialmente por conductas como cierre del ojo ipsilateral, inmovilidad al momento de la estimulación o bien por un reflejo de orientación, así como por olfateo. La alteración en el comportamiento, aunado a la aparición de la posdescarga, nos permitió asegurar que la estimulación eléctrica era efectiva y éste fue el criterio inicial para valorar las estimulaciones subsecuentes y su evolución temporal. Una vez determinado el umbral a la posdescarga, se valoraron durante cada estimulación amigdalina la evolución de los patrones conductuales, así como la duración y la frecuencia de la posdescarga.

En la Fig. 8.1.1 están graficados los valores de la frecuencia y la duración de las posdescargas, así como los estadios conductuales que presentaron los animales en cada estimulación. Se puede observar que a lo largo de las estimulaciones (k1 a k20),

las ratas presentaron conductas que fueron evolucionando en la escala de Racine hasta alcanzar la fase 5, que corresponde a crisis convulsivas generalizadas. Así mismo, la duración y la frecuencia de las posdescargas se incrementó. En la figura 8.1.2 se muestran registros de la posdescarga correspondientes a las estimulaciones k1, K5, y K15 con el propósito de ilustrar cómo este patrón electroencefalográfico característico de las crisis va haciéndose de mayor duración. De la misma manera, las espigas que la constituyen son de mayor voltaje y frecuencia. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores (Racine 1972) y por nosotros en trabajos previos (Talavera et al. 1989; Hernández y Condés 1989, 1992)

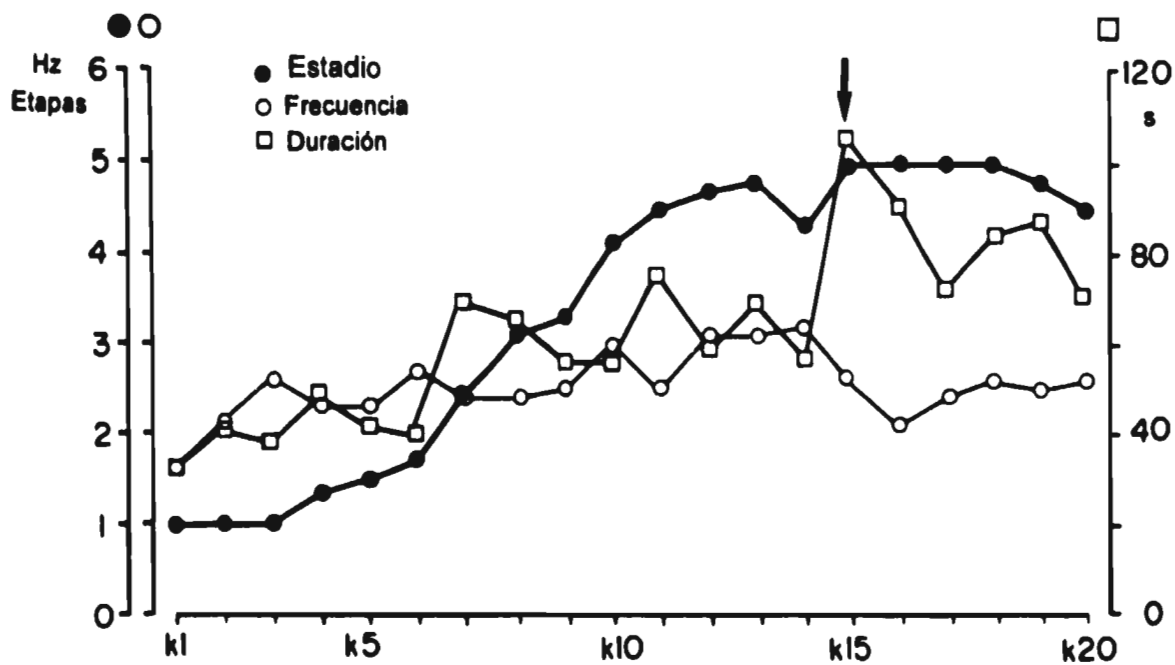


Fig 8.1.1 Desarrollo de los estadios conductuales y de la posdescarga durante la evolución del *kindling*. Se puede observar que a lo largo de las estimulaciones, los estadios presentados por el grupo *kindling* son de mayor valor en la escala de Racine. Así mismo la duración y la frecuencia de la posdescarga van en aumento.

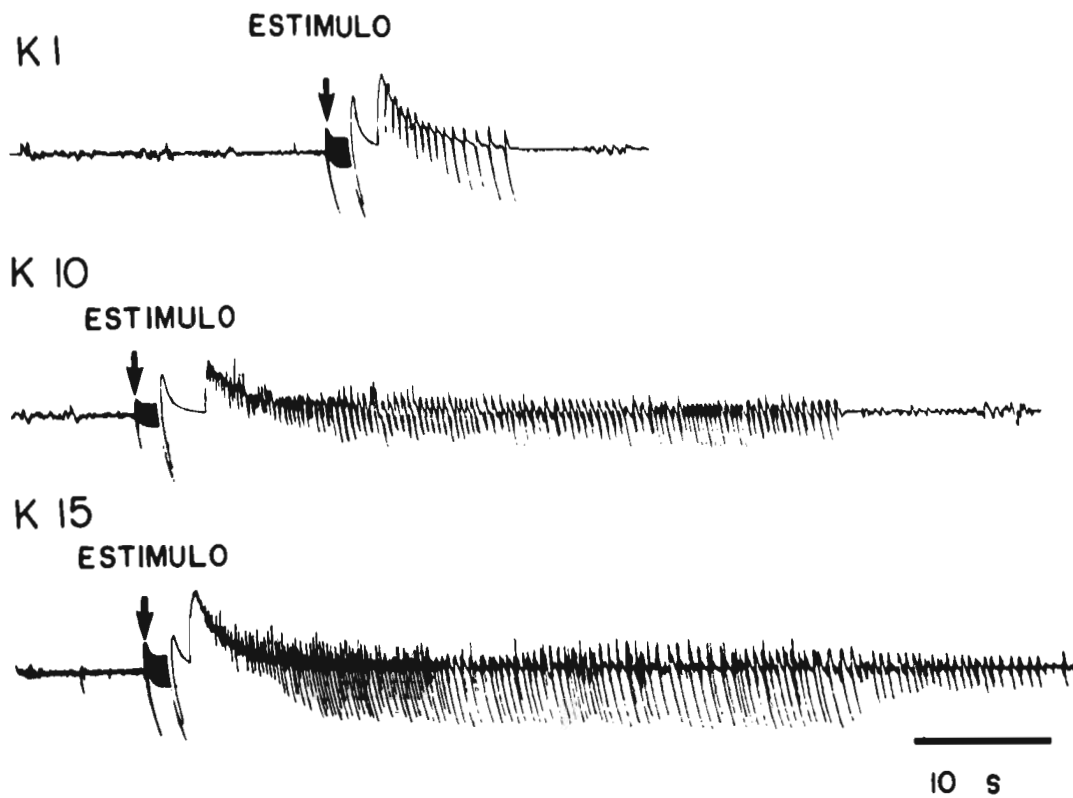


Fig 8.1.2 Registro de la posdescarga producida en las estimulaciones K1, K10 y K15. Observe como la duración de la posdescarga y la frecuencia de las espigas que la constituyen es mayor conforme se va desarrollando el *kindling*.

8.2 Reacción Histoquímica de la NADPH-diaforasa

- Características histológicas.

Las células NADPH-d reactivas tienen características muy diversas en cuanto a su morfología, distribución, tamaño y grado de tinción. Esta técnica histoquímica tiñe a las células en forma similar a la técnica de Golgi. Al analizar los cortes histológicos encontramos células con diferentes grados de tinción. Las células oscuras presentaron tinción tipo Golgi con el soma, los procesos dendríticos y los axones intensamente teñidos pero no el núcleo. Las células claras presentan una tinción débil. De acuerdo a esta clasificación encontramos que las células claras y oscuras presentan una distribución característica en cada una de las estructuras estudiadas.

Para poder llevar a cabo el análisis de éstas células, se determinó la diferencia en la intensidad de la tinción de las células claras y oscuras valorando los diferentes grados de gris por el método de densitometría por análisis de imágenes. Los resultados de este análisis mostraron que las poblaciones celulares tienen diferentes grados de tinción. En la figura 8.2.1 se encuentra el histograma de las diferentes intensidades de las células NADPH-d reactivas que se detectaron por este método. El nivel de gris promedio para las células oscuras fue de 32.22 ± 1.07 y para las células claras es de 86.12 ± 2.28 . Al comparar ambas poblaciones mediante un análisis de varianzase encontró que estas son diferentes ya que se obtuvo una $F=355.56$ y una probabilidad de 2.4×10^{-35} .

Nivel de gris de las neuronas NADPH-reactivas

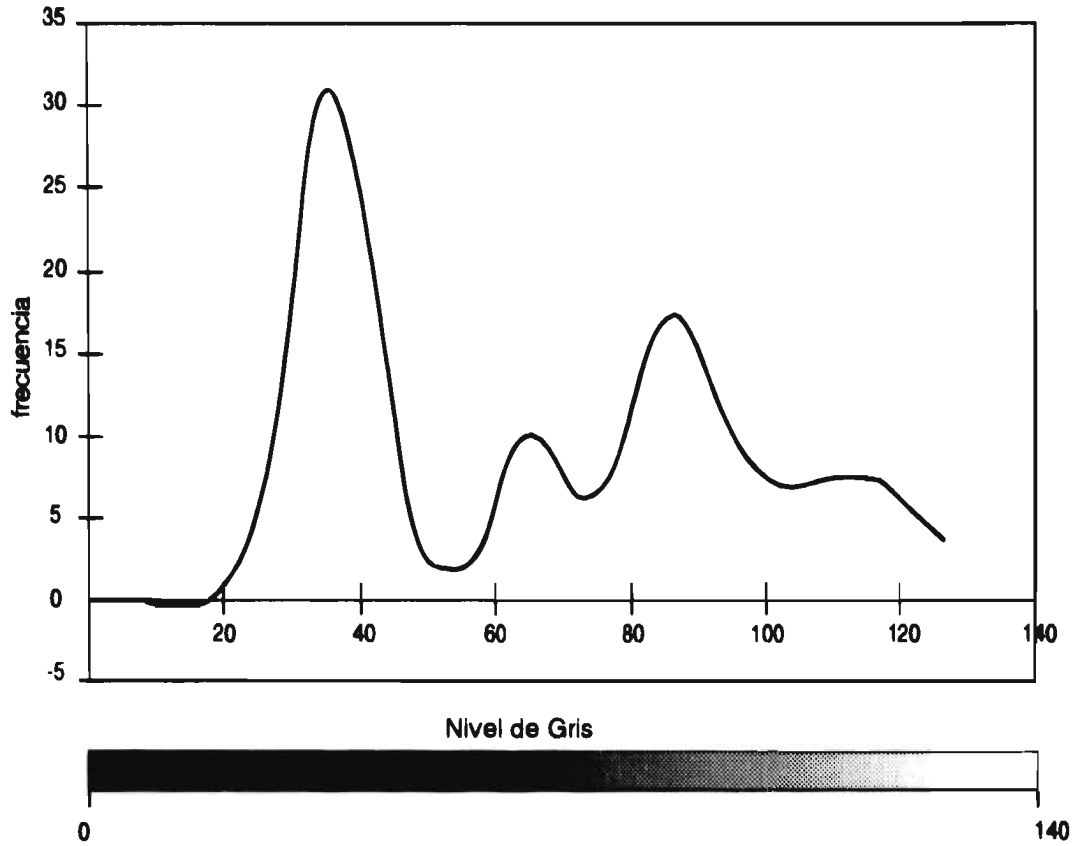


Fig. 8.2.1 Diferentes niveles de gris de las neuronas NADPH-d reactivas, como se puede observar la tinción de estas neuronas tiene una amplia gama de intensidades, las cuales se agrupan en tres poblaciones el primer pico de la gráfica corresponde al de las células oscuras y los otros dos a las células claras.

En el hipocampo encontramos que las neuronas con tinción clara fueron las más abundantes y se localizaron principalmente en el Cuerno de Ammon en los subcampos CA1, CA2, CA3 y CA4, en subiculum, así como en el giro dentado. En esta última región se observó una distribución particular debido a que varias de las células se encontraron alineadas en el área hilar. La figura 8.2.2 muestra una microfotografía de hipocampo (Hip) en donde se observa este patrón de distribución característico de las células NADPH-d reactivas. El tamaño de estas células es de $15.82 \pm 0.6 \mu\text{m}$. El número de células claras teñidas se incrementó en las ratas *kindling*.

Las neuronas oscuras del hipocampo se localizaron principalmente en stratum oriens, subiculum y fimbria, pero su población es muy escasa. Su morfología fue muy variada y con una tinción tipo Golgi como se mencionó anteriormente; además fueron de mayor tamaño que las células claras y su diámetro es de $24.35 \pm 1.25 \mu\text{m}$.

En el caudo putamen la mayoría de las células presentaron una tinción oscura en condiciones control (Fig. 8.2.2), su morfología correspondió al tipo de neuronas espinosas y su tamaño fue de 13.59 ± 0.50 micras. En condiciones *kindling* encontramos una mayor población de células claras con un tamaño promedio de 12.00 ± 0.44 micras.

En la amígdala la población de las neuronas NADPH-d reactivas es mixta es decir, consistió de células claras y oscuras. Su morfología es del tipo piramidal y no piramidal. El tamaño de las células claras es de 14.97 ± 0.46 micras y el de las oscuras de 16.48 ± 0.49 micras (Fig. 8.2.2). También en esta estructura el número de células con tinción clara incrementa en el grupo *kindling*.

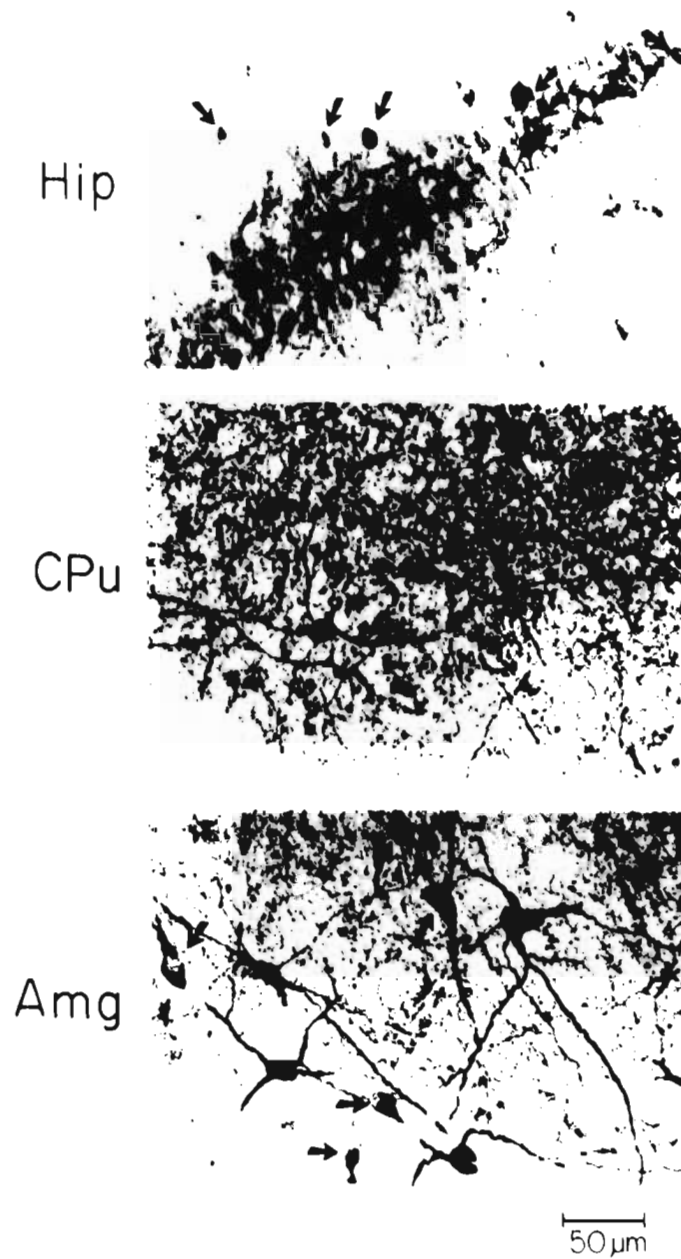


Fig. 8.2.2 Tipos de células NADPH-d reactivas con tinción clara y oscura en hipocampo (Hip), caudo putamen (CPu) y amígdala (Amg). En hipocampo se muestran las células claras alineadas en el giro dentado (↑). En el caudo putamen se muestran a las típicas células oscuras características de esta estructura y en la amígdala se pueden distinguir claramente a las células con tinción tipo Golgi, así como a las claras (↑).

8.3 Cuantificación de las células NADPH-d reactivas.

- Digitalización y análisis de imágenes.

Este método permite obtener en forma precisa la distribución de las células NADPH-d reactivas, identificar diferentes tipos de tinción y contar las células. En las figuras 8.3.1 y 8.3.2 se muestran las cartografías de los cortes coronales del hipocampo, del estriado y de la amígdala. Se puede observar, que las células NADPH-reactivas, se encuentran distribuidas en toda la estructura y en el caso de los esquemas pertenecientes a los animales epileptizados, el número de células marcadas es mayor.

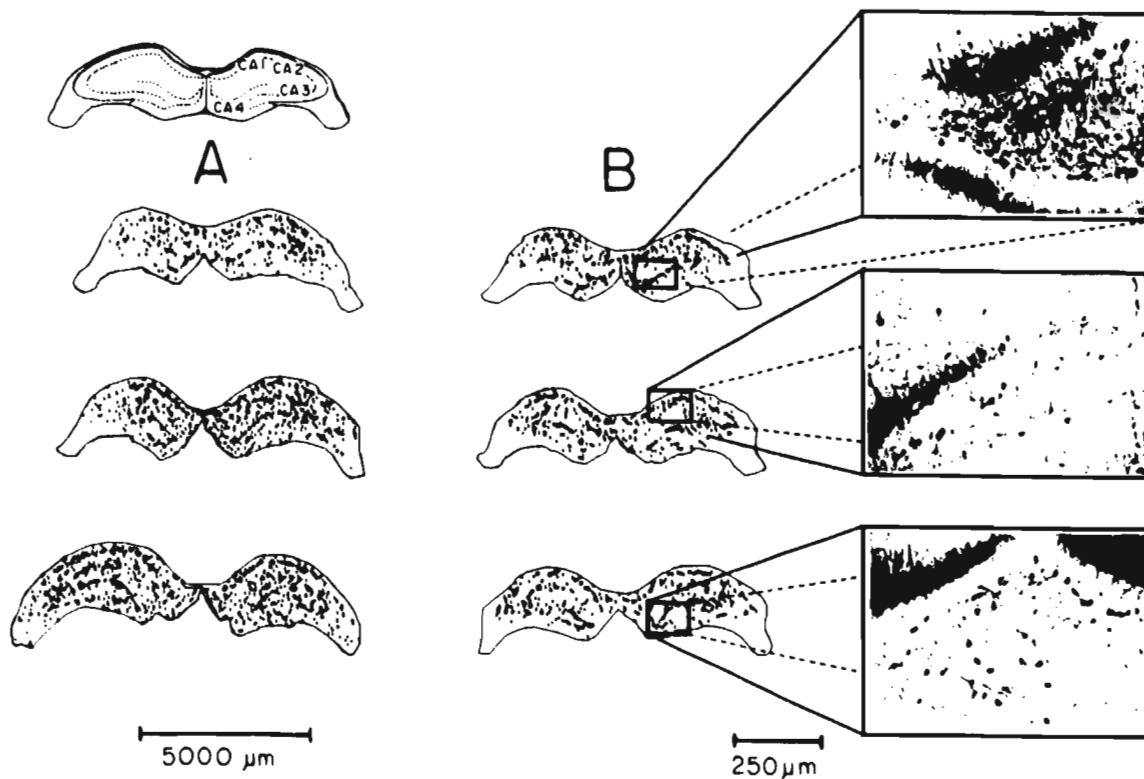


Fig. 8.3.1 Cartografías del número de células NADPH-d reactivas en el hipocampo en ratas *kindling* (A) y control (B). Se puede apreciar el incremento en el número de células marcadas correspondientes al grupo *kindling*. En el recuadro se muestran las microfotografías del área señalada en el esquema. En la primera y en la última se muestra al giro dentado, donde las células diaforásicas se alinean en toda su extensión. El recuadro central corresponde al sub-campo CA1.

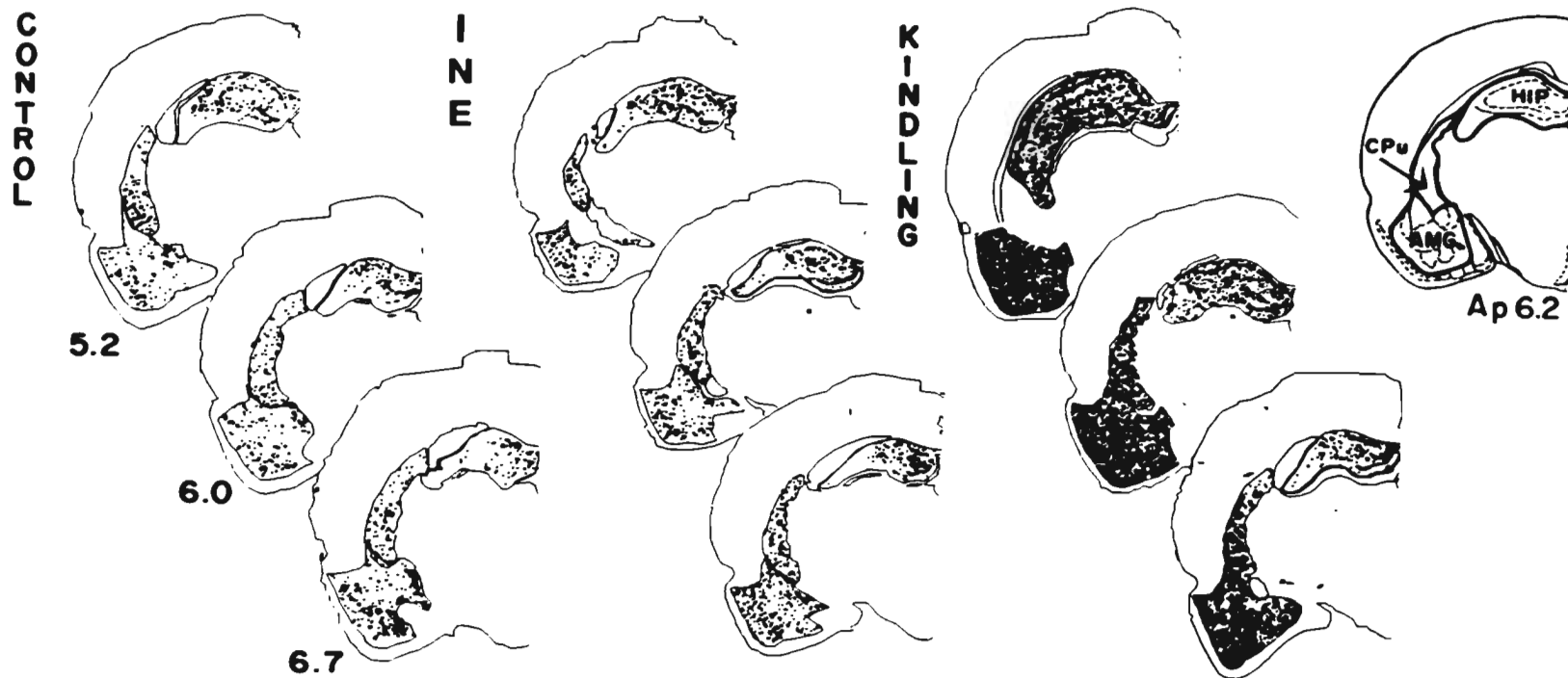


Fig 8.3.2 Cartografías de cortes coronales a diferentes planos anteroposteriores (5.2, 6.0, 6.7) en los que se muestran las células marcadas en el hipocampo (HIP), la amígdala (AMG) y en el caudo putamen (CPu). Esta figura ilustra el incremento en el número de células que se encontró en el grupo kindling, también se puede apreciar un ligero incremento en el grupo implantado no estimulado con respecto al control.

En la tabla IV se describen los resultados obtenidos del número promedio de células/mm² NADPH-d reactivas claras y oscuras, en los grupos control, implantado no estimulado y *kindling*. En las siguientes páginas se hace referencia a los principales resultados descritos en esta tabla.

Tabla IV Densidad de Células NADPH-d reactivas				
Tipo de Tinción	Hipocampo			
	claras		oscuras	
grupo				
1 C	25.44 ± 1.05		0.222 ± 0.546	
2 INE	32.94 ± 1.57 ^a		0.447 ± 0.044	
3 K	51.91 ± 4.88 ^b		0.180 ± 0.055	
	F=17.34	p< 0.000	F=0.167	n.s.
Amígdala derecha				
grupo				
1 C	18.80 ± 1.43		8.84 ± 0.62	
2 INE	31.51 ± 4.14 ^a		10.57 ± 1.87	
3 K	138.94 ± 32.23 ^b		7.78 ± 0.49	
	F=10.79	p< 0.0002	F=1.85	p< 0.1679
Amígdala izquierda				
grupo				
1 C	20.66 ± 2.24		8.14 ± 0.33	
2 INE	34.08 ± 6.92 ^a		9.42 ± 0.21 ^a	
3 K	116.65 ± 26.03 ^b		6.93 ± 0.30 ^b	
	F=9.7	p< 0.0003	F=6.31	p< 0.0038
Cauda Putamen				
grupo				
1 C	3.19 ± 0.54		33.54 ± 2.23	
2 INE	9.42 ± 2.19		36.31 ± 2.73	
3 K	23.54 ± 6.55 ^b		32.28 ± 2.93	
	F= 6.709	p< 0.0032	F=0.7485	p < 0.7485

Los valores representan la media ± error estándar. C=control, INE=implantado no estimulado, k=*kindling*. La prueba estadística que se utilizó para comparar los grupos fue la de Análisis de Varianza, los valores F y P son el resultado de este análisis. Las letras indican las comparaciones entre los grupos que resultaron estadísticamente significativas en la prueba Post Hot de la diferencia significativa mínima: a = 2 con 3, b = 1 con 3.

Los resultados descritos en la tabla anterior muestran que la densidad de las células claras es mayor que el de las células oscuras en casi todas las áreas a excepción del caudo putamen. Si se representa en porcentaje la cantidad de las células oscuras tenemos que en el hipocampo es solamente el 1% de la población total de las células NADPH-d reactivas, en la amígdala derecha el 32%, en la amígdala izquierda el 28% y en el caudo putamen son el tipo de células más abundante con un 91%.

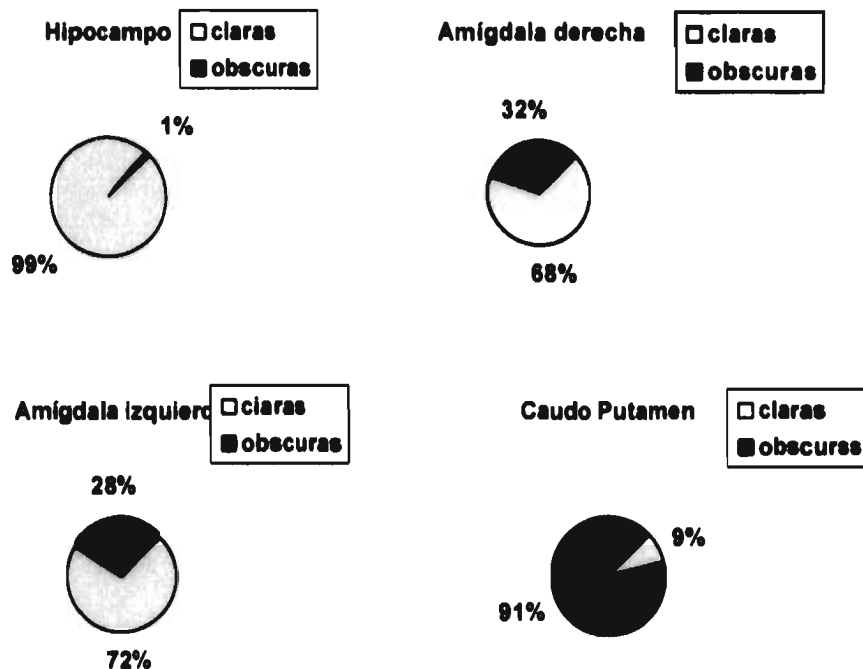


Fig. 8.3.3 Porcentajes de la densidad de las células claras y oscuras tomando como 100% el número total de células/mm² de los grupos control e implantado no estimulado. Note las diferencias en la cantidad porcentual de células en cada estructura (Las cantidades se encuentran en la tabla IV).

Al comparar los grupos control y el implantado no estimulado descritos en la tabla IV se observa un incremento en el número de células/mm² que expresan concentraciones detectables de SON en el grupo implantado no estimulado, pero este cambio no es estadísticamente significativo.

La densidad de las células claras del grupo *kindling* se incrementa significativamente, en todas las estructuras en comparación con los grupos control y el implantado no estimulado. La única excepción es el caudo putamen en donde solamente se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el *kindling* y no entre el grupo implantado no estimulado y el *kindling* (Ver Fig. 8.3.4.).

La densidad de las células oscuras es igual para los grupos control y el implantado no estimulado en hipocampo, amígdala derecha y caudo putamen. En amígdala izquierda se produce un descenso significativo al comparar el grupo *kindling* con el control y con el implantado no estimulado.

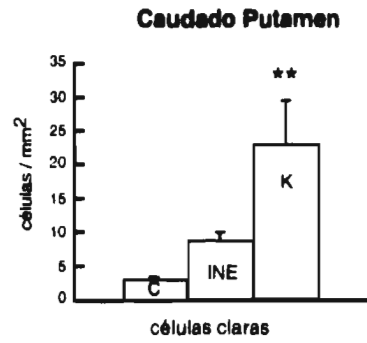
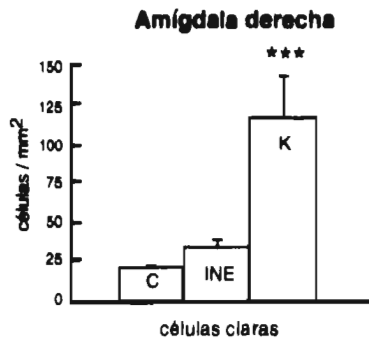
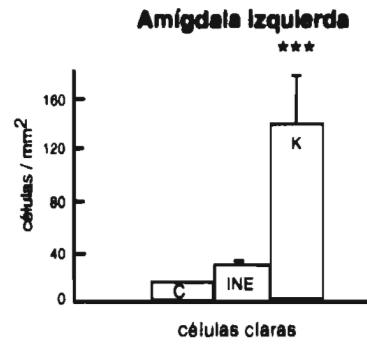
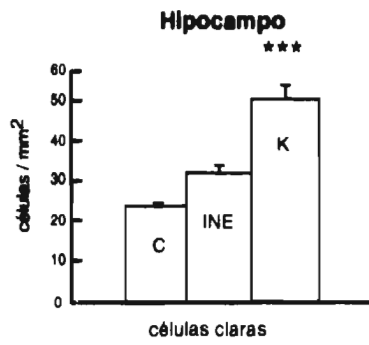


Fig. 8.3.4. Diferencias en la densidad de células claras entre los grupos control (C), implantado no estimulado(INE) y kindling (K) en las estructuras cerebrales analizadas. *** $p < 0.002$; ** $p < 0.0032$.

8.4 Cuantificación de la arginina, la citrulina y el ácido glutámico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

A partir de la disección del estriado, la amígdala, el hipocampo y el cerebelo, se determinaron las concentraciones de arginina, citrulina y glutámico, en las estructuras cerebrales de los animales control, implantados no estimulados y en los que presentaron al menos 10 crisis convulsivas generalizadas, es decir los animales del grupo kindling.

Después de estandarizar y establecer curvas patrón para cada una de las sustancias en estudio, se procedió al análisis de las estructuras cerebrales. En la Fig. 8.4.1 se muestra un cromatograma en el que se puede observar la detección y separación de muestras con diferente concentración de estándares de aminoácidos derivatizados. La separación se logró con el sistema de gradiente elegido después de haber realizado diferentes pruebas en la mezcla de solventes, en la velocidad de flujo de las fases y en el tiempo de la corrida (ver material y métodos). Los tiempos de retención promedio dado en minutos para cada uno de los aminoácidos fueron los siguientes: arginina 9.42 ± 0.04 ; citrulina 9.74 ± 0.03 ; glutámico 10.38 ± 0.04 . Los valores obtenidos para las muestras están dentro de este rango.

El sistema de análisis proporciona datos relativos en cuanto al porcentaje de la altura de cada pico, los tiempos de retención para cada compuesto y la altura de cada pico proporcional a la concentración de cada aminoácido, estos dos últimos valores fueron los que se tomaron en consideración en nuestro estudio.

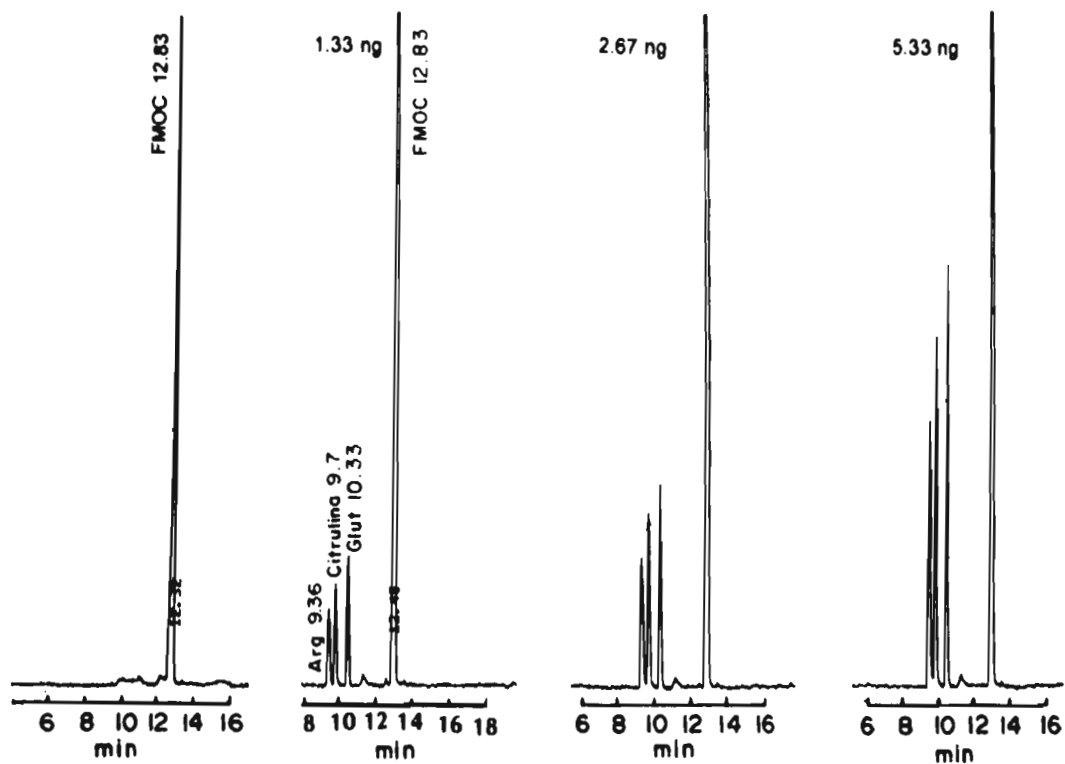


Fig 8.4.1 Cromatogramas de arginina, citrulina y glutámico derivatizados con FMOc. Se muestran los cromatogramas con diferentes concentraciones de los aminoácidos así como los tiempos de retención obtenidos para cada uno de ellos, incluyendo al agente derivatizante FMOc. El primero corresponde a una muestra blanco y los demás a diferentes concentraciones (1.33, 2.67, 5.33 ng) de los estándares en 10 microlitros de inyección.

En la figura 8.4.2. se comparan los siguientes cromatogramas: muestra blanco; muestra de los estándares de los aminoácidos derivatizados a concentración de 5.33 ng/muestra, y los cromatogramas de los aminoácidos derivatizados en muestras de las estructuras: estriado; amígdala; hipocampo y cerebelo. Note las variaciones en las alturas de los picos correspondientes a cada aminoácido para cada estructura y su elución a los tiempos de retención propios de cada aminoácido.

Una vez obtenidos los cromatogramas de la curva patrón y de las muestras, se efectuó un análisis de correlación lineal para determinar la pendiente, la correlación y la intercepción con el origen de cada una de las curvas. Para cada ensayo se analizó cada una de las muestras por duplicado junto con dos curvas patrón una al inicio del análisis y otra la final. Con base en los resultados obtenidos para la curva estandar se determinó la concentración de cada muestra en $\mu\text{Moles/gramo}$ de peso húmedo. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba estadística de análisis de varianza.

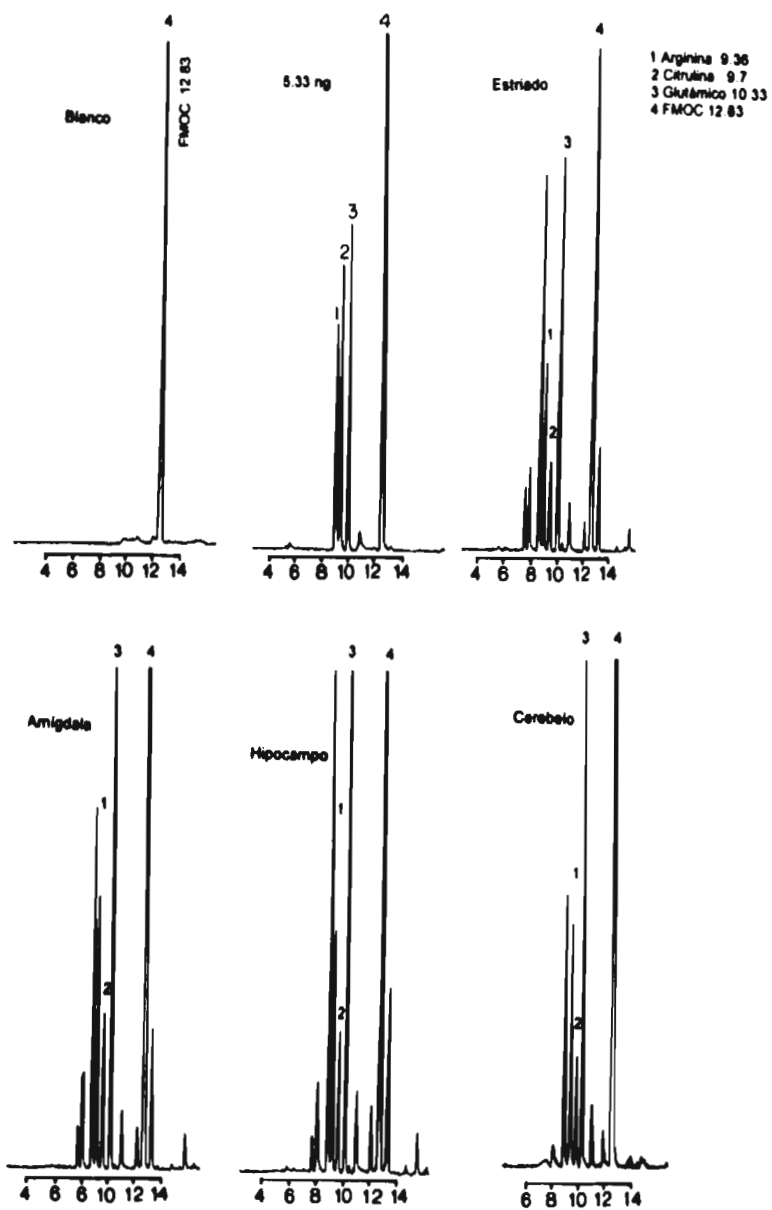


Fig. 8.4.2 Cromatogramas de las estructuras analizadas, así como de una muestra blanco y otra de los estándares. Los números localizados en la parte superior de cada pico indican el tiempo de retención para cada uno de los aminoácidos derivatizados así como para el Fmoc.

En la tabla V se reúnen los resultados obtenidos de la cuantificación de los aminoácidos analizados en el caudo putamen, la amígdala, el hipocampo y el cerebelo.

Tabla V Concentración de Arginina, Citrulina y Glutámico en Cerebro de Rata ($\mu\text{M/g}$)			
caudo putamen			
Grupo	arginina	citrulina	glutámico
1 C	3.84 \pm 0.27	1.45 \pm 0.11	6.09 \pm 0.28
2 INE	4.00 \pm 0.14	1.27 \pm 0.16	6.26 \pm 0.22
3 K	4.45 \pm 0.38	1.42 \pm 0.17	6.62 \pm 0.42
	F=1.15 p<0.38	F=0.39 p<0.676	F=0.509 p<0.509
amígdala			
1 C	3.97 \pm 0.28	1.57 \pm 0.11	6.52 \pm 0.42
2 INE	4.44 \pm 0.35	1.79 \pm 0.11 ^b	7.38 \pm 0.51 ^b
3 K	5.17 \pm 0.38 ^a	2.24 \pm 0.16 ^a	9.36 \pm 0.52 ^a
	F=3.29 p<0.049	F=6.29 p<0.004	F=9.32 p<0.0006
hipocampo			
1 C	3.19 \pm 0.07	1.46 \pm 0.05	6.29 \pm 0.24
2 INE	3.64 \pm 0.18	1.49 \pm 0.08	7.04 \pm 0.42
3 K	4.08 \pm 0.21 ^a	1.58 \pm 0.10	7.64 \pm 0.37 ^a
	F=7.84 p<0.001	F=0.52 p<0.598	F=4.19 p<0.023
cerebelo			
1 C	4.40 \pm 0.27	1.54 \pm 0.12	6.89 \pm 0.47
2 INE	3.86 \pm 0.25	1.53 \pm 0.15	6.79 \pm 0.58
3 K	4.56 \pm 0.24	1.46 \pm 0.13	6.70 \pm 0.442
	F=1.65 p<0.204	F=0.09 p<0.907	F=0.04 p<0.960
Los valores representan la media \pm error estándar. F y P corresponden a los resultados del análisis de varianza. Las letras indican las comparaciones entre la media de los grupos a= (1-3), b (2-3). No. promedio de animales por grupo: control (12), implantado no estimulado (8), <i>kindling</i> (7).			

En la tabla anterior se puede observar que en estriado y en cerebelo no hay cambios en la concentración de ninguno de los aminoácidos cuantificados. En cambio en la amígdala la concentración de la arginina, la citrulina y el glutámico, se incrementa en el grupo *kindling* con respecto a los valores control y en algunos casos con el grupo implantado no estimulado. Estos cambios se ilustran en la figura 8.4.3.

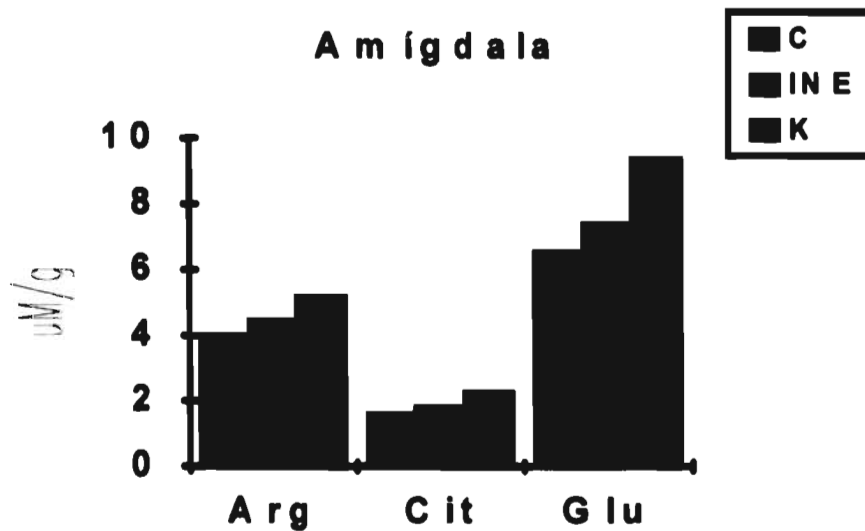


Fig. 8.4.3 Concentración de aminoácidos en la amígdala en los grupos control, implantado no estimulado y *kindling*. Observe como en los grupos INE (implantado no estimulado) hay un ligero incremento en la concentración del aminoácido correspondiente el cual no llega a ser significativamente diferente al control. Sin embargo, el grupo *kindling* presenta un incremento en la concentración de los tres aminoácidos estadísticamente significativo. * $p < 0.049$, ** $p < 0.004$, *** $p < 0.000$. Se omiten los errores estándar porque son muy pequeños.

En el caso del hipocampo encontramos, al efectuar el análisis de varianza, que la concentración de arginina y glutámico se incrementa significativamente en el grupo *kindling* con respecto al control. Sin embargo, la concentración de citrulina no se modifica. (Fig. 8.4.4)

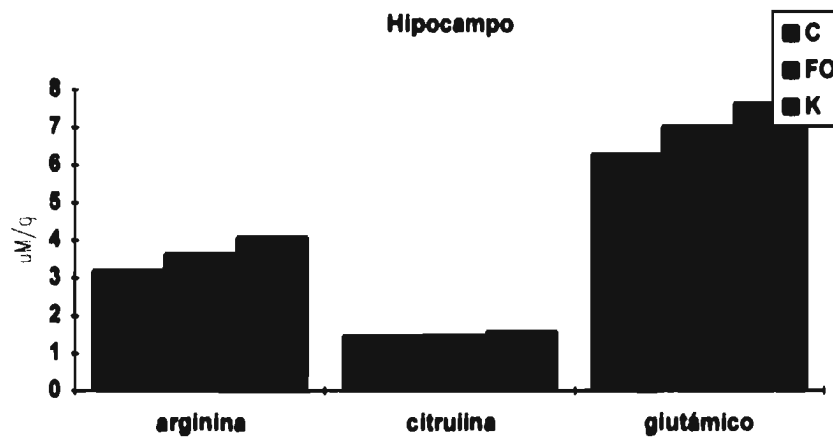


Fig. 8.4.4 Concentración de los aminoácidos en el hipocampo de los grupos control (C), implantado no estimulado (INE) y *kindling* (K). Observe el incremento significativo en la concentración de arginina y glutámico para el grupo *kindling*. En cambio la concentración de citrulina no se modifica. ** $p < 0.001$ *** $p < 0.023$.

9. DISCUSION

En este estudio se seleccionó al *kindling* eléctrico amigdalino ya que su desarrollo gradual y progresivo permite determinar los cambios conductuales, electroencefalográficos, bioquímicos e histológicos que acompañan a la evolución del proceso epiléptico, lo cual ha sido mostrado por diversos trabajos en la literatura (McNamara 1994; Snead 1983; Kalichman 1982).

Si bien, este modelo tiene la ventaja de caracterizar epilepsias parciales y generalizadas, o bien el proceso de su desarrollo, para este estudio se eligieron animales que presentaron por lo menos 10 crisis convulsivas generalizadas, ya que consideramos importante analizar la participación del óxido nítrico en la epilepsia cuando el modelo estuviera establecido.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar el número de células que contienen cantidades detectables de SON, por lo que se utilizó la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa que detecta a la sintetasa del óxido nítrico debido a que aprovecha su capacidad reductora sobre el azul de nitrotetrazolio, este colorante al precipitarse revela el sitio en donde se localiza a la enzima. Sin embargo, esta técnica no detecta la actividad de la SON, ya que la acción oxidante de esta enzima, que se requiere para sintetizar al óxido nítrico, se pierde cuando se expone el tejido durante la perfusión al paraformaldehído al 4%. De esta manera los resultados histológicos obtenidos indican únicamente la presencia de la SON en las neuronas NADPH-reactivas (Norris et al. 1995) y no dan información sobre la actividad de la enzima.

Se utilizó el método de análisis de imágenes para determinar en forma precisa, la cantidad y la densidad de neuronas reactivas sin olvidar las limitaciones que tienen las técnicas histológicas, que sin embargo son las únicas que muestran los diferentes tipos de células y permiten realizar estudios en los que se comparan características morfológicas y citoquímicas.

El método de análisis de imágenes nos proporcionó varias ventajas: a) demostrar que, por la intensidad de su tinción las células oscuras y claras corresponden a dos poblaciones celulares diferentes, esto se determinó mediante el análisis de los niveles de gris con una resolución de 1/256 y las diferencias en tamaño de los grupos celulares, b) marcar cada célula que se contó y clasificarla de acuerdo a la intensidad de su tinción, c) realizar el conteo de las células en diferentes planos anteroposteriores para detectar diferencias en toda la estructura y no sólo en un corte; y d) cuantificar la densidad celular de los dos tipos de neuronas reactivas. Por lo que los datos aportados en este estudio sobre la densidad de neuronas que presentaron tinción oscura o clara, tienen la característica de describir toda una región en diferentes planos anteroposteriores y no hacer la descripción parcial del fenómeno, como lo hacen otros autores al reportar el conteo realizado en un corte (Stringer y Erden, 1995).

El análisis estadístico de los resultados histológicos mostró que el kindling produce modificaciones en el número de células NADPH-reactivas, las células con tinción clara incrementan y las células oscuras no se modifican, a excepción de la

amígdala izquierda donde se produce un descenso. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por el grupo de Al Ghouli et al. (1995), quienes utilizaron también el modelo del *kindling* amigdalino y determinaron las diferencias entre los grupos experimentales por análisis de imágenes. Sus resultados muestran que se produce un incremento en el número y en la intensidad de las células NADPH-d reactivas en los núcleos supraópticos, núcleos laterales del tracto olfatorio y en algunos núcleos amigdalinos, en animales que presentaron al menos 5 crisis convulsivas generalizadas y fueron sacrificados un mes después de la última crisis. Estos autores señalan que los cambios son relativamente permanentes ya que las ratas fueron sacrificadas un mes después de la última crisis y mostraron los incrementos señalados. Los resultados de estos autores y los nuestros son similares en el sentido de que se encuentra incremento en el número de células totales, aunque nuestros resultados dan además evidencia de cambios en el número de células de acuerdo a su tipo de tinción en varias estructuras.

En el hipocampo se han realizado determinaciones del número de células NADPH-d reactivas pero con otros modelos de epilepsia; el grupo de Miettinen et al. (1995) utilizó la inyección de ácido kaínico (9 mg/kg) y encontró que en el hilus y en el área CA1 se produce una disminución del número de células marcadas, no siendo así para las otras áreas del hipocampo. Stringer y Erden (1995) utilizaron la activación máxima del giro dentado para producir la epileptogénesis en el hipocampo, pero efectuaron el conteo de las células con un método no automatizado y el análisis lo

realizaron sólo en algunos cortes. Ellos encontraron un descenso en el número de células en el área hilar únicamente 1 hora después de la estimulación 16.

Las diferencias en los resultados de estos dos grupos y los nuestros pueden deberse a varios factores: a) el modelo de epilepsia experimental es diferente 2) el análisis cuantitativo de las células, sobre todo del grupo de Stringer y Erden (1995), no es preciso 3) Las áreas del hipocampo analizadas son diferentes, nosotros analizamos todo el hipocampo dorsal.

Se ha propuesto que el incremento o el descenso en la expresión de la sintetasa del óxido nítrico determinado mediante alguna o algunas de las técnicas: histoquímica, inmunohistoquímica o de hibridación "*in situ*" es un mecanismo regulatorio de la producción de ON como se determinó en médula espinal y en diferentes áreas cerebrales en procesos de daño celular (Wu 1994). Otros factores también pueden regular la expresión de SON; se ha detectado incremento en el RNAm en respuesta al estrés, a la lactancia así como al embarazo (Hökfelt et al. 1994; Weiner et al. 1994). Nuestros resultados muestran que en el kindling se induce un incremento en el número de células que contienen cantidades detectables de SON.

Nuestros resultados señalan el posible papel diferencial que tienen tanto las células claras como las células oscuras, lo cual puede estar relacionado con el tipo de neurotransmisor que contienen ya que hay evidencias sobre la colocalización de las células NADPH-d reactivas con la somatostatina y el neuropéptido Y en el caudo putámen, la amígdala y el hipocampo (Vincent y Kimura et al. 1992; Mc Donald et al 1993). En el caudo putámen estas células tienen un metabolismo especial que las hace

resistentes al daño celular producido en la enfermedad de Huntington (Ferrante et al. 1985) el cual ha sido asociado con la sobreproducción de ON que en este caso actúa como un neuroprotector.

El segundo objetivo de esta tesis fué determinar si la concentración del precursor del óxido nítrico, la L-arginina, así como su coproducto de reacción la citrulina se modifican en el *kindling*. También se determinó la concentración del ácido glutámico que nos sirvió como una referencia de los valores encontrados por otros autores en las estructuras analizadas (Whetherell et al. 1989; Kaura et al. 1995; Chapman et al. 1988; Hikal 1988). Ya que para la arginina y la citrulina no se han reportado sus concentraciones en las estructuras cerebrales que analizamos.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que, en la amígdala la vía de síntesis del óxido nítrico está modificada ya que al comparar el grupo *kindling* con el control y el implantado no estimulado se observó un incremento significativo en la concentración del precursor arginina, la SON se detecta en un mayor número de células y la concentración de citrulina también está aumentada. Además, como se reportó previamente la concentración del ácido glutámico se incrementa en esta estructura en el *kindling*. Estos resultados sugieren que en la amígdala el mecanismo de síntesis es activado, probablemente a través de la activación del receptor NMDA por el ácido glutámico cuyas concentraciones tisulares están aumentadas. (Garthwaite, et al. 1989, Kiedrowski et al. 1992). Este resultado concuerda con el incremento del ácido glutámico en la amígdala que se reporta en el presente estudio.

En el caso del hipocampo esto sucede de manera parcial ya que al comparar los grupos experimentales, el grupo *kindling* mostró: 1) incremento en la concentración de la arginina, 2) mayor número de células en las que se detecta la presencia de la sintetasa del óxido nítrico, 3) concentración del glutámico aumentada y 4) la concentración de citrulina no se modifica. Esta falta de correlación entre el incremento en la SON detectada, aunado a valores normales de citrulina pueden ser debidos a diferentes posibilidades: a) el ON puede no estar involucrado en el hipocampo en los procesos epilépticos b) la concentración de ON se encuentre en niveles normales 24 horas después de la última crisis y sólo se active durante ésta c) modificaciones en la regulación de la SON que cambien la actividad de la enzima, lo cual ha sido reportado por el grupo de Iwahashi et al. (1995) quienes encuentran que la actividad de la SON es menor en ratones epilépticos que en ratas resistentes a las crisis.

Otra evidencia es el trabajo de Rengasamy y Johns (1993) quienes demuestran que el óxido nítrico puede regular la actividad de la SON e inhibirla. Estos dos trabajos aunados a las diferentes evidencias que existen en la literatura (Wu 1994; Hökfelt et al. 1994; Weiner et al. 1994) muestran que la SON es una enzima cuya actividad puede ser modulada para sintetizar ON en diferentes condiciones fisiológicas.

Estas evidencias nos permiten suponer que, independientemente de que se produzca un incremento en la detección de SON en el *kindling* su actividad puede

ser menor o diferente en cada estructura del SNC. Por lo que es necesario determinar la actividad de dicha enzima en las diferentes estructuras analizadas.

En resumen, la cuantificación de los aminoácidos arginina y citrulina mostró un incremento significativo sólo en la amígdala, estructura que pertenecen al sistema límbico y es la más sensible para producir el *kindling* (Goddard et al. 1969). Estos resultados contrastan con los obtenidos para el hipocampo en donde se encontró solamente un efecto parcial ya que se incrementa la concentración de arginina y glutámico pero no la de citrulina.

En el estriado y en el cerebelo, no observamos ninguna modificación en la concentración de los aminoácidos estudiados. Estas dos últimas estructuras tienen una participación que generalmente ha sido reconocida como motora sin embargo, no encontramos cambios en la concentración de la arginina, la citrulina, y del glutámico lo cual sugiere que el óxido nítrico no está involucrado en los procesos epilépticos en estas estructuras aunque el componente motor en la epilepsia generalizada (10 o 15 crisis) se había considerado como importante para generar cambios.

Si bien el ON puede participar como mensajero celular en los mecanismos que se modifican en la epilepsia, no parece tener un efecto característico como el de otros neurotransmisores, por ejemplo el GABA o el ácido glutámico, sin embargo el conocer el mecanismo que utiliza para regular al receptor NMDA -como fué descrito en el capítulo de estrés oxidativo- e inhibir la entrada de calcio (Manzoni et al 1993) podría

permitir diseñar fármacos con estructuras análogas que al inactivar al receptor tuvieran un efecto inhibitor de las crisis.

CONCLUSIONES

1) En este estudio se analizó la participación del ON en la epilepsia utilizando el *kindling* eléctrico amigdalino como modelo experimental, de esta manera se valoraron los cambios conductuales, electroencefalográficos, histológicos y bioquímicos producidos por el *kindling*.

2) Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la densidad de células que contienen SON detectada por la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa es mayor en los animales *kindling*, lo cual sugiere que se produce un incremento en la concentración de la enzima. Por lo que es necesario determinar si su expresión se incrementa y evaluar si su actividad cambia en el *kindling*.

3) La ruta biosintética del óxido nítrico se activa en las estructuras del sistema límbico principalmente en la amígdala donde se produce un incremento en la concentración del precursor; arginina, en su coproducto reacción; la citrulina y en el ácido glutámico que activa la síntesis del ON, dichos cambios son producidos por el *kindling* eléctrico amigdalino. el cual es considerado como un modelo de epilepsia del lóbulo temporal.

BIBLIOGRAFIA

- ◆ Akari H., Aihara H., Watanabe S., Ohta H., Yamamoto T. and Ueki S. (1983b): The role of noradrenergic and serotonergic system in the hippocampal kindling effect. **Jpn. J. Pharmacol.** **33**: 57-64.
- ◆ Akari H., Aihara H., Watanabe S., Yamamoto T. and Ueki S. (1983a) Effects of reserpine, and alpha-methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine and 5-7-dihydroxytryptamine on the hippocampal kindling effect in rats. **Jpn. J. Pharmacol.** **33**:1177-1182.
- ◆ Al-Ghoul W.M., Meeker R.B. and Greenwood R.S. (1995): Kindling induces a long-lasting increases in brain nitric oxide synthase activity. **NeuroReport** **6**: 457-460.
- ◆ Albertson T.E., Bowyer J.F. and Paule M.G. (1982): Modification of the anticonvulsant efficacy of diazepam by Ro 15-1788 in the kindled amygdaloid seizure model. **Life Sci.** **31**: 1597-1601.
- ◆ Albright P.S., Burnhan, W.M. and Okasaki, M. (1979): Effect of atropine sulfate on amygdaloid kindling in the rat. **Exp. Neurol.** **66**: 409-412.
- ◆ Arnold P. S., Racine R. J., and Wise R.A. (1973): Effects of atropine, reserpine, 6-hydroxidopamine, and handling on seizure development in the rat. **Exp. Neurol.** **40**: 457-470.
- ◆ Ashton D., Leysen J.E. and Wauquier A: Neurotransmitters and receptor binding in amygdaloid kindled rats: Serotonergic and noradrenergic modulatory effects. **Life Sci.** **27**: 1547-1556.
- ◆ Babingtong R.G. and Wedeking P.W. (1973): The pharmacology of seizures induced by sensitization with low intensity brain stimulation. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **1**: 461-467.
- ◆ Bajorek J.G., Lee R.J. and Lomax P. (1986): **Neuropeptides: anticonvulsant and convulsant mechanisms in epleptic model systems and in humans.** In: Advance in Neurology . Delgado-Escueta, A.V., Ward A.A., Woodbury D.M. and Porter R.J. Raven Press, New York.
- ◆ Balcioglu A. and Maher T.J. (1993): Determination of kainic acid-induced release of nitric oxide using a novel hemoglobin trapping technique with microdialysis. **J. of Neurochem.** **61**: 2311-2313.
- ◆ Bieri J. G., Corash S., Van Hubbard (1983): **Science**, **308**: 1063.
- ◆ Blackwood D.H.R., Martin M.J. and Howe J. G. (1982): A study of the role of the cholinergic system in amygdaloid kindling in rats. **Psychopharmacology** **76**: 66-69.

- ◆ Bowyer J.F. (1982): Phencyclidine inhibition of the rate of development of amygdaloid kindled seizures. **Exp. Neurol.** **75**: 173-183.
- ◆ Brailowsky S., Silva-Barrat C., Naquet R. (1989): Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportaciones recientes de la investigación experimental. **Salud Mental**: **12(1)**: 53-62
- ◆ Bredt D.S. and Snyder S.H. (1989): Nitric oxide mediated glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**: 9030-9033.
- ◆ Bredt D.S. and Snyder S.H. (1990 a): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **87**:682-685.
- ◆ Bredt D.S., Hwang P.M. and Snyder S.H., (1990 b): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature** **347**: 768-770.
- ◆ Buisson A., Lakhmeche N., Verrecchia C., Plotkine M and Boulu R.G. (1993): Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance. **NeuroReport** **4**: 444-446.
- ◆ Burchfiel J.L., Duchowny M. S. and Duffy F H.. (1979): Neuronal supersensitivity to acetylcholine induced by kindling in the rat hippocampus. **Science** **204**: 1096-1098.
- ◆ Byrne M.C., Gottlieb R. and McNamara J.O. (1980): Amygdala kindling induces muscarinic cholinergic receptor declines in a highly specific distribution within the limbic system. **Exp. Neurol.** **69**:85-98.
- ◆ Cain D.P. and Corcoran M.E. (1985): Intracerebral β -endorphin, Met-enkephalin and morphine:kindling of seizure and handling induced potentiation of epileptiform effect. **Life Sci.** **34**:2535-2542.
- ◆ Cain D.P. and Corcoran M.E.(1985): Epileptiform effects of Met-enkephalin, β -endorphin and morphine:kindling generalized seizures and ptentiation of epileptiform effects by handling. **Brain Res.** **338**:327-336.
- ◆ Chapman A.G. (1995):Excitatory neurotansmission and antiepileptic drug development: a status report. In: Pedley TA, Meldrum B.S., eds. Recent advances in epilepsy, Vol.6 Edinburgh: Churchil Livingstone, 1-21.
- ◆ Chapman A.G. Dümüller N, Harrison B.L., Baron B.M. Parvez N., Meldrum B.S.(1995) Anticonvulsant activity of a novel NMDA/glicine site antagonist, MDL 104, 653 against kindled and sound-induced seizures. **Eur. J. Pharmacol.** **274**
- ◆ Chapman A.G. Graham J.L. Patel S. Meldrum B.S.(1991): Anticonvulsant activity of two orally active competitive NMDA antagonists, CGP 3749 and CGP 39551 against sound induced seizures in DBA/2 mice and photically-induced myoclonus in Papio papio. **Epilepsia** 578-87.

- ◆ Corcoran M.E., Wada J.A. and Wake A. (1976): A failure of atropine to retard amygdaloid kindling. **Exp. Neurol.** **51**: 271-275.
- ◆ Corkidi G. (1989) Système d'Analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo 2000. Thèse de Doctorat, Université Paris XII, France.
- ◆ Coyle J.T. and Puttfarcken P. (1993): Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. **Science** **262**: 689-695.
- ◆ Croucher M.J., Meldrum B.S., Krogsgaard-Larsen P. (1983): Anticonvulsant activity of GABA uptake inhibitors and their prodrug following central or systemic administration. **Eur. J. Pharm.** **89**:217-28.
- ◆ Dasheiff R.M., Savage D. D. and McNamara J.O. (1982): Seizures downregulate muscarinic cholinergic receptors in hippocampal formation. **Brain Res.** **235**: 327-334.
- ◆ Dawson T.M., Dawson V.L. and Snyder S.H. (1992): A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. **Ann. Neurol.** **32**: 297-311.
- ◆ De Sarro G., Di Paola E.D., De Sarro A and Vidal M.J. (1993): L-Arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. **Eur. J. Pharmacol.** **230**: 151-158.
- ◆ Dingledine R., McBain C.J. McNamara J.O. (1990): Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends. Pharmacol. Sci.** **11**: 334-338.
- ◆ Dürmüller N. Craggs M. Meldrum B. (1994): The effect of the non NMDA antagonists GYKI 52466 and NBQX and the competitive NMDA receptor antagonist D-CPPene on the development of amygdala kindling and on amygdala-kindled seizures. **Epilepsy Res** **17**:167-74
- ◆ Elazar Z., Motles E., Ely Y. and Simantov R. (1979): Acute tolerance to excitatory effect of enkephalin microinjections in to hippocampus. **Life Sci.** **24**:541-548.
- ◆ Engel J.J.R. and Sharpless N.S. (1977): Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. **Brain Res.** **136**: 381-386.
- ◆ Fernández-Guardiola A. (1986): Modelos experimentales de epilepsia. **Psiquiatría;** **2(2)**: 59-68.
- ◆ Forstermann U., Schmidt H.H.W., Pollock J.S., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nakane M. and Murad F. (1991): Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol.** **10**: 1849-1857.

- ◆ Frenk H., Watkins L.R., Miller J. and Mayer J.D.(1984): Nonspecific convulsions are induced by morphine but not D-ala-methionine enkephalinamide at cortical sites. **Brain Res. 299**: 51-59.
- ◆ Frenk H. (1983): Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: Involvement and interactions of multiple opiate and non-opiate systems. **Brain Res Rev. 6**:197-210.
- ◆ Frenk H., Urca G and Liebeskind J.C: (1978): Epileptic properties of leucine and methionine enkephalin comparison with morphine and reversibility by naloxone. **Brain Res. 147**:327-337.
- ◆ Gally J. A., Montague P.R., Reeke G.N. Jr, Edelman G.M. (1990): The NO hypothesis: possible effects of a short-lived rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87**: 3547- 51.
- ◆ Garthwaite J., Charles S:L., Chees-Williams R. (1988): Endotelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role a intercellular messenger in the brain. **Nature 336**: 385-88.
- ◆ Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J., Moncada S. (1989): NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol. 172**: 413-416.
- ◆ Garthwaite J., Southame E., Anderton M. (1989): A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. **J. Neurochem. 53**: 1952-1954.
- ◆ Glowinski J. and Iversen L.L. (1966): Regional studies of catecholamines in the rat brain. **J. Neurochem. 13**: 655-669.
- ◆ Goddard G.V., McIntyre D.C. and Leech C.K. (1969): A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp. Neurol., 25**:295-330.
- ◆ Graham D.C. (1978): **Mol. Pharmacol. 14**: 633.
- ◆ Grooms S.Y. and Jones L.S. (1994): Hippocampal in vitro kindling is not blocked by nitric oxide synthase inhibitors. **NeuroReport 5**: 1102-1104.
- ◆ Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1989): **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press. Oxford. ed. 2 pp. 1-81.
- ◆ Hayashi T. (1952): A physiological study of epileptic seizures folowing cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jap. J. Physiol. 3**:46-64.

- ◆ Henriksen S. J., Bloom E.F., McCoy F., Ling N. and Guillemin R. (1978): β -endorphin induces nonconvulsive limbic seizures. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **75**:5221-5225.
- ◆ Hernández J. and Condés-Lara M. (1989): Serotonin dependent (Na⁺/K⁺) ATPase in kindling rats: A study in various brain regions. **Brain Res** **480**: 403-406.
- ◆ Hernández R.J. and Condés-Lara M (1992): Brain (Na⁺/K⁺) ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and kindled rats. **Brain Res** **593**: 239-244.
- ◆ Hirsch E. C., Lejene O., Colliot G., Corkidi G. and Tajani N. (1992): **Computer methods in nuclei cartography** In: **Methods in Neuroscience**, Conn P. M., (ed) Academic Press, New York. Vol 10, pp 883-87.
- ◆ Hökfelt T., Ceccatelli S., Gustafsson L., Hulting A.L., Verge V., Villar M., Zhang X. (1994): Plasticity of NO syntase expression in the nervous and endocrine systems. **Neuropharmacology** **33**: 1221-1227.
- ◆ Hope B.T., Michael G.J. Knigge K. M., Vincent S. R. (1991): Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **88**:2811-2814.
- ◆ Houser C.R., Miyashiro J.E., Swartz B.E., Walsh G.O. Rich J.R., Delgado-Escueta A.V: (1990): Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. **J. Neurosci.** **10**: 267-282.
- ◆ Isokawa M., Levesque M.F., Babb T.L., Engel Jr J. (1993): Single mossy fibers axonal systems of human dentate granule cells studied in hippoampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.** **13**: 1511-1522.
- ◆ Ito T., Hori M., Yoshida K. and Shimuazu M. (1977): Effect f anticonvulsants f seizure developing in the course daily administration of pentilenetetrazol to rats. **45**:165.
- ◆ Iwahashi K., Yoneyama H., Miyatake R., Ichikawa Y., Hosokawa K. (1995): NOS activity in mutant rodents suscptible for epilepsy or convulsions. **J. Jpn. Epilepsy. Soc.** **13** /1: 21-23.
- ◆ Janjua N.A. Itano T., Kugoh T., Hosokawa K., Nakano M., Matsui H., Hatase O.(1992a): Familial increase in plasma glutamic acid in epilepsy. **Epilepsy Res.** **11**: 37-44.
- ◆ Janjua N.A., Kabuto H., Mori A. (1992b): Increased plasma glutamic acid in a genetic model of epilepsy. **Neurochem. Res.** **17**: 293-6.
- ◆ Joy R. M., Stark L.G., Gordon L., Peterson S.L. and Albertson T. E. (1981): Chronic cholinesterase inhibition does not modify amygdaloid kindling. **Exp. Neurol.** **73**: 588-594.

- ◆ Kalichman M.W., Burnham W.M. and Livingston K.E. (1982): Pharmacological investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and fully-developed generalized seizures in the amygdala-kindled rat. **Neuropharmacology** **21**: 127-131.
- ◆ Kälviäinen R., Halonen T., Pitkänen A., Riekkinen P.J. (1993): Amino acid levels in the cerebrospinal fluid of newly diagnosed epileptic patients: effect of vigabatrin and carbamazepine monotherapies. **J. Neurochem.** **60**: 1244-50.
- ◆ Kam P.C.A. and Govender G. (1994): Nitric oxide: basic science and clinical applications. **Anaesthesia** **49**:515-521.
- ◆ Kaura S., Bradfor H.F., Young A. M. J. , Croucher M. J. and Hughes P.D. (1995): Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. **J. Neurochem.** **65**: 1240-1249.
- ◆ Kiedrowski L., Costa E. and Wroblewski J. T. (1992): Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary culture of cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** **58**: 335-341.
- ◆ Kohr G., De Koninck, Y., Modi I. (1993): Properties of NMDA receptor channels in neurons acutely isolated from epileptic (kindled) rats. **J. Neurosci.** **13**: 3612-27.
- ◆ Kovacs D.A. and Zoll J.G. (1982): Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in rat. **Brain Res.** **70**: 165-169.
- ◆ Kraus J.E., Yeh G. C., Bonhaus, D.W., Nadler J. V., McNamara, J.O. (1994): Kindling induces the long lasting expression of a novel population of NMDA receptors in hippocampal region CA3. **J. Neurosci.** **14**: 4196-4205.
- ◆ Le Gal La Salle, G. 1980: Inhibition of kindling-induced generalized seizures by aminooxyacetic acid. **Can J. Physiol. Pharmacol.** **58**: 7-11.
- ◆ Le Gal La Salle, G. and Feldblum S.(1983): Reversal of the anticonvulsant effects of diazepam on amygdaloid-kindled seizures by a specific benzodiazepine antagonist: 15-1788. **Eur J. Pharm.** **86**:91-93.
- ◆ Lee, S., Miskovsky, J., Williamson J., Howells, R., Devinsky, O., Lothman, E., Christakos, S. (1994): Changes in glutamate receptor and proenkephalin gene expression after kindled seizures. **Mol Brain. Res.** **24**:34-42.
- ◆ Lerer B., Stanley M., Demetrious S., and Gershon S. (1983): Effect of electroconvulsive shock on muscarinic cholinergic receptors in rat cerebral cortex and hippocampus. **J. Neurochem.** **41**: 1680-1683.
- ◆ Liebowitz N. R., Pedley T.A. and Cutler R.W.P. release of gamma-aminobutyric acid from hippocampal slices of the rat following generalized seizures induced by daily electrical stimulation of entorhinal cortex. **Brain Res.** **138**:369-373.

- ◆ Lipton S. A., Choi Y-B., Pan Z-H., Lei S. Z., Vincent Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., Stamler J. S. (1993): A redox-based neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compound. **Nature** **364**: 626-632.
- ◆ Löscher W., Siemens H. (1985): Cerebrospinal fluid gamma aminobutyric acid levels in children with different types of epilepsy:effect of anticonvulsant treatment. **Epilepsia** **26**:314-319.
- ◆ Lothman E. W., Bennet J.P., Perlin JB (1987): Alterations in neurotransmitters amino acids in hippocampal kindled seizure. **Epilepsy Res.**, **1/6**: 313-320.
- ◆ Lowenstein C.J., and Snyder S.H. (1992): Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell** **70**: 705-707.
- ◆ MacDemontt A.B., Meyer M.L., Wstbrook G.L., Smith S.J., Baker J.L. (1986): NMDA receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. **Nature** **321**:519-522.
- ◆ Manzoni O., Prezeau L., Marin P., Deshager S., Bockaert J. and Fagni L. (1992): Nitric Oxide Induced Blockade of NMDA Receptor. **Neuron** **8**: 653-662.
- ◆ Marletta M.A. (1989): Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **Trends. Blochem. Sci.** **14**: 488-492.
- ◆ Marletta M.A. (1993): Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.** **268**: 12231-12234.
- ◆ Martin D., McNamara J.O., Nadler J.V. (1992): Kindling enhances sensitivity of CA3 hippocampal pyramidal cells to NMDA. **J. Neurosci.** **12**: 1928-1935.
- ◆ Masukawa L-M., Higashima M., Kim J.H. Spencer D.D. (1989): Epileptiform discharges evoked in hippocampal brain slices from epileptic patients. **Brain Res.** **493**: 168-174.
- ◆ McDonald A.J., Payne D.R. and Mascagni F. (1993): Identification of putative nitric oxide producing neurons in the rat amygdala using NADPH-diaphorase histochemistry. **Neurosci.** **52 (1)**: 97-106.
- ◆ McGinty J.F., Kanamatsu T., Obie J., Dyers R.S., Mitchell L.C. and Hong J.S. (1986): Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus. **Neurosc. Lett.** **71**:31-36.
- ◆ McIntyre D.C., Puszty W. and Edson N. (1982): Effect of flurazepan on kindled amygdala convulsion in chatecolamine-depleted rats. **Exp. Neurol.** **77**:78-85

- ◆ McNamara J. O. (1994): Cellular and molecular basis of epilepsy. **J. Neurosci.** **14**:3413-25.
- ◆ McNamara J. O., Byrne M., Dasheiff R.M., Fitz J.G., (1980): The kindling model of epilepsy: A review. **Prog. Neurobiol** **15**: 139-159 Noda Y., Wada J.A. and McGeer E.G. (1982): Lasting influence of amygdaloid kindling on cholinergic neurotransmission. **Exp. Neurol.** **78**: 91-98.
- ◆ McNamara J.O., Bonhaus D.W., Crain B.J. Gellman R.L. and Shin Ch. (1987): Biochemical and Pharmacological Studies of Neurotransmitters in the kindling model. In **Neurotransmitters and Epilepsy**, Jobe P.C. and Lard H. Humana Press 115-160.
- ◆ Melbrum B.S.(1975): Epilepsy and GABA -mediated inhibition. **Int. Rev. Neurobiol.** **17**: 1-36.
- ◆ Meldrum B. S. (1994): The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **44** Suppl.
- ◆ Meldrum B. S., Croucher M.J., Badman G., Collins J.F. (1983): Antiepileptic action of excitatory amino acid antagonists in the photosensitive bacon, Papio Papio. **Neurosci Lett** **39**: 101-104
- ◆ Meldrum B.S. (1992) Excitatory amino acids in epilepsy and potential novel therapies. **Epilepsy Res.** **12** :189-196.
- ◆ Meller S:T: and Gebhart G.F. (1993): Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, **52**:127-136.
- ◆ Miettinen R., Kotti T., Halonen T. and Riekkinen S. (1995): NADPH diaphorase-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus exhibit differential sensitivity to kainic acid. **European J. Neurosci.** **7**: 1822-1825.
- ◆ Minamoto Y., Itano T., Tokuda M., Matsui H., Janjua N.A, Hosokawa K., Okada Y. Murakami T.H., Negi T., Hatase O. (1992): In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindling rat. **Brain. Res.** **573**: 345-8.
- ◆ Mody I., (1993): The molecular basis of kindling. **Brain Pathology** **3**:395-403
- ◆ Mody I., Stanton P.K., Heinemann U. (1988): Activation of N-methyl-D-aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate granule cells afeter kindling. **J. Neurophysiol.** **59**:1033-1053.
- ◆ Mollance: V.: Bagetta: G and Nistico: G. (1991): Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. **NeuroReport**, **2**: 269-272.

- ◆ Moncada S. (1992): The L-arginine nitric oxide pathway. **Acta Physiol Scand.** **145**:201-227.
- ◆ Morrisett R.A., Chow C., Nadler J.V., McNamara J.O. (1989): Biochemical evidence for enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate in the hippocampal formation of kindled rats. **Brain Res** **496**:25-28.
- ◆ Munkebeck K.E. and Schwark W.S. (1982): Serotonergic mechanisms in amygdaloid-kindled seizure in the rat. **Exp. Neurol.** **76**:246-253.
- ◆ Murphy S., Simmons M.L., Agullo L., Garcia A., Feinstein D.L., Galea E., Reis D. J., Minc-Golomb D., Schwartz J.P. (1993): Synthesis of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Trends Neurosci.** **16**: 323-328.
- ◆ Naranjo J. R., Iadarola M.J. and Costa e. (1986): Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling. **J. Neurosci. Res.** **16**:75-87.
- ◆ Nathan C (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** **6**: 3051-3064.
- ◆ Neal H. and Keane P.E. (1978): The effect of local microinjection of opiates and enkephalin into forebrain on the electrocorticogram of the rat. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.** **45**:655.
- ◆ Norris P.J., Charles I.G., Scorer C. A. and Emson P.C. (1995): Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques. **Histochem. J.** **27**: 745-756
- ◆ Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** **333**: 664-666.
- ◆ Patel S., Chapman A.G., Graham J. L., Meldrum B.S., Frey P. (1990): Anticonvulsant activity of the NMDA antagonists, D(-)-4-(3-phosphonopropyl) piperazine-2-carboxylic acid (D-CPP) and D(-) (E)-4-(3-phosphonoprop-2-enyl) piperazine-2-carboxylic acid (D-CPPene) in a rodent and a primate model of reflex epilepsy. **Epilepsy Res** **7**: 3-10.
- ◆ Paxinos G. and Watson Ch. (1982): The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.
- ◆ Peterson D.W., Collins J.F., and Bradford H.F. (1983): The kindled amygdala model of epilepsy: Anticonvulsant action of amino acid antagonists. **Brain Res** **275**:169-172.
- ◆ Post R.M. and Kopanda R.T. (1976): Cocaine, kindling and psychosis. **Am. J. Psychiat** **133**: 627-634.

- ◆ Przegalinski E., Baran L., Siwanowicz J. (1994): The role of nitric oxide in the kainate-induced seizures in mice. *Neurosc. Lett.*, 74-76.
- ◆ Racine R.J., (1972b): Modification of seizure activity by electrical stimulation II. Motor seizure., *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **32**: 281-294.
- ◆ Racine R. and Coscina D.V. (1979): Effects of midbrain raphe lesion or systemic p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. *Brain Res. Bull.* **4**:1-7.
- ◆ Racine R.J., Milgran N.W. and Hafner S. (1975): Effects of procaine hydrochloride, diazepam and diphenylhydantoin of seizure development in cortical and subcortical structures in rats. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **38**: 355-365, 1965.
- ◆ Rogawski M.A. (1993): Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends. Pharmacol. Sci.* **14**:325-31.
- ◆ Rondoui G., Lerner-Natolli M., Manzoni O., Lafon-Cazal M. and Bockaert J. (1992): A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling. *NeuroReport*, **3**: 805-808.
- ◆ Rondouin G., Bockaert J., Lerner-Natoli M. (1993): L-Nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. *Neuroreport* **4**: 1187-1190.
- ◆ Segal M. and Bloom F.E. (1976): The action of norepinephrine in the rat hippocampus. II. Activation of the input pathway. *Brain. Res.* **107**: 499-511.
- ◆ Seidel I., Bernstein H-G., Becker A., Grecksch G., Lupp H. and Muller M. (1991): Pattern of NADPH- diaphorase active neurons in rat forebrain is unchanged after pentylenetetrazol kindling. *Acta Histochem.*, **91**: 157-16.
- ◆ Shin Ch., McNamara J.O. (1994): Mechanism of Epilepsy. *Annu. Rev. Med.* **45**:379-89.
- ◆ Shin C., Leggs S. and McNamara J.O. (1984): Systemic gamma-vinil-GABA retards kindling development and suppresses kindled seizures. *Neurosci Abst.* **10**:343.
- ◆ Snead O.C. III and Bearden L. J. (1982): The epileptogenic spectrum of opiate agonists. *Neuropharmacol.* **21**: 1137-1144.
- ◆ Snead O.C. III and Bearden L.J.. (1980): Anticonvulsant specific for petit antagonized epileptogenic effect of leucine enkephalin. *Science* **210**: 1031-1034.
- ◆ Snyder S.H. (1992): Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science* **257**: 494- 496.

- ◆ Sprick V., Ortiz M.S., Ornstein K and Huston H.P. (1981) Spreading depression induced by microinjection of enkephalin into hippocampus and neocortex. **Brain Res.** **210**: 243.
- ◆ Stach R., Lazarova M.B. and Kacz D. (1981): Serotonergic mechanism in seizures kindled from the rabbit amygdala. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.** **316**: 56-58.
- ◆ Stamler J.S., Singel D.J. and Loscalzo J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science** **258**: 1898-1902.
- ◆ Stampfer M.J., Hennekens C. H., Manson J.E., Colditz G.A., Rosner B. and Willet W. C. (1993): **New England J. Med.** **328/20**: 1444-1449 .
- ◆ Stringer J.L. and Erden F (1995): In the hippocampus in vivo, nitric oxide does not appear to function as an endogenous antiepileptic agent. **Exp. Brain Res.** **105**: 341-401.
- ◆ Stuehr D.J. and Griffith O.W. (1992): Mammalian nitric oxide synthases. **Adv. Enzymol. Mol. Biol.** **346**: 287-347.
- ◆ Sutherland J.M., Tait H., Eadie M.J. (1982): **Epilepsias diagnóstico y tratamiento.** Editorial El Manual Moderno, S. A. México. 161 pp.
- ◆ Sutula T., Cascino G., Cavazos J., Parada I., Ramírez L. (1989): Mossy fibers synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. **Ann Neurol.** **26**:231-330.
- ◆ Sutula T., Xiao-Xian H., Cavazos J., Scott G. (1988): Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. **Science** **239**: 1147-1150.
- ◆ Talavera E., Omaña I., Asai M and Condés-Lara M. (1989): Regional brain IR-Met, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. **Brain Res.**, **485**: 141-148.
- ◆ Tortella F.C., Cowan A. and Adler M.W.(1981): Comparison of the anticonvulsant effects of opioid peptides and etorphine in rats after i.c.v. administration. **Life Sci.** **10**: 1039-1045.
- ◆ Tortella F.C., Moreton J.E. and Khazan N (1978): Electroencephalographic and behavioral effects of D-ala-methionine enkephalinamide and morphine in the rat. **J. Pharm. Exp. Ther.** **206**: 633-643.
- ◆ Traynelis S.F., Dingleline R., McNamara J.O., Butler L., Rigsbee L. (1989) Effect of kindling on potassium-induced electrographic seizures in vitro. **Neurosci. Lett** **105**:326-332.

- ◆ Urban L., Aitken P.G., Friedman A., Somjen G.G. (1990): An NMDA-mediated component of excitatory synaptic input to dentate granule cells in *epileptic* human hippocampus studied in vitro. **Brain Res** **515**: 319-322.
- ◆ Urca G., Frenk H., Liebeskind J.C. and Taylor A.N. (1977): Morphine enkephalin: analgesic and epileptic properties. **197**: 83-85.
- ◆ Vincent R.S., Kimura H. (1992): Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neurosci.** **46** (4): 755-784.
- ◆ Vincent S.R. (1986): NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. In **Neurohistochemistry modern methods and application**. Alan R. Liss, Inc, New York, pp 375-396.
- ◆ Vindrola O., Asai M., Zubieta M. and Linares G. (1983): Brain content of immunoreactive leu-enkephalin and met-enkephalin after pentylenetetrazol induced convulsions. **Eur. J. Pharm.** **90**: 85-89.
- ◆ Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. (1981a) Brain content of leu and Met-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. **Neurosc. Lett.** **26**: 125-130.
- ◆ Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. (1981b): Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. **Neurosc. Lett.** **21**:39-43.
- ◆ Vosu H. and Wise R.A. (1975): Cholinergic seizure kindling in the rat: Comparison of caudate, amygdala, and hippocampus. **Behav. Biol.** **13**:491-495.
- ◆ Wasterlain C. G. and Jonec V. (1983): Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. **Brain Res.** **271**: 311-323.
- ◆ Weiner C.P., Knowles R.G., Moncada S. (1994): Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **171**(3): 838-843.
- ◆ Wetherell J.R., Fosbraey P. and French M..C (1989): A comparison of the distribution of neurotransmitters in brain regions of the rat and guinea-pig using a chemiluminescent method and HPLC with electrochemical detection. **J. Neurochem.** **53**: 1519-1526.
- ◆ Wilkison D.M. and Halpern LM. (1979): The role of biogenic amines in amygdalar kindling: Local amygdalar afterdischarge. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **211**:151-158.
- ◆ Wise R.A. and Chinerman J. (1974): Effects of diazepam and pentobarbital on electrically-induced amygdaloid seizures and seizures development. **Exp. Neurol.** **45**:355-363

- ◆ Wu W. (1993): Expression of nitric oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. **Exp. Neurol.** **120**: 153-159.
- ◆ Yeh G.B., Bonhaus D.W., Nadler J.V., McNamara J.O. (1989): N-methyl-D-aspartate receptor plasticity in kindling: Quantitative and qualitative alterations in the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** **86**:8157-8160.