



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

11261

19  
2ej.

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA  
Campus UNAM-UAQ-Juriquilla.

F. M.

**Los efectos de Transplantes Cerebrales en Modelos de  
Epilepsia.**

"Efectos del Transplante de Rafe Mesencefálico Fetal y Glial en el Modelo del  
Kindling Eléctrico Amigdalino"

**Tesis**

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias (Neurobiología)  
*Biomedicas.*

Presenta:

**Ariel Graff Guerrero.**

Tutor:

**Dr. Miguel Condés y Lara**

275536

Juriquilla, Qro. Noviembre de 1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# Indice de Contenidos

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Epilepsia	3
3.1. Epilepsia Focal	8
3.2. Epilepsia Generalizada	16
3.3. Epilepsia Experimental	18
3.4. Kindling	21
4. Bomba de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	32
4.1. Bomba de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> y Serotonina	35
5. Transplantes en el Sistema Nervioso Central	40
5.1. Transplantes Neuronales y Epilepsia	42
5.2. Variedades de Transplantes	45
6. Planteamiento del Problema	48
7. Hipótesis	49
8. Objetivos	50
9. Material y Métodos	51
9.1. Sujetos Experimentales	51
9.2. Grupos Experimentales	51
9.3. Procedimiento del Kindling	53
9.4. Transplantes	55
9.5. Cultivo Primario de Glia	58
9.6. Histología	61
9.7. Inmunohistoquímica	62
9.7.1. Inmunohistoquímica en Tejidos	62
9.7.2. Inmunohistoquímica en Cultivo Primario	65
10. Valoración de Resultados	66
10.1. Pruebas Estadísticas	67
11. Resultados	67
11.1. Resultados por Fase Conductual	68
11.2. Resultados de la Duración y la Frecuencia de las Posdescargas	73

11.3. Resultados de Inmunohistoquímica e Histológicos	76
12. Discusión	80
13. Bibliografía	90

### **Índice de Tablas**

1. Clasificación Internacional de Epilepsia (1981)	6
2. Clasificación Internacional de Epilepsia (1989)	7
3. Modelos Experimentales de Epilepsia	19

### **Índice de Figuras**

1. Modelo propuesto por Traynelis y Dingledine en 1988	11
2. Hipótesis de las Células "En Cesta Durmientes"	15
3. Inhibición de Corta duración	28
4. EEG de una Posdescarga	55
5. Esquema para la disección de neuronas monoaminérgicas	58
6. Células gliales de cultivo primario	60
7. Inmunohistoquímica del Rafé Mesencefálico	63
8. Fases conductuales con respecto a los estímulos	68
9. Media de estímulos en la Fase conductual 1	70
10. Media de estímulos en la Fase conductual 3	71
11. Media de estímulos para presentar la primera CCG	72
12. Media de estímulos totales para presentar 10 CCG	73
13. Media de la duración de la PD en la fase 1	74
14. Media de la duración de la PD en la fase 3	75
15. Microfotografía de tejido transplantado	76
16. Microfotografía de células serotoninérgicas	77
17. Microfotografía de trasplante marcado con GFAP	77
18. Microfotografía de trasplante glial	78
19. Microfotografía de células gliales en trasplante	79
20. Cultivo primario de glia marcada con bis-bencimida	79

Este trabajo está dedicado a las personas que viven  
con el estigma de la epilepsia



---

*CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, JURQUILLA QUERETARO*

## 1. Resumen.-

La epilepsia se considera un problema prioritario de salud por su alta prevalencia e incidencia y los mecanismos responsables de este padecimiento son parcialmente conocidos. Entre los mecanismos responsables se ha involucrado una disfunción de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa en el tejido cerebral de pacientes con esta alteración. Para el estudio experimental de la epilepsia se han desarrollado diversos modelos, entre los cuales se encuentra el llamado *kindling* eléctrico. En el modelo de *kindling* también se ha demostrado la disfunción de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa preferentemente glial y regulada por serotonina. De la misma manera se ha demostrado que la serotonina en diferentes preparaciones experimentales retrasa el proceso de epileptogénesis, además de ocasionar una disminución en la frecuencia de las crisis epilépticas.

En el presente trabajo se utilizaron trasplantes de tejido procedente de rafe mesencefálico fetal con células serotoninérgicas y células gliales en el modelo de *kindling* eléctrico amigdalino, para evidenciar la importancia de la serotonina y las células gliales en el proceso de epileptización. El tejido del rafe mesencefálico fetal se transplantó en el ventrículo lateral ipsilateral al sitio de estimulación. Las células gliales se transplantaron en la amígdala contralateral al sitio de estimulación.

El trasplante de tejido procedente del rafe mesencefálico fetal, ocasionó una mayor estancia en las fases 1 y 3 de acuerdo a la clasificación de Racine, sin tener efecto en el resto de las fases analizadas de manera individual. Además, los animales con este trasplante requirieron un mayor número de estímulos para presentar la primera crisis convulsiva generalizada. La duración de la posdescarga también fue modificada por la presencia del trasplante de rafe mesencefálico fetal, siendo menor en la fase 1 y mayor en la fase 3 en comparación con los animales control.

El trasplante de células gliales, procedentes de cultivo primario no modificó ninguno de los parámetros durante la evolución del *kindling*.

Los resultados obtenidos muestran que el trasplante de tejido del rafe mesencefálico fetal con células serotoninérgicas retrasa el proceso de epileptogénesis de tal forma que los animales permanecen más tiempo en los estadios iniciales del proceso de *kindling*. En efecto, puede deberse a la acción inhibitoria de la serotonina sobre la actividad neuronal y esta acción podría favorecer la activación de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa glial. No obstante, esta interacción neurona-glia no se manifiesta con el solo incremento del tejido glial mediante los trasplantes.

## 2. Introducción.-

La epilepsia es una disfunción cerebral, de carácter recurrente que está caracterizada por una hipersincronía en la descarga de un grupo de neuronas cerebrales y que presenta la tendencia a la generalización (Jackson, 1931). Se considera, que esta disfunción puede tener un componente tanto en la neurotransmisión inhibitoria (por déficit) como la excitadora (por exceso) (Dichter y Ayala, 1987; Brailowsky *et al*, 1989).

La importancia de estudiar el fenómeno epiléptico estriba en su alta incidencia y prevalencia en la población. Hauser y Hesdorffer (1990) señalan que 1.65 millones de individuos en los E.U.A. padecen esta enfermedad. El dato anterior corresponde al 1% de la población total.

En la niñez se presentan aproximadamente dos terceras partes de los eventos epilépticos, siendo ésta la causa más frecuente de consulta para el neurólogo pediatra. En la edad adulta es la segunda causa más frecuente de consulta neurológica, excedida únicamente por las enfermedades vasculares cerebrales (Adams y Victor, 1993).

Se debe puntualizar que la terapéutica actual es sintomática y aún usándola correctamente, únicamente el 40% de los pacientes permanecen libres de crisis epilépticas (Elwes *et al.*, 1984).

Para el estudio experimental de la epilepsia se han desarrollado diferentes modelos, entre los cuales se encuentra el *kindling* eléctrico (Goddard *et al*, 1969). Este modelo consiste en la aplicación repetida de estímulos



eléctricos subumbrales en alguna región del sistema límbico. Después de varios estímulos el animal presenta crisis epilépticas focales que posteriormente llegan a generalizarse (Goddard *et al*, 1969). El modelo del *kindling* permite estudiar los fenómenos involucrados en la epilepsia focal, durante su propagación (epileptogénesis) y en la generalización (establecimiento y permanencia).

Por otro lado, la serotonina ha sido descrita como un neurotransmisor con propiedades inhibitorias capaz de retrasar la evolución del proceso epiléptico. Entre los mecanismos responsables se encuentra la capacidad de este neurotransmisor en producir inhibición cortical (Kovacz y Zoll, 1974).

Asimismo, la actividad de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa glial sensible a la activación por serotonina se encuentra disminuida en el modelo del *kindling* eléctrico amigdalino (Hernández y Condés-Lara, 1992), pudiendo ser éste otro mecanismo mediante el cual la serotonina retrasa el proceso epiléptico.

Ahora bien, los trasplantes cerebrales son una técnica que se utiliza para el estudio de la función de las estructuras y/o los neurotransmisores involucrados en algún fenómeno o proceso. En esta tesis mediante el uso de trasplantes de tejido fetal productor de serotonina, así como de células gliales se estudió la importancia de estas estructuras en el proceso de la epilepsia, utilizando el modelo del *kindling* eléctrico amigdalino.

Para la mejor comprensión del proyecto planteado en esta tesis, se hará una breve revisiones de los temas de epilepsia, epilepsia experimental, *kindling* eléctrico, bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa y trasplantes cerebrales. En lo que

respecta a la participación de la serotonina, la información se encuentra contenida en cada uno de los apartados mencionados.

### **3. Epilepsia.-**

La epilepsia debe considerarse como un signo de disfunción cerebral (Brailowsky *et al.*, 1989) y que puede ser causada por muy diversas etiologías, teniendo todas ellas en común el ocasionar crisis recurrentes y paroxísticas cuyas manifestaciones son muy variadas. Debido a la diversidad de las manifestaciones clínicas que se pueden presentar, existe una dificultad con relación a la terminología que se utiliza.

El término "crisis" hace referencia a un cambio repentino de comportamiento ocasionado por la activación desordenada, sincronizada y rítmica de un grupo de neuronas en el sistema nervioso central (SNC). Se calcula que entre el 7 y el 10% de la población tendrán una crisis en algún momento de su vida (Hauser y Hesdorffer, 1988; Rutecki, 1993). El término "convulsión" se refiere a las crisis con manifestaciones motoras, siendo inapropiado hablar de convulsión cuando las manifestaciones son únicamente sensitivas o de consciencia (Adams y Victor, 1993). El término "epilepsia" deriva de palabras griegas que significan "aprovecharse de" o "estar alejado". Los griegos la refieren como "mal en que se cae" o "caída malvada". La terminología médica actual la define como una disfunción cerebral caracterizada por la presencia de crisis periódicas y no predecibles

(McNamara, 1994; Adams y Victor, 1993). Otros términos usados con frecuencia son ictal (crisis) e interictal (entre las crisis). El término *status epilepticus* describe una condición caracterizada por una crisis lo suficientemente prolongada o que se repite tan frecuentemente que no existe recuperación de la consciencia entre los ataques (Wasterlain *et al.*, 1993).

La clasificación para las crisis epilépticas de “La Liga Internacional contra la Epilepsia” propuesta en 1981, se basa principalmente en las manifestaciones clínicas de las crisis y en sus características en el electroencefalograma (EEG) (tabla 1).

Básicamente podemos dividir a las crisis epilépticas en 2 grupos: parciales, aquellas con un inicio focal o localizado a un área cerebral y generalizadas, cuando la crisis se extiende a todas las áreas cerebrales. Las crisis con inicio parcial frecuentemente se vuelven generalizadas al extenderse la actividad a otras áreas cerebrales, llamándose secundariamente generalizadas. Las crisis parciales a su vez se dividen en: simples, cuando se preserva la consciencia y complejas, cuando hay pérdida de la misma. Las crisis generalizadas siempre se acompañan de pérdida de la consciencia, siendo ejemplos las crisis de ausencia y las tónico-clónicas.

La clasificación de las crisis epilépticas está en constante revisión, existe otra clasificación más reciente (1989) (tabla 2) donde se clasifica por síndromes epilépticos, pero debido a su complejidad la mayoría de los autores continúan usando la descrita en 1981 (Commision on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981). Se debe

indicar que un paciente puede presentar diferentes tipos de crisis epilépticas, complicando aún más cualquier tipo de clasificación (McNamara, 1994).

---

## **Tabla 1**

### **I. Crisis Generalizadas (simétrica sin inicio local)**

- a) Tónica, clónica o tónico-clónicas (gran mal)
- b) Ausencia (petit mal)
  - 1. Simple (solo pérdida de la consciencia)
  - 2. Compleja (con movimientos breves tónicos, clónicos o automatismos)
- c) Síndrome de Lennox-Gastaut
- d) Epilepsia mioclónica juvenil
- e) Espasmo Infantil (Síndrome de West)
- f) Crisis atónica (astática, aquinética) en ocasiones con gesticulaciones mioclónicas

### **II. Crisis parciales o focales (crisis de inicio local)**

- a) Simples (sin pérdida de la consciencia)
  - 1. Motoras (tónico, clónica, tónico-clónicas; jacksoniana; epilepsia benigna de la infancia; epilepsia partialis continua)
  - 2. Somatosensorial y sensorial especiales (visual, auditiva, olfatoria, gustativa, vertiginosa)
  - 3. Autonómica
  - 4. Psíquica
- b) Complejas (con pérdida de la consciencia)
  - 1. Comienza como una crisis parcial simple y progresa a la pérdida de la consciencia
  - 2. Desde un inicio progresa a la pérdida de la consciencia

### **III. Síndromes de epilepsias especiales**

- a) Crisis mioclónicas y mioclonus
- b) Epilepsia refleja
- c) Afasia adquirida con un proceso convulsivo
- d) Crisis febriles y otras de la infancia
- e) Crisis Histéricas.

---

**Tabla 1. Clasificación Internacional de Epilepsia (1981) de la Liga Internacional  
contra la Epilepsia**

**(Adaptada de Commission on Classification and Terminology of the International  
League Against Epilepsy, 1981).**

---

## **Tabla 2**

### **1. Epilepsia y síndromes epilépticos relacionados con la localización (focales o parciales)**

#### **1.1 Idiopáticas (relacionadas con la edad desde el comienzo)**

- Epilepsia infantil benigna con paroxismos centrotemporales (epilepsia rolándica)
- Epilepsia Infantil benigna con paroxismos occipitales
- Epilepsia primaria de la lectura

#### **1.2 Sintomáticas**

- Epilepsia parcial continua crónica y progresiva (síndrome de Kojewnikov)
- Síndromes con modalidades específicas de provocación
- Epilepsias del lóbulo temporal
- Epilepsias del lóbulo frontal
- Epilepsias del lóbulo parietal
- Epilepsias del lóbulo occipital

#### **1.3 Criptogénicas**

### **2. Epilepsias y síndromes generalizados**

#### **2.1 Idiopáticas (relacionadas con la edad de comienzo)**

- Convulsiones neonatales familiares benignas
- Convulsiones neonatales benignas
- Epilepsia mioclónica benigna de la infancia
- Epilepsia juvenil con ausencias
- Epilepsia mioclónica juvenil
- Epilepsia con crisis de "gran mal" del despertar
- Otras epilepsias generalizadas
- Epilepsia con crisis provocadas por estímulos específicos

#### **2.2 Criptogénica o sintomática**

- Síndrome de West
- Síndrome de Lennox-Gastaut
- Epilepsia con crisis astatomioclónicas
- Epilepsia con ausencias mioclónicas

#### **2.3 Sintomáticas**

- Encefalopatía mioclónica precoz
- Encefalopatía mioclónica precoz con brotes de supresión
- Otras

### **3. Epilepsias y síndromes epilépticos indeterminados (localizados o generalizados)**

#### **3.1 Con crisis focales y generalizados**

- Crisis neonatales
- Epilepsia mioclónica grave de la infancia
- Epilepsia con punta-onda lenta continua durante el sueño lento
- Afasia epiléptica adquirida (Síndrome de Landau-Kleffner)
- Otras

#### **3.2 Sin características focales o generalizadas inequívocas**

### **4. Síndromes especiales**

#### **4.1 Crisis relacionadas con situaciones especiales**

- Convulsiones febriles
- Crisis o estatus aislados
- Crisis provocadas por factores metabólicos o tóxicos agudos

---

### **Tabla 2. Clasificación Internacional de Epilepsia (1989) de la Liga Internacional contra la Epilepsia.**

**(Adaptada de Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989).**

### **3.1 Epilepsia Focal.-**

La investigación moderna sobre el mecanismo celular de la epilepsia comenzó alrededor de los años 60, al ser posible el registro intra y extracelular de neuronas en el SNC, así como el estudio de los mecanismos responsables de la excitación neuronal y las funciones sinápticas (Dichter y Ayala, 1987). La epilepsia focal ha sido la más estudiada y a partir de ésta se ha obtenido una gran cantidad de conocimientos sobre la función de áreas cerebrales específicas. La epilepsia focal ha generado diferentes modelos para su estudio ya que se conoce el origen de la actividad epiléptica y que permite la

colocación de electrodos y el registro de áreas bien definidas del SNC (Brailowsky *et al.*, 1989; Dichter y Ayala, 1987).

Una característica electroencefalográfica de la epilepsia focal es la presencia de las espigas interictales (EII) tanto en modelos animales como en humanos (Dichter y Ayala, 1987; Brailowsky *et al.*, 1989). Las EII son potenciales transitorios de duración inferior a 70 ms., asintomáticas, localizadas con frecuencia en la región donde inicia la actividad epiléptica y son consideradas como el producto de la suma temporal y espacial de eventos sinápticos resultantes de la activación sincrónica de numerosas neuronas (Dichter y Ayala, 1987; Johnston y Brown, 1981).

En el ámbito intracelular el correlato de las EII son las despolarizaciones paroxísticas sostenidas (DPS), se trata de despolarizaciones lentas, de gran amplitud y asociadas a trenes de potenciales de alta frecuencia. La DPS es seguida de una hiperpolarización post-DPS (Dichter y Ayala, 1987; Brailowsky *et al.*, 1989).

Cuando una crisis se desencadena, encontramos que en el foco epiléptico se desarrollan una secuencia de eventos característicos: la hiperpolarización post-DPS se vuelve gradualmente menor y es reemplazada por una despolarización (Dichter y Ayala, 1987). En el EEG después de varias EII comienzan a aparecer posdescargas (PDs), las PDs son cada vez más largas hasta el desarrollo de una crisis clínicamente manifiesta. El incremento en la duración de las PDs es paralelo con el reclutamiento sincrónico de las neuronas del foco epiléptico. Durante la secuencia de los eventos anteriores,

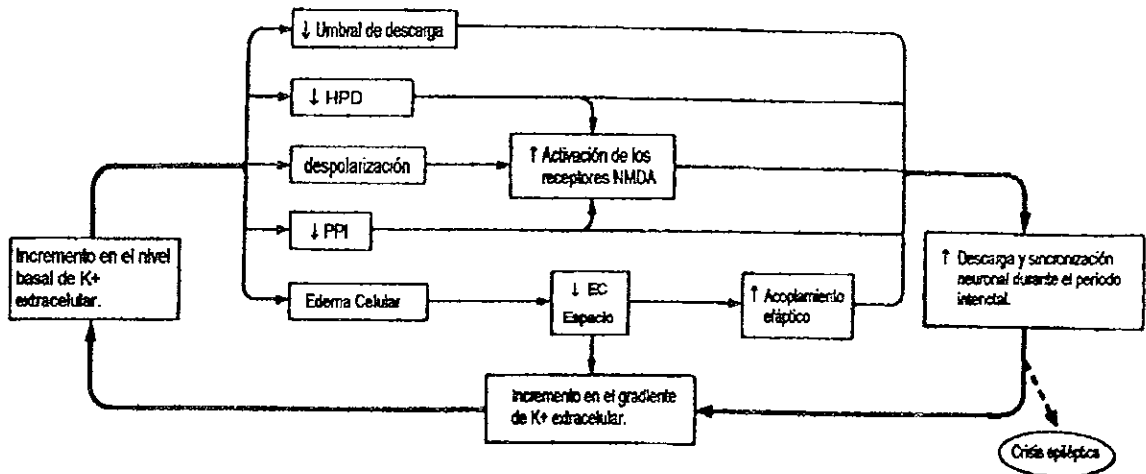
diferentes áreas del cerebro van involucrándose para el desarrollo de las crisis. La hiperactividad neuronal ocasiona un aumento del  $K^+$  extracelular y una disminución del  $Ca^{++}$  extracelular que parecen tener un papel primordial en perpetuar la secuencia antes mencionada (Dichter *et al.*, 1972; Dichter y Ayala, 1987; McNamara, 1994).

El reclutamiento neuronal observado durante el desarrollo de las crisis es una manifestación de la actividad de las subpoblaciones neuronales relacionadas con el foco epiléptico, como ha sido mostrado al producir epilepsia focal en el mono mediante la aplicación de crema de alúmina (gel de hidróxido de aluminio). Las neuronas que se encuentran en el centro del foco tienen la capacidad de producir DPS en forma de trenes y alrededor de éstas se encuentran células con la capacidad de descargar normalmente o en trenes. Las células que están en el centro del foco, al encontrar las neuronas de su alrededor en estado excitable podrían reclutarlas y generar una EII e incluso una crisis focal con posibilidad de generalización (Brailowsky *et al.*, 1989).

No obstante, hasta el presente no se cuenta con una explicación satisfactoria para la propagación de las EII hasta ocasionar una crisis (focal o generalizada)(McNamara, 1994).

Traynelis y Dingledine en 1988 proponen un modelo (Fig. 1) donde el aumento del  $K^+$  extracelular juega un papel fundamental como causa del desarrollo de las crisis. Este modelo tiene el inconveniente de ser hipotético y de estar basado en modelos *in-vitro*, aún cuando algunos de sus componentes ya han sido demostrados experimentalmente *in-vivo*.





**Fig. 1. Modelo propuesto por Traynelis y Dingledine en 1988 donde se muestra el papel del  $K^+$  en el desarrollo y mantenimiento de las crisis epilépticas. Abreviaturas: HPD: hiperpolarización post-despolarización; PPI: potenciales post-sinápticos inhibitorios; EC: extra celular; NMDA: n-metil-d-aspartato. (Modificado de Traynelis y Dingledine, 1988)**

La elevación del  $K^+$  extracelular aproxima a la membrana neuronal a su umbral para desencadenar un potencial de acción. Esta despolarización parcial provoca una disminución en la corriente de  $K^+$ , que tiene un impacto en otras corrientes iónicas que regulan la excitabilidad de la célula. La disminución en la corriente de  $K^+$  puede reducir los potenciales post-sinápticos inhibitorios (PPI). El efecto de la elevación del  $K^+$  extracelular sobre los receptores  $GABA_a$  (de corta latencia) es bloquear la corriente de  $Cl^-$  y el efecto sobre los  $GABA_b$  (de larga latencia) es bloquear la corriente de  $K^+$  (Dutar y Nicoll, 1988; Chamberlin y Dingledine, 1988).

Después de trenes de despolarización se presenta un largo período de hiperpolarización, que se ha denominado hiperpolarización post-despolarización (HPD), este período parece ser dependiente de  $K^+$ . La disminución en la corriente de  $K^+$  disminuirá la amplitud de esta hiperpolarización limitando su efecto (McNamara, 1994).

El incremento del  $K^+$  extracelular parece ser el responsable del edema celular (hinchamiento celular) encontrado tanto en neuronas como en glia, esto se debe a que la disminución de las corrientes de  $K^+$  ocasiona un aumento de la concentración de iones y agua intracelular. El aumento en el volumen celular de las neuronas y la glia disminuirá el espacio extracelular. Esta disminución aumenta los potenciales efápticos (acoplamiento electrotónico) al aproximar los cuerpos celulares (Traynelis y Dingledine, 1988).

El efecto de campo de estos potenciales podría ser suficiente para despolarizar a células vecinas, ya cercanas a su umbral debido al aumento en la concentración de  $K^+$  extracelular. Este mecanismo pudiera contribuir para la sincronización de los trenes de DPS y su generalización aún en ausencia de actividad sináptica.

La despolarización, junto con la disminución de los PPI y de la HPD, parece que promueve la actividad de los receptores tipo NMDA (N-metil-d-aspartato) para el glutamato al remover el bloqueo mediado por  $Mg^{++}$ , esto resultaría en una despolarización más prolongada de las células (Dingledine *et al.*, 1990).

De acuerdo con Dichter y Ayala (1987), en circunstancias más naturales, la sola elevación del  $K^+$  extracelular no parece ser suficiente para la generación de DPS e implica la participación de neuromoduladores como norepinefrina, acetilcolina y algunos péptidos que tienen la capacidad de disminuir aún más las corrientes de  $K^+$ . En el caso de focos epilépticos crónicos la distorsión anatómica y la redistribución de canales parece tener participación en la génesis de las DPS y su propagación.

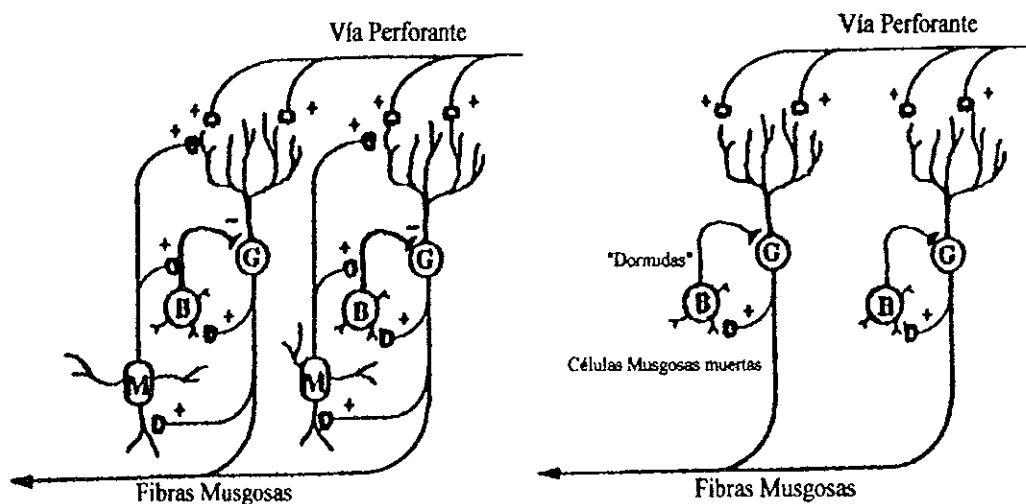
Inicialmente se pensó que la esclerosis encontrada en el hipocampo (disminución de tamaño con gliosis) en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal era la causa de esta disfunción (McNamara, 1994). En la década de los setenta y al inicio de los años ochenta, se demostró que el *status epilepticus* era causa suficiente para ocasionar la esclerosis hipocampal (Olney *et al.*, 1979; Sloviter, 1994.). El hecho de que la resección del hipocampo con esclerosis ocasione que mejoren los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y que la mayoría de éstos tengan antecedentes de haber tenido algún tipo de crisis en la infancia, hace pensar que la crisis inicial es causa de la esclerosis hipocampal a largo plazo y ésta por sí misma sería la causa de las crisis epilépticas subsecuentes (Wasterlain *et al.*, 1993; McNamara, 1994). Para poder explicar por qué la esclerosis hipocampal causa la perpetuación de la epilepsia se propuso a mediados de los años ochenta como mecanismo una disminución en la actividad de las interneuronas GABAérgicas. Esta disminución resultaría en una hiperexcitabilidad de las neuronas en el hipocampo (McNamara, 1994).

En 1987, Sloviter demostró que las células GABAérgicas en el hipocampo son más resistentes a la muerte neuronal inducida por hiperexcitabilidad que los demás tipos celulares existentes. Además se encontró una reorganización y proliferación de las fibras musgosas (axones de células granulosas) tanto en tejido hipocampal de humanos con epilepsia del lóbulo temporal como en la epilepsia generalizada de origen idiopático (Glass y Dragunow, 1995). Esta reorganización también se ha encontrado en modelos de epilepsia experimental incluyendo el inducido por *kindling*, por pentilinetetrazol y por ácido kaínico (Cavazos *et al.*, 1991; Glass y Dragunow, 1995).

La activación neuronal intensa y repetitiva durante las crisis ocasiona una pérdida en la inhibición mediada por GABA en las células granulosas del giro dentado, en el hipocampo. Esto plantea que la pérdida de la inhibición o la desinhibición sináptica contribuye a la hiperexcitabilidad encontrada. Sin embargo, la preservación de las células GABAérgicas en esta región es un resultado paradójico. Sloviter, en 1991 plantea la hipótesis de "las células en cesta durmientes". Esta hipótesis propone que las células musgosas del hipocampo son más sensibles a la muerte inducida por la excitación repetitiva durante las crisis epilépticas. Estas células estimulan a las células en cesta (GABAérgicas) que tienen acción inhibitoria sobre las células granulosas. Durante la epilepsia hay muerte de las células musgosas y por lo tanto la estimulación (glutamatérgica) sobre las células en cesta desaparece. Este hecho bloquea el estímulo inhibitorio de las células en cesta sobre las

granulosas (fig. 2). Posterior a ésto las fibras musgosas tienen un aumento y reorganización que inicia uno a dos meses después del estímulo excitatorio anormal (Glass y Dragunow, 1995) y corresponde con la restauración de circuitos inhibitorios. La reorganización de las fibras musgosas, según Sloviter (1991) tiene preferencia sobre las células en cesta, por lo que se ha sugerido que es un fenómeno compensatorio.

Cronin *et al.* en 1992 sugieren que la función de la proliferación de las fibras musgosas no es únicamente inhibitoria sino también excitadora. Esto conjunta la hipótesis de "las células en cesta durmientes" con la hipótesis de Tauck y Nadler (1985) en donde la proliferación de las fibras musgosas es para estimular a las células granulosas, es decir, tiene una función excitatoria.



**Fig. 2 Hipótesis de las Células "En Cesta Durmientes"**

Nótese la desaparición de las células musgosas que ocasiona una disminución en la acción inhibitoria de las células en cesta. Ver el resto de la explicación en el texto. G: célula granulosa; B: célula "en cesta"; M: célula musgosa. (Ilustración tomada de McNamara, 1994).

### **3.2 Epilepsia Generalizada.-**

La excitación de un área cortical, por los mecanismos antes descritos, logra su propagación a la corteza contralateral y a estructuras subcorticales lo que ocasiona el inicio de las manifestaciones propias de una crisis. Las manifestaciones dependen del sitio cortical donde se inicia la descarga. La actividad excitadora es amplificada en los núcleos subcorticales (ganglios basales, tálamo, formación reticular) que retroalimentan el foco inicial pero además de manera difusa (Brailowsky *et al.*, 1989; Adams y Victor, 1993).

La propagación subcortical da origen a una fase tónica con pérdida de la consciencia acompañada o precedida de signos de hiperactividad del sistema nervioso autónomo como salivación, midriasis, taquicardia, bradicardia e hipertensión. La representación EEG de esta etapa de la crisis corresponde a poliespigas de alto voltaje. Después de la fase tónica de excitación, comienza una inhibición diencefalicortical que interrumpe intermitentemente y súbitamente la crisis y cuya representación es la etapa clónica de la convulsión. La inhibición diencefalicortical ocasiona un trazo de espiga-onda en el EEG. Conforme evoluciona la crisis generalizada tónico-clónica las etapas tónico y clónicas se hacen más cortas hasta desaparecer. Un tipo *sui-generis* de crisis generalizada son las crisis de ausencia que se caracterizan en el EEG por un patrón cortical difuso del tipo espiga-onda durante toda su

evolución y cuyo origen se encuentra probablemente a nivel talámico (Adams y Victor, 1993; Brailowsky *et al.*, 1989; Steriade, 1993).

Penfield y Jasper en 1954 describen la hipótesis centroencefálica donde sugieren que el inicio de la descarga tipo punta-onda se encuentra en un área entre el tallo cerebral y el tálamo. Sin embargo Bancaud *et al.* (1974) demostraron que la estimulación de áreas corticales frontales también puede desencadenar el mismo patrón punta-onda. Gloor en 1968 con su hipótesis corticoreticular apoya los conceptos de Penfield y Jasper (1954), mencionando que la descarga tipo punta-onda se origina por la interacción anormal entre la corteza y las áreas subcorticales. La estimulación de los núcleos talámicos intralaminares y de la línea media ocasionan un fenómeno llamado “respuesta de reclutamiento cortical” cuya manifestación normal corresponde a los husos de sueño característicos de las fases II y III en el hombre. La estimulación de estos mismos núcleos ocasiona un estado conductual similar a las ausencias epilépticas con un patrón punta-onda en el EEG. Los estudios comparativos de los husos de sueño y los registros tipo espiga-onda sugieren una actividad resonante tálamo-cortico-talámica como responsable en la generación del patrón espiga-onda (Steriade, 1993). También debe resaltarse la participación de la formación reticular en la regulación del tono cortical, ya que la depresión de la formación reticular aumenta las descargas punta-onda y su estimulación las disminuye (Morison y Dempsey, 1942, 1943; Hess, 1929).

### **3.3 Epilepsia Experimental.-**

En el estudio de las alteraciones electroencefalográficas, bioquímicas y celulares que acompañan a esta disfunción existe una limitación natural al estudiar la epilepsia en humanos. Mediante técnicas invasivas, ensayos farmacológicos o modificaciones genéticas se han desarrollado modelos experimentales de epilepsia en diversos animales. Estos modelos presentan características semejantes a las observadas en la epilepsia en humanos. Esta disfunción cerebral es la que ha originado un número mayor de modelos entre todas las enfermedades del SNC. Esto se debe a la extraordinaria diversidad de formas de expresión de la epilepsia y a la gran excitabilidad del cerebro, siendo relativamente fácil hacer que un grupo de neuronas responda en una forma exagerada y paroxística ante una estimulación intensa (Fernández-Guardiola, 1992).



- 
1. **Modelos de actividad epileptógena inicialmente focal y con posibilidades de generalización (administración tópica).**
    - 1.1 Agudos:
      - fármacos convulsivantes : penicilina, ouabaína, estricnina, estrógenos conjugados, ácido kaínico (administración sistémica).
      - estimulación eléctrica focal supraumbral, congelación
    - 1.2 Crónicos:
      - crema de alúmina, sales de hierro, *kindling* eléctrico, toxina tetánica, cobalto, tungsteno, bicuculina\*, L-aspartado\*, L-glutamato\*.
    - 1.3 Modelos genéticos:
      - Ratonos E1 (estimulación vestibular), tottering (tg/tg) (estimulación vestibular).
  2. **Modelos de actividad epileptógena inicialmente generalizada (administración sistémica)**
    - 2.1 Crisis producidas por privación:
      - barbitúricos, alcohol, bromuros, etc.
    - 2.2 Crisis inducidas por fármacos
      - 2.2.1 Estimulantes de la excitación
        - Inespecíficos: pentilenetetrazol\*, anticolinesterásicos, fluorotil, sustancia P
        - Específicos: glutamato, aspartato, ácido homocisteínico, ácido pteroilglutámico, ibotenato
        - Indirectos: ácido 3-mercaptopropiónico, tiosemicarbazida
      - 2.2.2 Bloqueadores de la inhibición
        - 2.2.2.1 Acción sobre los sistemas GABAérgicos
          - Bloqueadores de la síntesis: DL-alilglicina, 3-mercaptopropionato, O<sub>2</sub> a alta presión, tiosemicarbamato, antagonistas del fosfato de piridoxina, isoniazida.
          - Bloqueadores del receptor: bicuculina\*, penicilina\*,  $\beta$ -carbolina, picrotoxina, barbitúricos convulsivantes, bemegrade, pentilenetetrazol\*.
    - 2.3 Convulsivantes metabólicos: metionina sulfoximina, ácido monofluoroacético, deoxiglucosa, fluorotil, lidocaina\*, cocaína\*.
    - 2.4 Modelos genéticos:
      - gallina (estimulación fótica); gerbiles; perro beagle; ratones: weaver (estimulación vestibular), quaking (estimulación sensorial), DBA/1 y DBA/2J (estimulación auditiva); ratas: GEPR 9 y 3 (estimulación auditiva, eléctrica o hipertérmica); Papio papio (estimulación fótica).
- \* Sustancias con capacidad de producir *kindling* químico
- 

**Tabla 3. Modelos experimentales de epilepsia.**  
(adaptada de Brailowsky *et al.*, 1989).

Los diferentes modelos con los que se cuenta, han sido de gran utilidad en el estudio de la fisiopatología y para el desarrollo de medicamentos para el control de este padecimiento (Freeman, 1995; Brailowsky *et al.*, 1989; David *et al.*, 1992). Entre algunas limitantes que tienen la mayoría de los modelos se

pueden encontrar: la necesidad de administrar sustancias para inducir disfunción cerebral; la presencia de alteraciones genéticas que afectan también otros sistemas del animal; la falta de modelos que reflejen con suficiente fidelidad la sintomatología humana en especial de los cuadros neurológicos paroxísticos observados en niños, como los espasmos infantiles (Síndrome de West), las crisis neonatales o el Síndrome de Lennox-Gastaut (Fernández Guardiola, 1992; Moshé *et al.*, 1995).

En la tabla 3 se presenta una clasificación de los principales modelos experimentales, separados esencialmente en dos grupos: aquellos con actividad epileptógena localizada que recuerdan las crisis parciales y aquellos con actividad epileptógena generalizada que recuerda este tipo de crisis. Uno de estos modelos es el denominado *kindling* o encendido. Goddard *et al.* (1969) introdujeron este término para indicar el desarrollo progresivo de los cambios conductuales y EEG que culminan en crisis convulsivas generalizadas (CCG). El desarrollo del *kindling* es en respuesta a la aplicación repetida de estímulos eléctricos, inicialmente subconvulsivos, en sitios específicos del cerebro.

El modelo de *kindling* ofrece varias ventajas sobre otros modelos de epilepsia experimental. Entre las propiedades del *kindling* eléctrico se encuentran las siguientes: ausencia de sustancias químicas extrañas al organismo; el sitio anatómico del lugar que se estimula puede ser elegido, dependiendo del objetivo del experimento; la naturaleza del estímulo permite establecer mejores estrategias de experimentación, es decir, el estímulo se

puede controlar de tal forma que se apliquen intensidades de estimulación que siempre desencadenen crisis convulsivas (estímulos supraumbrales) o intensidades que permitan provocar cambios en el tejido nervioso de manera gradual y progresiva (estímulos subumbrales), de manera que reflejen lo que sucede en el hombre. Estas características hacen del *kindling* un modelo altamente reproducible, que permite una gran variedad de estrategias experimentales durante el curso de la epileptogénesis (Goddard *et al.*, 1969).

### **3.4 Kindling.-**

Goddard *et al.* en 1969 describieron el modelo de epilepsia experimental llamado *kindling*. Este modelo surgió durante un estudio sobre los procesos de aprendizaje en ratas durante la estimulación eléctrica en el cerebro. Goddard *et al.* (1969) observaron que al aplicar estímulos eléctricos subconvulsivos en diferentes regiones del sistema límbico, en especial en la amígdala, se desarrollaban convulsiones después de varios estímulos. Así, el estímulo inicial ocasionaba cambios mínimos en la conducta del animal y en el EEG pero al aumentar el número de estímulos comenzaban a presentarse cambios en el EEG posteriores al estímulo. Estos cambios o posdescargas fueron cada vez de mayor amplitud, duración y complejidad y estuvieron acompañados de cambios conductuales progresivos que clasificó Racine para la rata en (1972b):

Fase 1. Cierre del ojo ipsilateral, retracción, quieta.

Fase 2. Masticación, balanceo de la cabeza búsqueda, automatismos.

Fase 3. Sacudidas, clonus de las patas anteriores.

Fase 4. Posición de canguro con clonus.

Fase 5. Clonus con caída.

Es importante resaltar que las fases conductuales son progresivas y acumulativas.

Delgado y Sevillano (1961) reportaron alteraciones similares a la estimulación eléctrica repetida de la amígdala, sin embargo; Goddard *et al.* (1969) fueron los primeros en reconocer su uso potencial como un modelo de epilepsia, aprendizaje y memoria.

El *kindling* hace referencia a los cambios progresivos que se presentan en respuesta a estímulos eléctricos repetidos en un sitio especial. Para el desarrollo del *kindling* es necesaria la presencia de posdescargas posterior al estímulo eléctrico (Racine, 1972a). El *kindling* es un proceso dinámico durante el cual las conexiones sinápticas y demás mecanismos asociados se activan. *Kindling* se refiere al período de estimulaciones durante el cual se desarrollan cambios hasta un estado estable con crisis generalizadas tónico-clónicas llamado *kindled*. El proceso del *kindling* puede ligarse con algunos aspectos del aprendizaje, correspondiendo a una etapa de adaptación mientras que el estado *kindled* al recuerdo de una actividad previamente aprendida (Joy, 1985).

La respuesta que encontramos durante la evolución del *kindling* es progresiva hasta el estado *kindled* donde se presentan crisis generalizadas con las siguientes características: 1) pueden ser registradas en la mayoría de las regiones del SNC (patrón generalizado), 2) se acompañan de manifestaciones motoras y autonómicas, 3) se presentan con cada estimulación, 4) su duración y su evolución son estables y estereotipadas, 5) el umbral de estimulación es estable y menor que el umbral necesario para desarrollar una crisis al inicio del *kindling*, 6) es un proceso permanente o de larga duración aún durante meses o años sin estimulación y sin haberse encontrado la manera de revertirlo (Goddard *et al.*, 1969; Racine, 1972a; Joy, 1985; McNamara *et al.*, 1980; Kalichman, 1982).

El reporte inicial de Goddard *et al.* (1969) se basó en experimentos con ratas Wistar, gatos y monos Rhesus. Estudios posteriores en otros animales como rana, lagarto, ratón, gerbo, conejo, perro, mono baboon, entre otros, también demostraron el desarrollo del *kindling* (McNamara *et al.*, 1980; Joy, 1985).

El desarrollo del *kindling* parece ser una propiedad universal del sistema nervioso (Goddard *et al.*, 1969). El *kindling* en general se desarrolla más rápidamente en animales filogenéticamente menos evolucionados, independientemente del sitio de estimulación empleado. Ocurre más rápidamente en la rata, seguida por el gato y mono (Joy, 1985). El *kindling* se desarrolla también más fácilmente en las estructuras cerebrales

filogenéticamente más antiguas, ocurre más rápido en la amígdala que en la corteza entorrinal (Joy, 1985; Goddard *et al.*, 1969).

Las áreas positivas (para *kindling*) fueron divididas por Goddard *et al.* (1969) de acuerdo al tipo de crisis que presentaron en: 1) el campo antero-límbico, que presentó crisis tónico-clónicas con una latencia muy corta, 2) el sistema olfatorio-límbico, que presentó crisis de predominio clónico con una latencia gradual y progresiva. El campo antero-límbico corresponde a un área de corteza cerebral cercana a las fibras del cíngulo entre las áreas 24, 10 y 6 de Brodman. Cain *et al.* (1977) describió que la estimulación de los cuerpos geniculados tanto mediales como laterales también desarrollaban el *kindling* de una manera abrupta e inicialmente con crisis generalizadas de manera muy similar al campo antero-límbico de Goddard *et al.* (1969). El sistema olfatorio-límbico se extiende desde los bulbos olfatorios a la corteza entorrinal incluyendo la región septal y el hipocampo.

Algunas de las regiones relacionadas con el sistema límbico que pertenecen al sistema extrapiramidal también son positivas, en especial el globus pallidus. El núcleo caudado y putamen son puntos positivos pero con una respuesta variable. Las áreas más dorsales del sistema extrapiramidal como el núcleo rojo, sustancia *nigra* y cerebelo son negativos. Algunas áreas del tronco cerebral como la formación reticular, la sustancia gris central, los núcleos ventrales del tegmento y el tectum mesencefálico también son negativas (Goddard *et al.*, 1969). Fernández Guardiola *et al.* en 1981 agregaron a estas áreas negativas el núcleo del rafe dorsal.

El número de estímulos necesarios para el desarrollo del *kindling* varía de acuerdo con la región, siendo la amígdala la que requiere menor número de estímulos. Los estudios iniciales de Goddard *et al.* (1969) no encontraron ninguna diferencia entre los diferentes núcleos amigdalinos, sin embargo Cain y Corcoran (1985) reportaron que el área amigdalina anterior evoluciona más rápido al estado *kindled* que áreas más posteriores.

La hora y la periodicidad de la aplicación de los estímulos así como sexo del animal parecen tener influencia en el desarrollo del *kindling* (Joy, 1985; McNamara *et al.*, 1980 Goddard *et al.*, 1969). Las estimulaciones diarias a las 22:00 h durante la fase activa del ciclo de la rata son más eficientes que los estímulos diarios a las 10:00 h. durante la fase inactiva para llegar al estado *kindled* (Joy, 1985). Esto es contradictorio con el hecho de que durante el sueño se presentan la mayor parte de las crisis epilépticas en el humano (Malow, 1996).

Asimismo, se requiere un mayor número de estímulos para desarrollar el *kindling* cuando estos se aplican en intervalos menores de 12 h. Cuando los estímulos son en intervalos menores a 30 min. ocasionan adaptación, sin llegar a desarrollar el *kindling* (Goddard *et al.*, 1969; McNamara *et al.*, 1980). Este evento se tratará más adelante.

En la rata hembra se encuentran variaciones dependiendo de la etapa del ciclo estral (ovárico) en que se encuentre. Las variaciones no se reflejan en la duración de las posdescargas ni en el cambio conductual, solamente en la

respuesta diaria. Estas variaciones son eliminadas mediante ovariectomía (Joy, 1985).

La naturaleza del estímulo eléctrico también es importante para el desarrollo del *kindling*. Un protocolo que se utiliza con frecuencia consiste en la administración diaria de estímulos de 1 s de duración con pulsos cuadrados de 1 ms a una frecuencia de 60 Hz (en el presente trabajo se utiliza este protocolo). Estímulos a frecuencias de 25, 60 o 150 Hz son igualmente efectivos para el desarrollo del *kindling* (Goddard *et al.*, 1969). En contraste, la aplicación de 60 pulsos de 1 ms de duración a la frecuencia de 1 por segundo no produce ninguna respuesta (McNamara *et al.*, 1980). El *kindling* se desarrolla de igual manera cuando se utilizan pulsos cuadrados o sinusoidales y con trenes de duración de 1 s ó 60 s. Los estímulos a una frecuencia de 60 Hz son más efectivos para ocasionar una crisis en el animal *kindled* que los estímulos a frecuencias de 25 ó 150 Hz.

Como se mencionó anteriormente, los estímulos con un intervalo menor de 30 min. ocasionan adaptación (Goddard *et al.*, 1969; Joy, 1985). Este fenómeno de adaptación parece corresponder a un mecanismo de inhibición. Se han descrito mecanismos de inhibición de corta y de larga duración durante el *kindling* (McNamara *et al.*, 1980).

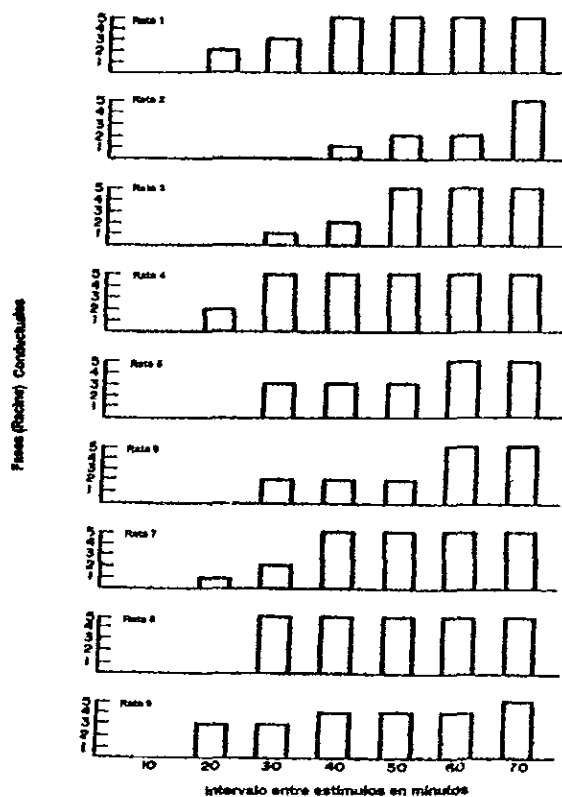
La inhibición de corta duración se demuestra en animales en el estado *kindled* a los que se les estimula en diferentes tiempos (Goddard *et al.*, 1969). Los estímulos con un intervalo de 10 min. no producen respuesta conductual y al incrementar el intervalo de los estímulos, la respuesta es más evidente,



hasta regresar a la basal cuando el período entre estímulos es de 70 min. (fig. 3) (McNamara *et al.*, 1980).

La inhibición de larga duración se demuestra mediante la estimulación repetida (19 estímulos) en animales en estado *kindled* a un intervalo de 90 min. A pesar de este esquema intensivo de estimulación no hay disminución del nivel basal de las crisis. La estimulación de estos mismos animales 24 h después, ocasiona una disminución muy importante de la intensidad y duración de las crisis. Este efecto de inhibición desaparece gradualmente durante los siguientes 5 días (McNamara *et al.*, 1980; Goddard *et al.*, 1969).

Los mecanismo por los cuales se presentan estos períodos de inhibición no son claros, en especial la inhibición de larga duración que no se puede adjudicar al agotamiento neuronal (McNamara *et al.*, 1980).



**Fig. 3 Inhibición de Corta duración.**

El grado de inhibición de la fase conductual (ordenada) posterior a la crisis disminuye progresivamente, desapareciendo por completo cuando el intervalo entre estímulos es de 70 min. (absisa)

(Ilustración tomada de McNamara et al., 1980).

El *kindling* produce importantes cambios en la función y conectividad neuronal, como se mencionó previamente. Los cambios que pudieran estar involucrados son la formación de nuevas conexiones sinápticas o el reordenamiento de conexiones preexistentes (Goddard et al., 1969; McNamara et al., 1980). Con el empleo de técnicas de microscopía tanto óptica como electrónica se han descrito algunos cambios morfológicos como son: alteraciones en la arquitectura sináptica; reorganización de las conexiones

sinápticas de las fibras musgosas del hipocampo; muerte o pérdida neuronal en poblaciones neuronales específicas del sistema límbico (Sutula *et al.*, 1994). Sin embargo, no existe alguno de ellos que se presente de manera consistente (McNamara *et al.*, 1980; McNamara, 1984, 1986; Girgis, 1981; Joy, 1985).

Los cambios funcionales se pueden encontrar en el sitio primario de estimulación y en otras regiones de cerebro (sitios secundarios) (Joy, 1985). Los cambios más evidentes en el sitio primario de estimulación son: 1) la reducción del umbral para provocar una posdescarga durante la evolución del *kindling* y su estabilidad en el estado *kindled* (Racine, 1972a), 2) el incremento en la duración de las posdescargas durante el *kindling* (Racine, 1972b), 3) el aumento gradual de la complejidad en la morfología de las posdescargas (Racine, 1972b).

Los sitios de proyección de las áreas primarias de estimulación van involucrándose en los cambios electrofisiológicos descritos para el sitio primario. Las posdescargas llegan a ser más prominentes y complejas en los sitios secundarios hasta poder ser registradas en cualquier área del cerebro ante una crisis generalizada (Racine, 1972b; McNamara *et al.*, 1980).

En resumen, el *kindling* eléctrico amigdalino ofrece varias ventajas para su estudio, al ser comparado con otros modelos experimentales de epilepsia: 1) se puede inducir por la estimulación de un área específica del cerebro; 2) presenta un desarrollo gradual y progresivo, el cual puede ser caracterizado por diferentes fases conductuales y EEG; 3) produce cambios que son irreversibles y permanentes; 4) su desarrollo gradual permite estudiar los

cambios conductuales, electroencefalográficos y bioquímicos que acompañan a la evolución del proceso epiléptico (McNamara *et al.*, 1980; Talavera *et al.*, 1989; 1998; Hernández y Condés-Lara, 1989, 1992).

Las características que validan al modelo del *kindling* como paradigma de epilepsia, en especial del tipo parcial compleja secundariamente generalizada son: la presencia de crisis espontáneas; el comportamiento del animal durante la crisis semeja las crisis parciales complejas secundariamente generalizadas del humano; los cambios en el EEG son similares a los registros en amígdala e hipocampo de pacientes con epilepsia parcial compleja; se presentan espigas interictales tanto en el animal *kindling* como en el humano con epilepsia; hay gran correspondencia en el efecto de los fármacos anticonvulsivantes; la evolución de la esclerosis hipocampal es paralela en el animal *kindling* y en humanos con epilepsia parcial compleja (McNamara, 1986; Sutula *et al.*, 1994; Sloviter, 1994).

Ahora bien, existen evidencias clínicas que relacionan la epileptogénesis del humano con el mecanismo de *kindling*, por ejemplo: la presencia del foco en espejo; en el humano la estimulación eléctrica repetida ocasiona epilepsia; la latencia entre un trauma encefálico y la presencia de actividad epiléptica (McNamara, 1986; Lopes da Silva *et al.*, 1992).

Se debe aclarar que nos hemos referido específicamente al *kindling* eléctrico ya que también se ha descrito el *kindling* químico que se desarrolla por la aplicación de sustancias en dosis subconvulsivas, algunas de manera

sistémica y otras en áreas cerebrales específicas (Fernández-Guardiola, 1992; Fernández-Guardiola *et al.*, 1995; McNamara, 1986).

El estudio de diferentes aspectos neuroquímicos en el *kindling* eléctrico ha permitido conocer la participación de distintas sustancias neurotransmisoras ó neuromoduladores en el fenómeno epiléptico, por ejemplo el GABA, la serotonina, las catecolaminas, los aminoácidos excitatorios, los neuropéptidos y el óxido nítrico (ON).

Así se han descrito modificaciones en la concentración de los péptidos *met-* y *leu-* encefalina, así como alteraciones en la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa, dependiente de serotonina y noradrenalina, cambios en el transporte axonal y en la cantidad de células que producen el óxido nítrico (Hernández y Condés-Lara, 1989, 1992; Martínez-Lorenzana, 1998; Talavera, *et al.*, 1989, 1998).

Un dato interesante es el obtenido a partir de tejido glial y neuronal de ratas *kindled*, que al ser sometidos a diferentes concentraciones de serotonina y noradrenalina permiten evidenciar la disfunción de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa como consecuencia del estado epiléptico. Los resultados dan una importancia mayor a las alteraciones de la bomba en tejido glial en comparación con el tejido neuronal (Hernández y Condés-Lara, 1992).

#### 4. Bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

La bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa (bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> adenosintrifosfohidrolasa estimulada por Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, dependiente de Mg<sup>++</sup>, EC 3.6.1.3) en su forma más simple se encuentra formada por una subunidad catalítica  $\alpha$  (90 a 135 KDa) y una subunidad glicoproteica  $\beta$  (35 a 57 Kda) en cantidades equimolares.

La subunidad  $\alpha$  es una proteína integral de la membrana celular que la atraviesa de 6 a 10 veces dependiendo de los diferentes modelos descritos y presenta sitios funcionales específicos para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, ATP, Pi y ouabaína (Stephen y Amira, 1995; Hernández, 1992).

Existen 3 isoformas identificadas de la subunidad  $\alpha$  que se clasifican de acuerdo a su afinidad por la ouabaína siendo la  $\alpha_1$  aquella con muy baja afinidad,  $\alpha_2$  presenta afinidad intermedia y  $\alpha_3$  tiene alta afinidad (Sweadner, 1992). También cada isoforma presenta una diferencia en la afinidad para los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, teniendo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  una afinidad similar ( $K_{0.5}=0.2\text{mM}$ ) para el K<sup>+</sup> extracelular siendo ésta aproximadamente 2.5 veces superior que la afinidad de  $\alpha_3$  ( $K_{0.5}=0.09\text{mM}$ ). Por otro lado  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  tienen una afinidad similar por el Na<sup>+</sup> intracelular ( $K_{0.5}=17-19\text{mM}$ ), que en este caso es aproximadamente 3 veces inferior a la que presenta  $\alpha_3$  ( $K_{0.5}=63\text{mM}$ ) (Stephen y Amira, 1995). Las 3 isoformas pueden ser expresadas por células neuronales. La glía solo expresa las isoformas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Antonelli *et al.*, 1998; Cameron *et al.*, 1994). Recientemente se identificó que la isoforma  $\alpha_2$  es la que participa en la respuesta de la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa a la serotonina (Antonelli *et al.*, 1998).

La subunidad  $\beta$  solamente atraviesa la membrana celular en una ocasión, teniendo una gran porción extracelular que se encuentra altamente glicosilada. El grado de glicosilación varía en cada tejido y por lo mismo varía su peso molecular (Stephen y Amira, 1995). Se han identificado 3 isoformas:  $\beta 1$ , que se expresa en la mayoría de los tipos celulares;  $\beta 2$ , que fue clonada del cerebro de ratón y de rata, encontrándose expresada de acuerdo con Cameron *et al.* (1994) solamente en astrocitos corticales y;  $\beta 3$ , que recientemente se encontró en el sistema nervioso de los anfibios (Stephen y Amira, 1995).

La subunidad  $\beta$  parece ser la encargada de la estabilidad en la estructura de la bomba y de la unión del  $K^+$  a la subunidad  $\alpha$ . El complejo formado por las isoformas  $\alpha 3/\beta 2$  presenta mayor afinidad al  $Na^+$  que el formado por las isoformas  $\alpha 3/\beta 1$  (Cameron *et al.*, 1994), esto sugiere que la subunidad  $\beta$  también participa en regular la afinidad para el  $Na^+$ . Hay también evidencia de su participación en el ensamble de la bomba y en su distribución en la membrana celular. La  $\beta 2$  presenta homología estructural con la molécula de adhesión AMOG, que es expresada por la glia, por lo que se sugiere que ésta isoforma interactúa con las células adyacentes probablemente restringiendo la bomba a regiones específicas de la membrana (Hernández, 1992; Cameron *et al.*, 1994; Stephen y Amira, 1995).

La bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa se encarga de transportar  $Na^+$  hacia el exterior de la célula y  $K^+$  hacia el interior, esto con gasto de energía a partir de ATP. La relación de transporte de estos iones es 3 a 2 respectivamente originando de manera absoluta la pérdida de 1 catión intracelular. La función

de la bomba está relacionada con la conservación o recuperación del potencial de reposo en las células excitables, del mantenimiento del volumen celular, de la recaptura de neurotransmisores, entre otras funciones (Hernández, 1992; Cameron *et al.*, 1994).

La actividad de la bomba está regulada principalmente por la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular, esto se debe a que la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular es suficiente para ocupar todos los sitios activos para este ion, pero la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular en condiciones normales ocupa menos de la mitad de sus sitios activos (Stahl, 1986). Sweadner en 1992 propone que la bomba  $[\text{Na}^+/\text{K}^+]$  ATPasa glial es estimulada principalmente por la concentración extracelular de  $\text{K}^+$ . Esta propuesta implica un aumento en la afinidad intracelular para el  $\text{Na}^+$  y una disminución para el  $\text{K}^+$  (Sweadner, 1992) con respecto a la bomba existente en otros tipos celulares. Esto es acorde con el hecho de que los astrocitos sólo expresan  $\beta_2$  y la bomba existente,  $\alpha_3/\beta_2$ , tienen mayor afinidad por el  $\text{Na}^+$ , como se mencionó anteriormente.

Otros moduladores intrínsecos del sistema  $[\text{Na}^+/\text{K}^+]$  ATPasa son el ATP como fuente de energía y el  $\text{Mg}^{++}$  como substrato primario del ATP (Hernández, 1992). Se han identificado diversos moduladores extrínsecos como son las hormonas: insulina, glucagón, tiroxina, los corticoesteroides, la aldosterona y algunos neurotransmisores como norepinefrina y serotonina (Hernández, 1992; Stephen y Amira, 1995). La serotonina es el objeto de estudio del presente trabajo.



Mercado y Hernández en 1992 encuentran que 5-HT (5-hidroxi-triptamina) no altera la cinética enzimática de la bomba con concentraciones de  $K^+$  menores a 10 mM. Esto apoya lo descrito por Kimelberg (1978) y Grisar (1979) donde proponen que la activación de la bomba a concentraciones inferiores a 5 mM de  $K^+$  corresponde a la bomba neuronal y mayores concentraciones activan la bomba glial.

#### **4.1 Bomba de $Na^+/K^+$ y Serotonina**

La actividad de la bomba [ $Na^+/K^+$ ] ATPasa cerebral se incrementa de manera sensible al aumento agudo y crónico de 5-HT (Hernández, 1992), incluso en el caso de la administración de L-triptofano, bufotenida o la quipazina (ambos inhibidores de la enzima monoamino oxidasa) aumenta la actividad de la bomba de manera dosis dependiente. Por otro lado se suprime la actividad de la bomba al administrar metisergida y ciproheptadina que son antagonistas serotoninérgicos (Hernández, 1982).

También se encontró que en los cerebros depletados del sistema serotoninérgico, mediante la administración neonatal de 5,7-DHT (5,7 dihidroxi-triptamina), la actividad de la bomba es superior a los controles lo que sugiere que este aumento está asociado a una hipersensibilidad de los receptores a 5-HT después de la deprivación crónica de serotonina (Hernández 1982).

Con los antecedentes mencionados se tienen evidencias suficientes para postular que la bomba [ $Na^+/K^+$ ] ATPasa es sensible a la estimulación de

algún receptor para la serotonina. Los astrocitos presentan los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub> para serotonina (Kimelberg, 1995). El receptor 5-HT<sub>1A</sub> ha sido involucrado recientemente en modular la actividad de la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa de fracciones gliales procedentes de la corteza cerebral y en tejido hipocampal (Peña-Rangel *et al.*, en prensa).

Vizi y Oberfrank (1992) proponen que la actividad de la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa sensible a norepinefrina es por dos mecanismos: 1) por estimulación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\beta$  que como vía final de su estimulación fosforile la subunidad catalítica  $\alpha$  por medio de la proteína quinasa C; 2) por quelación de metales que estén interfiriendo a manera de moléculas del tipo de la ouabaína sobre la subunidad catalítica  $\alpha$ . No sabemos si 5-HT presenta también una actividad quelante, sin embargo la evidencia ya mencionada es suficiente para inferir una actividad por estimulación de su receptor. Además se ha demostrado mediante estudios de cinética de ATP, K<sup>+</sup> y de unión a la [<sup>3</sup>H]ouabaina que la serotonina estimula la actividad de la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa glial incrementado los sitios activos de la enzima (Mercado y Hernández, 1992).

La actividad de 5-HT sobre la la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa parece ser más específica sobre células gliales en el SNC. Experimentos comparando su actividad en neuronas y glia demostraron solamente actividad sobre la glia de una forma concentración dependiente (Mercado y Hernández 1992). En las ratas *kindled* se encontró una disminución en la respuesta glial de la bomba

[Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa dependiente de serotonina, no así en la actividad neuronal de la misma (Hernández y Condés-Lara, 1989, 1992).

De lo anterior se concluye que la disminución en la actividad del complejo enzimático llamado bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa en el animal con epilepsia experimental *kindling* está relacionado al sistema receptor-segundo mensajero-bomba, inclinándonos por una interferencia posterior al receptor debido a que la respuesta a noradrenalina (NE) en homogeneizados de corteza cerebral de ratas *kindling* también se encuentra disminuida (Hernández, Condés-Lara, 1992), esto hace pensar en una vía común de bloqueo.

Los neurotransmisores monoaminérgicos (dopamina (DA), NE, 5-HT) tienen acciones principalmente inhibitorias en la corteza cerebral (Goldstein *et al.*, 1988). Estudios en tejido cerebral sobre la concentración de éstos demuestran resultados contradictorios en animales y humanos con epilepsia (Kalichman, 1982; Cavalheiro *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1988; Fernández-Guardiola, 1992).

Hay evidencias de que un aumento en la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica como la observada en los recientes experimentos con fluoxetina, sertralina y otros inhibidores de la recaptura de serotonina, así como con el uso de algunos agonistas (en especial para 5-HT<sub>1A</sub>), aumenta el umbral convulsivo y coadyuva la actividad de drogas como carbamazepina y las benzodiazepinas en el control de las crisis (Kalichman, 1982; Yan *et al.*, 1995; Salgado y Alkadhi, 1995; Fernández Guardiola, 1992; Wada *et al.*, 1993a y b).

Ahora bien, las neuronas serotoninérgicas se encuentran distribuidas principalmente formando los núcleos del rafe y sus prolongaciones axónicas se encuentran a todo lo largo del encéfalo y de la medula espinal (McGrear, 1987). Dahlström y Fuxe en 1964 propusieron una clasificación para estas células agrupándolas en 9 grupos a lo largo del tallo cerebral, numerados de B1 a B9. El grupo principal por su alta concentración de células serotoninérgicas corresponde al núcleo del rafe dorsal (B7). Así, de acuerdo con Wiklund y Björklund en 1980, la concentración de células productoras de 5-HT en el grupo B7, es del 70% en el gato.

Un dato muy importante que relaciona la actividad serotoninérgica con la inhibición de la actividad epiléptica es que mediante la estimulación eléctrica de los núcleos mediales del rafe se bloquea esta actividad, probablemente por un aumento en la liberación de 5-HT en el hipocampo (Wada *et al.*, 1993 a y b; Kovacz y Zoll, 1974).

Los receptores más extensamente estudiados para 5-HT en el SNC son del subtipo 5-HT<sub>1A</sub>. Su estimulación en el hipocampo también aumenta el umbral para el desarrollo de las crisis convulsivas, sin embargo su estimulación en el rafe lo disminuye (Wada *et al.*, 1993a y b; Salgado y Alkadhi, 1995; Peroutka, 1988). Esto sugiere que tienen una acción con un efecto autoinhibitorio en el rafe. En el hipocampo el aumento en el umbral convulsivo se puede deber a una hiperpolarización de las membranas neuronales (Salgado y Alkadhi, 1995; Peroutka, 1988), además de la activación de la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa. En el hipocampo la bomba es estimulada por medio de

los receptores 5-HT<sub>1A</sub> gliales (Peña-Rangel *et al.*, en prensa) en el cerebro normal. En el cerebro epiléptico la respuesta a 5-HT desaparece, sugiriendo un trastorno en el equilibrio catiónico que puede contribuir al estado convulsivo.

Un hecho interesante es que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se encuentran aumentados durante el *kindling* amigdalino solamente en el giro dentado (preferentemente en la capa polimórfica) y no en otras regiones del encéfalo (Clark y Weis, 1993; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993).

Se ha encontrado en ratas normales una distribución heterogénea del receptor 5HTA<sub>1</sub> en las células gliales. La estimulación de este receptor en la glia, induce la síntesis del factor de crecimiento S-100 $\beta$ , tanto en el desarrollo fetal como en el animal maduro. Esto relaciona la función del receptor 5HTA<sub>1</sub> con procesos de plasticidad neuronal probablemente regulando la formación de nuevos procesos sinápticos en la etapa adulta (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993).

Se conoce que la 5-HT activa la bomba [Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>] ATPasa preferentemente en tejido glial y durante el *kindling* la respuesta de la bomba en la glia se encuentra disminuida requiriendo concentraciones más grandes de serotonina para funcionar (*in-vitro*) (Hernández y Condés-Lara, 1989, 1992). Es evidente que el *kindling* modifica la actividad normal de la célula glial dando como consecuencia una alteración en la función neuronal.

## **5. Transplantes en el Sistema Nervioso Central.**

El uso de transplantes en el SNC es una técnica que comenzó a utilizarse desde finales del siglo pasado, pero su estudio y utilización rigurosa ha sido durante los últimos 20 años (Gash, 1984; Björklund y Stenevi, 1984).

W. Gilman Thompson, en 1890, y Saltykow, en 1905, fueron los primeros en reportar resultados de transplantes de tejido adulto de SNC, pero fueron D'Abundo, en 1913, y Altobelli, en 1914, quienes reportaron una buena supervivencia de los tejidos neurales transplantados (Gash, 1984).

Elizabeth Hopkins Dunn en el período de 1903 a 1917 hizo 2 importantes contribuciones: 1) demuestra que el tejido fetal puede ser transplantado y 2) los transplantes colocados en camas con rica vascularización tienen una mayor supervivencia (Gash, 1984). En 1930 el mexicano Raoul M. May ratificó que la edad del tejido donador es un importante factor de supervivencia y que los transplantes se desarrollan mejor en lugares inmunológicamente privilegiados como el ojo, sugirió además en 1945 la importancia de la presencia de factores neurotróficos para favorecer el crecimiento de tejido transplantado (Gash, 1984).

Los trabajos de Le Gros Clark's (1940) tienen especial importancia ya que demuestran la sobrevivencia de transplantes de tejido fetal y además realizó el primer trasplante neural en un humano. (Gash, 1984; Björklund y Stenevi, 1984).

El mayor desarrollo en el estudio de los trasplantes en el SNC, ha sido a partir de 1970. Entre las publicaciones de mayor importancia se encuentran las de Olson y Malmfors (1970) que iniciaron el estudio de la identificación química del tejido transplantado; Hoffer y Seiger en 1974 demostraron que el tejido transplantado conserva sus características electrofisiológicas; Lund y Heuschka en 1976 demostraron la funcionalidad de las conexiones entre el huésped y trasplante.

Perlow *et al.* (1979) desarrollaron un modelo animal de la enfermedad de Parkinson y demostraron que el trasplante de sustancia *nigra* fetal revierte las anomalías motoras en éste modelo (Gash, 1984; Giordano y Freed, 1995). Un año después Gash revirtió la diabetes insípida de las ratas *Brattleboro* al transplantar células hipotalámicas productoras de hormona antidiurética (Gash, 1984).

Actualmente la utilización de trasplantes del SNC se ha convertido en una técnica de gran utilidad en el estudio de la neurobiología, como lo demuestra el creciente número de publicaciones existentes (Gash, 1984; Björklund y Stenevi, 1984).

Los trasplantes cerebrales permiten estudiar aspectos anatómicos y funcionales en el desarrollo, diferenciación y regeneración de diferentes sistemas neurales (Björklund y Stenevi, 1984). Además, permiten resaltar la importancia de estructuras o sistemas de neurotransmisión en diversas funciones como el sueño y el aprendizaje (Giordano y Freed, 1995; Drucker-Colín *et al.*, 1984; Richter-Levin-Levin *et al.*, 1993; Richter-Levin-Levin y Segal,

1991) y han ayudado a explicar la fisiopatología de enfermedades como el mal de Parkinson (Spencer *et al.*, 1992; Madrazo *et al.*, 1987), la corea de Huntington (Giordano y Freed, 1995; Giordano *et al.*, 1988), alteraciones neuroendócrinas (Gash, 1984) e incluso deficiencias congénitas como las observadas en los ratones *shiverer* (Seilhean *et al.*, 1996). Los trasplantes en el SNC también se plantean como alternativa terapéutica para enfermedades degenerativas del sistema nervioso como el mal de Parkinson (Spencer *et al.*, 1992; Madrazo *et al.*, 1987; Nikkhah *et al.*, 1994) y la corea de Huntington (Lindvall, 1991) e incluso en problemas agudos como la sección medular en un intento por inducir la regeneración de las vías afectadas (Gash, 1984).

### **5.1 Trasplantes Neurales y Epilepsia.**

El uso de trasplantes cerebrales ha sido estudiado principalmente en patologías donde hay deficiencia en algún neurotransmisor o en algún grupo determinado de neuronas. En el caso de la epilepsia estas deficiencias no son tan bien definidas y los estudios han sido enfocados principalmente a la demostración de un aumento de actividad de los sistemas excitadores y/o una disminución en los sistemas inhibitorios.

Los trasplantes cerebrales en el estudio de la epilepsia deben de ser utilizados para comprobar hipótesis específicas sobre la participación crítica de algún tipo celular, sustancia o modulador en el fenómeno epiléptico o de epileptización en una región determinada (Schwartzkroin y Lindvall, 1991). Por



ejemplo el trasplante de neuronas productoras de algún neurotransmisor libera el neurotransmisor en una región determinada con un patrón más fisiológico que la administración sistémica o local de la sustancia (Schwartzkroin y Lindvall, 1991).

Se ha estudiado, en animales, el efecto de los trasplantes noradrenérgicos en la evolución y el establecimiento del *kindling* (Bengzon *et al.*, 1993, 1990, 1991; Barry *et al.*, 1987, 1989). Barry *et al.* (1987) encontraron un retraso en la evolución del *kindling* sin efecto en el *kindled* establecido. Tal retraso se encuentra únicamente en animales transplantados que previamente fueron depletados químicamente de sus aferencias noradrenérgicas procedentes del *locus coeruleus*. En animales transplantados sin la depleción del sistema, no se encuentra retraso en la evolución del *kindling* (Bengzon, 1991, 1993). El retraso en la evolución del *kindling* está relacionado con la densidad de inervación por el trasplante en el hipocampo receptor (Barry *et al.*, 1987) siendo mayor el efecto cuando el trasplante es en ambos hipocampos (Barry *et al.*, 1989). El trasplante de células noradrenérgicas no únicamente tiene efecto cuando se localiza en el hipocampo. Barry *et al.* (1989) encontraron que el trasplante bilateral en amígdala y corteza piriforme también retrasa la evolución del *kindling*. La acción del trasplante noradrenérgico en la evolución del *kindling* parece ser mediado por la acción de la noradrenalina sobre los receptores  $\beta_2$  postsinápticos (Bengzon *et al.*, 1990).

En otros modelos de epilepsia, como los producidos por cobalto, PTZ, ácido kaínico o electrochoques, se encontró una reducción en la severidad y

duración de las crisis en animales con los trasplantes noradrenérgicos (Bengzon *et al.*, 1993). También se ha logrado disminuir la severidad de las crisis en ratas genéticamente epilépticas (GEPRs 9) mediante trasplantes noradrenérgicos colocados en el tercer ventrículo (Holmes *et al.*, 1992).

Otro estudio que ratifica la importancia del sistema noradrenérgico en la supresión de la actividad epiléptica es el realizado por Buzsáki *et al.* (1988) donde se cortaron todas las aferencias al hipocampo, lo que ocasionó actividad de tipo epileptiforme en esta estructura y posteriormente se logró revertirla mediante trasplantes noradrenérgicos en el hipocampo.

De la misma forma se han realizado trasplantes de hipocampo, cerebelo, corteza cerebral, puente y neuronas GABAérgicas en diferentes regiones del encéfalo, encontrándose resultados contradictorios (Buzsáki *et al.*, 1991; Miyamoto *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1987; Fine *et al.*, 1990; Stevens *et al.*, 1988; Clough *et al.*, 1991; Holmes *et al.*, 1992; Loscher *et al.*, 1998).

El trasplante de células serotoninérgicas, posterior a la depleción química de este sistema con 5,7-dihidroxitriptamina, restablece los parámetros normales en el *kindling* (Camu *et al.*, 1990). La depleción serotoninérgica se realizó en el bulbo olfatorio, mismo lugar que fué estimulado durante el paradigma de *kindling*. En los animales depletados se acelera la evolución del *kindling* y en los animales transplantados que previamente fueron depletados se restablecen los parámetros originales del *kindling*. Debe de resaltarse que el efecto del trasplante, normalizando los parámetros del *kindling*, solamente se logra al transplantar tejido con células serotoninérgicas y no otros tejidos. En

este experimento los trasplantes se localizaron en el mismo bulbo olfatorio previamente depletado.

También se ha demostrado que el trasplante de rafe fetal en el tercer ventrículo de ratas genéticamente epilépticas (GEPR 9), disminuye la severidad de las crisis (Clough *et al.*, 1996).

## **5.2 Variedades de Trasplantes.**

Existen diferentes técnicas para la realización de trasplantes en el sistema nervioso. De manera general, los trasplantes se realizan con células disociadas, semidisociadas o en bloque dependiendo del lugar y la finalidad del trasplante (Björklund y Dunnet, 1991; Björklund y Stenevi, 1984; Das *et al.*, 1979; Giordano y Freed, 1995).

El trasplante de tejido en bloque es el método de más tradición (Björklund y Dunnet, 1991). En éste, el tejido es implantado en cavidades naturales como en el sistema ventricular, el ojo o en cavidades preparadas quirúrgicamente en el momento o con anterioridad. Este tipo de trasplantes tienen poco éxito si se realiza en el parénquima (Björklund y Dunnet, 1991; Giordano y Freed, 1995). Los trasplantes de tejido en bloque son adecuados para estudiar el efecto de la liberación de neurotransmisores, de factores tróficos, para observar las características de reinervación, diferenciación e integración del tejido transplantado especialmente a la corteza y el cerebelo (Giordano y Freed, 1995).

El trasplante de células disociadas permite utilizar las células procedentes de alguna estructura, inmediatamente después de disociarlas (incubación en tripsina por 20 minutos) o procedentes de un cultivo (Björklund y Dunnet, 1991; Brudin, 1991). Esta técnica se desarrolló debido a las dificultades que se presentan al implantar tejido sólido en parénquima. Inicialmente fue usada para transplantar células catecolaminérgicas y colinérgicas en el cuerpo neoestriado y en el hipocampo (Björklund y Dunnet, 1991). Esta técnica se prefiere cuando se necesita abarcar una amplia zona de implante, ya que permite implantaciones múltiples con poco daño al área receptora o cuando se transplanta en estructuras profundas (Giordano y Freed, 1995).

En el trasplante de células semidisociadas, el tejido es únicamente disociado por métodos mecánicos (picado). Comparte algunas ventajas de los trasplantes de células disociadas y en bloque como: permitir el desarrollo del trasplante en estructuras parenquimatosas, conservar los vasos sanguíneos originales y que las células cuyos procesos neuríticos han comenzado a formarse sobrevivan. Por lo tanto, el período crítico para la obtención del tejido es menos estrecho (Björklund y Dunnet, 1991).

La elección de la técnica depende del objetivo del estudio y en ocasiones es necesario probar varias técnicas con el objeto de comparar la supervivencia y funcionalidad del trasplante (Giordano y Freed, 1995; Björklund y Stenevi, 1984; Das *et al.*, 1979).

Cada técnica tiene ventajas y desventajas que deben de considerarse. El uso de células disociadas tiene las ventajas de que permite: transplantar en estructuras profundas y parenquimatosas sin la necesidad de preparar una cavidad, dirigir la alícuota de células mediante estereotaxia, realizar implantes múltiples, seleccionar un tipo en especial de célula, controlar el número de células a transplantar, utilizar células de varios donadores que ayuda a disminuir el error de un solo sujeto, ser poco traumático (Björklund y Dunnet, 1991; Das *et al.*, 1979).

Algunas de las ventajas de los trasplantes de tejido sólido son: el trasplante es accesible para colocar electrodos, marcadores, etc.; se puede obtener el tejido de un solo donador; utiliza sus vasos nativos para irrigarse; la edad del tejido donador es más flexible; sobreviven las células ya diferenciadas al momento del trasplante (Björklund y Dunnet, 1991; Das *et al.*, 1979).

La funcionalidad e integración de los trasplantes en el huésped han sido ampliamente comprobados (Kromer, 1984; Freed *et al.*, 1984). Existe una buena cantidad de evidencia que los trasplantes de células fetales procedentes del rafe, colocadas en alguna área cercana a la amígdala no pierden su capacidad para secretar 5-HT. Los animales transplantados, con tejido serotoninérgico, se ha encontrado que presentan niveles mayores de esta amina con respecto a los controles, valorado mediante la técnica de microdiálisis y por concentrado celular (Daszuta *et al.*, 1988, 1989; Zhou *et al.*, 1988).

Los experimentos hasta la fecha, con trasplantes serotoninérgicos, se han basado principalmente en la evaluación de modelos conductuales, en los que se demuestra la recuperación de la conducta normal posterior a los trasplantes (Richter-Levin y Segal, 1989). La mayoría de los estudios descritos para serotonina depletan al animal, en el contenido de este neurotransmisor, antes de realizar un trasplante para evidenciar la recuperación (Segal y Azmitia, 1986; Daszuta *et al.*, 1988; Richter-Levin y Segal, 1990; Richter-Levin *et al.*, 1993). Sin embargo los niveles de 5-HT aumentan aún sin depletar la 5-HT del huésped con respecto a controles no transplantados (Zhou *et al.*, 1988).

## **6. Planteamiento del Problema.**

El incremento en la concentración de serotonina, por medio de maniobras farmacológicas, ha demostrado aumentar el umbral convulsivo en diferentes preparaciones experimentales. Además, se sabe que en animales depletados del sistema serotoninérgico se restablecen los parámetros del *kindling*, después de ser transplantados con tejido productor de serotonina (Camu *et al.*, 1990). Con base en las evidencias presentadas y resaltando que el trasplante de neuronas productoras de serotonina libera el neurotransmisor con un patrón más fisiológico que la administración sistémica de un agonista, es importante analizar el efecto del trasplante, el cual, podría retrasar el proceso de epileptogénesis en el modelo del *Kindling* eléctrico amigdalino. Uno

de los objetivos de este estudio es determinar el efecto que ocasione el trasplante en el sistema no depletado de serotonina. Esperamos que el efecto corresponderá a su acción neuro-inhibidora y además a su acción como activador de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa glial.

Por otro lado, el incremento del  $K^+$  extracelular favorece la sincronización de las neuronas al aproximarlas a su umbral de despolarización (Traynelis y Dingledine, 1988). Las células gliales tienen diversas funciones homeostáticas en el espacio extracelular, entre las cuales está la modulación del  $K^+$  extracelular por medio de la actividad de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa (Kesslak y Bridges, 1994). En la epilepsia experimental la actividad de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa glial sensible a serotonina se encuentra disminuida (Hernández y Condes-Lara, 1989, 1992). Por lo anterior, el trasplante de células gliales deberá aumentar la actividad total de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa al incrementar la cantidad total de esta enzima. Esto puede tener un efecto negativo en el proceso de epilepsia gracias a sus funciones homeostáticas en el espacio extracelular.

## **7. Hipótesis.-**

De acuerdo con la información anterior, durante el fenómeno de epilepsia, se encuentra alterada la acción de la serotonina en el SNC, así como la actividad de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa glial. En esta situación se propone que:

-El trasplante de tejido fetal productor de 5-HT prevendrá la hiperactividad neuronal durante la epilepsia experimental, al incrementar el contenido cerebral de este neurotransmisor.

-El trasplante de células gliales incrementará la acción global de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa, favoreciendo este sistema homeostático que disminuirá la hiperactividad neuronal patente en el fenómeno de epilepsia.

-El efecto de los trasplantes, gliales y serotoninérgicos, será valorado mediante una mayor latencia (conductual y/o electroencefalográfica) para el desarrollo del fenómeno del *kindling*.

## **8. Objetivos.-**

El objetivo principal es determinar el efecto de los trasplantes serotoninérgicos o gliales en los parámetros conductuales y electrofisiológicos del modelo de *kindling* eléctrico amigdalino. Para esto se plantearon los siguientes objetivos:

1) Implementar la técnica del *kindling* eléctrico amigdalino en la rata, estableciendo los parámetros conductuales y electrofisiológicos en el desarrollo de este procedimiento.

2) Llevar a cabo trasplantes de tejido del rafe mesencefálico fetal de ratas, en animales que serán sometidos al procedimiento de *kindling* eléctrico amigdalino.



3) Realizar cultivos primarios de células gliales para llevar a cabo trasplantes de glia en animales que serán sometidos al procedimiento de *kindling* eléctrico amigdalino.

4) Valorar los cambios conductuales y EEG en los animales de los incisivos anteriores.

5) Comprobar por medio de la técnica de inmunohistoquímica las características de las células implantadas al finalizar el estudio de epileptización.

6) Determinar la localización de los electrodos de estimulación.

## **9. Material y Métodos.-**

### **9.1 Sujetos experimentales.-**

Se utilizaron ratas macho de las cepas Wistar y Sprague-Dawley, con un peso entre 200-310 g conservadas en cajas con ciclos de luz-obscuridad de 12 h y alimentadas con Purina Chow y agua *ad-libitum*.

Se utilizaron fetos de ratas Wistar de 14 a 16 días de edad gestacional (10 a 14 mm. céfalo-sacra), de donde se obtuvo el tejido del rafe mesencefálico y el tejido control para los trasplantes. También se utilizaron neonatos Wistar de 1 día de edad para la obtención de células gliales.

### **9.2 Grupos experimentales.-**

Se dividieron las ratas en los siguientes grupos para su estudio.

1. Grupo *kindling* (K): Ratas que se sometieron a todo el proceso del desarrollo de *kindling* sin trasplante.

2. Grupo Trasplante neuronal + *kindling* (K+T): Ratas transplantadas en el ventrículo lateral izquierdo, con tejido semidisociado procedente del rafe obtenido de fetos entre 14 y 16 días de edad (10 a 14 mm. céfalo-sacra). La colocación del electrodo de estimulación se realizó 2 semanas posteriores al trasplante. La estimulación para el desarrollo del *kindling* se inició 21 días posteriores al trasplante.

3. Grupo Trasplante control muerto + *kindling* (K+TCM): Ratas transplantadas en el ventrículo lateral izquierdo, con tejido semidisociado de corteza cerebral muerto de rata adulta. La colocación del electrodo de estimulación se realizó 2 semanas posteriores al trasplante. La estimulación para el desarrollo del *kindling* se inició 21 días posteriores al trasplante.

4. Grupo Trasplante control vivo + *kindling* (K+TCC): Ratas transplantadas en el ventrículo lateral izquierdo con tejido fetal semidisociado (14 a 16 días gestacionales) de corteza cerebral. La colocación del electrodo de estimulación se realizó 2 semanas posteriores al trasplante. La estimulación para el desarrollo del *kindling* se inició 21 días posteriores al trasplante.

5. Grupo Falso Trasplante + *Kindling* (K+ST): Ratas que se sometieron al procedimiento del trasplante depositando únicamente solución fisiológica y al igual que los grupos anteriores se sometieron al procedimiento del *kindling*.

6. Grupo Transplante Glial + *Kindling* (K+TG): Ratas transplantadas en la amígdala derecha con células gliales procedentes de cultivo primario (obtenidas de ratas recién nacidas). La colocación del electrodo de estimulación en la amígdala izquierda fue durante el mismo tiempo quirúrgico que la colocación del transplante. La estimulación para el desarrollo del *kindling* se inició 7 días posteriores al transplante.

Todos los animales se sacrificaron para su estudio histológico e inmunohistoquímico al presentar 10 crisis convulsivas generalizadas que correspondan a la fase 5 de Racine o al haber recibido 40 estímulos.

### **9.3 Procedimiento del *Kindling*.**

Bajo anestesia general con pentobarbital (40 mg/kg. i.p.) se colocó un electrodo bipolar (recubierto de teflón excepto en la punta), en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda por medio de la técnica de estereotaxia, utilizando las coordenadas (AP: 6.2, Lat.: 5, Alt.: 1.5 a partir de interaural) del Atlas de Paxinos y Watson (1982).

El conector del electrodo se fijó al cráneo con acrílico dental.

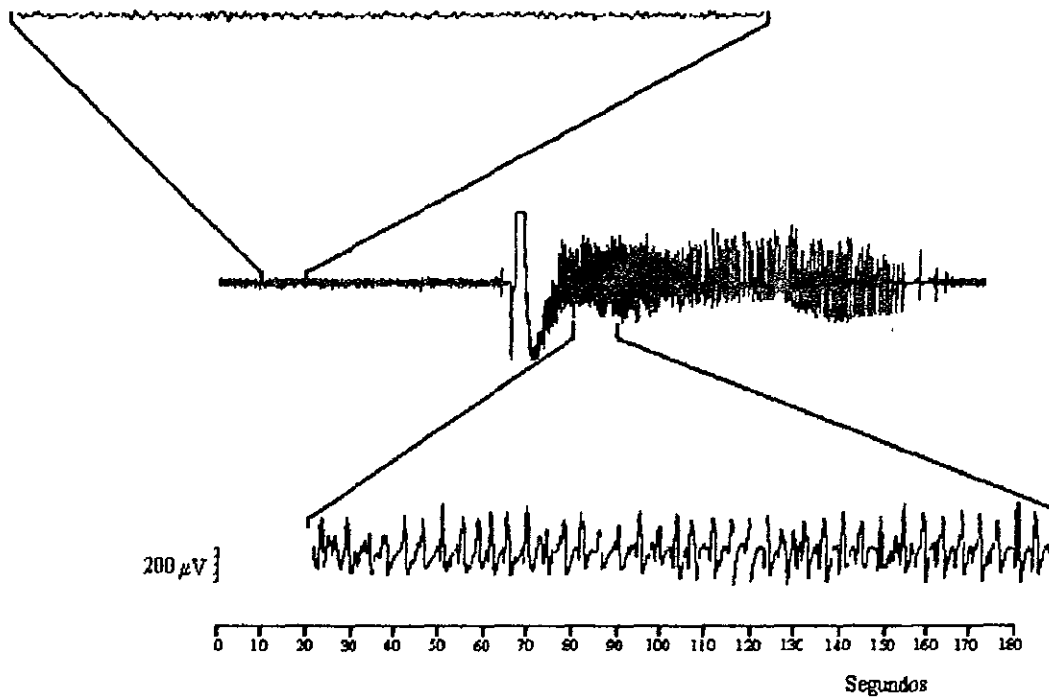
Al introducir el electrodo en la amígdala, se monitorizó visual y auditivamente la actividad registrada, tanto espontánea como por estimulación olfatoria para confirmar la correcta ubicación del mismo.

Los datos aportados por Daszuta *et al.* (1988) demuestran que la máxima secreción de serotonina de los tejidos implantados de neuronas

procedentes del rafe fetal, es entre las semanas 3 y 7 posteriores al trasplante. Este período corresponde con el inicio del procedimiento de estimulación eléctrica. Por estos datos la estimulación eléctrica, de los grupos con trasplante de tejido semidisociado, comenzó 21 días después del trasplante. No hay datos con relación a la máxima funcionalidad de las células gliales transplantadas por lo que para iniciar la estimulación se dejó un período de 7 días para la recuperación postoperatoria del animal.

Se aplicó, un estímulo diario 5 días a la semana, para ello se utilizó una fuente de corriente constante Grass PSIU-6 y un estimulador Grass-S11. El estímulo consiste en trenes de 1 s de duración con pulsos cuadrados monofásicos de 1 ms de duración a 60 Hz. Para encontrar la intensidad umbral, se comenzó con una intensidad de 10  $\mu$ a y se incrementó de 10 en 10  $\mu$ a hasta que aparecieron posdescargas de varios segundos (5-10), se fijó la intensidad 10% arriba de la última intensidad de estimulación para cada animal.

La actividad de la amígdala se vigiló y graficó en un polígrafo conectado al electrodo. El electrodo se utilizó también para estimulación por medio de un interruptor de 3 vías. Se midió la duración y la frecuencia de las posdescargas que se presentaron inmediatamente después de la estimulación (fig. 4). Posterior a la estimulación se calificó la conducta de la rata de acuerdo a la escala de Racine (1972b).



**Fig. 4.** Trazo electroencefalográfico donde se muestra de manera ampliada en los trazos superior e inferior 10 segundos de la actividad antes y después del estímulo. El registro previo al estímulo es utilizado como control para una mejor interpretación del registro posterior al estímulo. En el registro posterior al estímulo (posdescarga) se puede observar claramente la presencia de actividad paroxística. A manera de ejemplo, la duración de la posdescarga es de 84 segundos con una frecuencia de 3.7 espigas por segundo, La escala en la parte inferior corresponde a la duración del trazo en segundos.

#### **9.4 Transplantes.-**

Se utilizaron fetos de rata Wistar de 14 a 16 días de edad gestacional, considerando el día posterior al apareamiento como día cero. Al obtener los fetos se ratificó la edad gestacional con la longitud céfalo-sacra (crown-rump

length). La longitud céfalo-sacra debe ser entre 10 y 14 mm. (Dunnett y Björklund, 1991).

La obtención de los fetos fue por medio de laparotomía, utilizando como anestesia una mezcla de halotano (1.5%) con óxido nitroso y oxígeno (2/1). Los fetos fueron extraídos de manera individual, manteniendo a la madre viva y con la temperatura controlada para favorecer la oxigenación y viabilidad de los fetos aún sin extraer.

El tejido fetal para trasplante (rafe) corresponde al tejido disecado 0.5 mm. lateral a la línea media, entre la flexura mesencefálica y la flexura cervical (fig. 5).

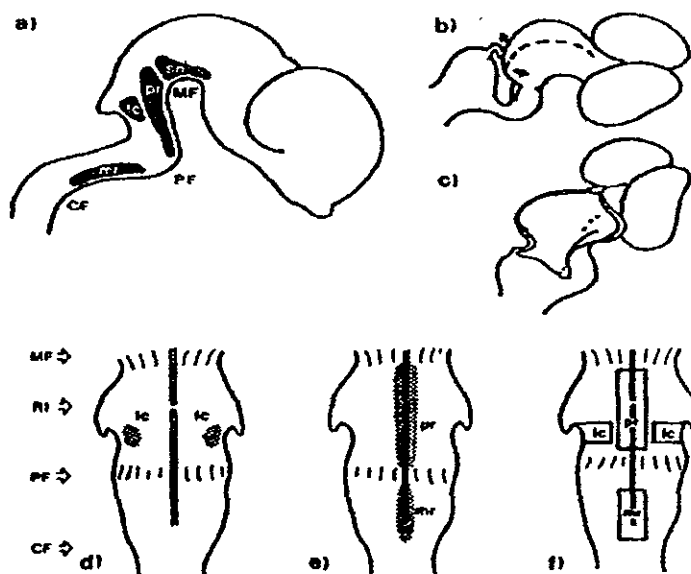
Durante el proceso de disección se mantuvo el tejido en solución fisiológica a temperatura ambiente. El tejido del rafe, ya disecado, se fragmentó en 10-20  $\mu$ l de la misma solución, procurando fragmentos menores a 0.5 mm<sup>3</sup> (Björklund y Dunnett, 1991; Zhou *et al.*, 1988). El total de las células que se transplantaron fue de 140,000  $\pm$  20,000, con una viabilidad del 85%.

El tejido se inyectó utilizando una jeringa Hamilton de 50  $\mu$ l con aguja metálica en el ventrículo lateral izquierdo en un volumen total igual o inferior a 20  $\mu$ l, depositado en fracciones de 10  $\mu$ l. La aguja permaneció en el sitio del trasplante los 5 minutos posteriores a haber terminado el depósito (Björklund y Dunnett, 1991).

El trasplante fue por medio de estereotaxia, basado en las coordenadas de Paxinos y Watson (1982) (AP. : 5.2 ; Lat. :0.5. ; Dorso-Ventral : 3.5 a partir de interaural).

El trasplante de tejido de corteza cerebral fetal (K+TCC) se realizó con el mismo procedimiento mencionado para el trasplante de rafe. El trasplante de tejido de corteza adulta (K+TCM) se obtuvo de ratas adultas y fue calentado hasta ebullición para destruir a las células, el resto del procedimiento fue igual al del trasplante de rafe.

Las células gliales para trasplante se obtuvieron de un cultivo primario, el procedimiento para su obtención se describe a continuación. El procedimiento de trasplante fue igual que para el trasplante de rafe pero depositando el tejido en la amígdala derecha (AP: 6.2, Lat.: -5, Alt: 1.5 a partir de interaural).



**Fig. 5 Esquema para la disección de las neuronas monoaminérgicas.**

**a) Representación sagital de los principales núcleos monoaminérgicos. b) Corte antero-posterior para exponer el IV ventrículo. c) Exposición de las estructuras entre la MF y CF. d) Localización del lc (células noradrenérgicas). e) Localización del mr y pr (células serotoninérgicas). f) Localización de los cortes para obtener lc, mr y pr. Los cortes para obtener el mr y pr son 0.5 mm. laterales a la línea media. Abreviaturas: MF: flexura mesencefálica; PF: flexura del puente; CF.: flexura cervical; RI: istmo romboencefálico; lc: *locus coeruleus*; pr: rafe del puente; mr: rafe mesencefálico; sn: sustancia nigra. (Ilustración tomada de Dunnet Stephen B., Björklund Anders, 1991).**

### **9.5 Cultivo primario de glia.-**

Se utilizó la corteza cerebral de ratas recién nacidas de la cepa Wistar durante el primer día de edad, el procedimiento fue el siguiente:

Los animales fueron decapitados para después obtenerse el encéfalo y disecarse la corteza cerebral. La disección del encéfalo se realizó en una caja de Petri manteniendo el tejido sumergido en medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco). El tejido cortical fue mantenido en medio DMEM a 4°C. hasta colectar la cantidad de tejido necesaria. Se requirió

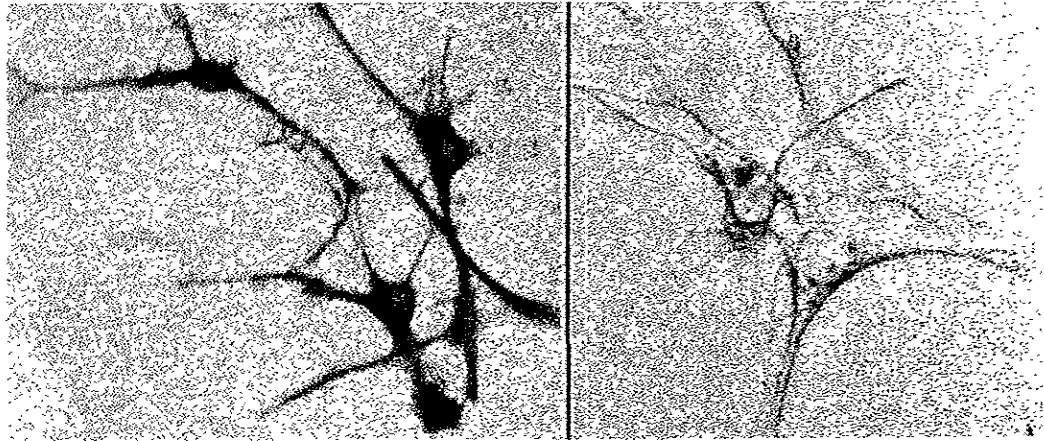


aproximadamente el tejido de 5 cortezas para sembrar un plato de 10 cm. de diámetro.

El tejido fue disociado mecánicamente, primero en pequeños trozos mediante una hoja de bisturí y después pasando el tejido en una jeringa de 5 c.c. con aguja de 21x32 mm (verde) por no más de 5 veces. Todo este procedimiento manteniendo el tejido en medio básico de DMEM.

El tejido disociado fue centrifugado por 10 min. a 800 rpm y se suspendió en medio básico DMEM alto en glucosa (Gibco) con suero fetal bovino (FCS) al 10%. Se sembró en cajas plásticas tipo Petri de 10 cm de diámetro tratadas con silicón, utilizando como medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Gibco) con FCS 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml, insulina al 5 µM, factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) al 5 ng/ml y factor de crecimiento endotelial (EGF) al 5 ng/ml. En cada caja se sembró el tejido correspondiente a 5 cortezas cerebrales.

El medio de cultivo se cambió un día después de la siembra y posteriormente cada 3 ó 4 días. Cuando la cantidad de células en el plato de cultivo fue suficiente, se disociaron incubando por no más de 10 minutos en tripsina al 0.25% deteniendo la reacción con DMEM + FCS al 10%. Cuando las células se disociaron en el primer pase, esta operación se repitió en 2 ocasiones. Las primeras células que se obtuvieron corresponden a oligodendrocitos y astrocitos tipo 2. Las células obtenidas en la segunda disociación correspondieron a astrocitos tipo 1 (Ián, 1994). Los trasplantes fueron realizados con astrocitos tipo 1 en el tercer pase.



**Fig. 6 La microfotografía del lado izquierdo corresponde a células gliales en cultivo que resultaron positivas para GFAP mediante la reacción de PAP, las células del lado derecho son fibroblastos utilizados como control negativo. Nótese que la marca en las células gliales no se encuentra en el núcleo debido a que la proteína GFAP es citoplasmática, además es evidente la diferencia de tamaño con los fibroblastos utilizados como control negativo. Las fotografías fueron tomadas en 40x (600 diámetros) con un invertoscopio de luz.**

Las células en el tercer pase se disociaron y se suspendieron en medio de DMEM con bis-bencimida (Hoechst #33342) al 5  $\mu$ M, incubándose durante 1 hora en la estufa de cultivo. Se realizaron 3 lavados con DMEM y se suspendieron en un volumen de 40 $\mu$ l de DMEM por caja disociada ( $2 \times 10^6 \pm 2 \times 10^3$  células). El trasplante se realizó con una jeringa Hamilton de 50  $\mu$ l con aguja metálica. Se transplantaron el total de las células de una caja de cultivo ( $2 \times 10^6 \pm 2 \times 10^3$  células) por cada rata.

El origen glial de las células se comprobó mediante inmunohistoquímica, marcando la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP). El 95% de las células en cultivo se consideraron como glia de acuerdo al

resultado obtenido (Fig. 6). La técnica de inmunohistoquímica para células en cultivo se describe más adelante.

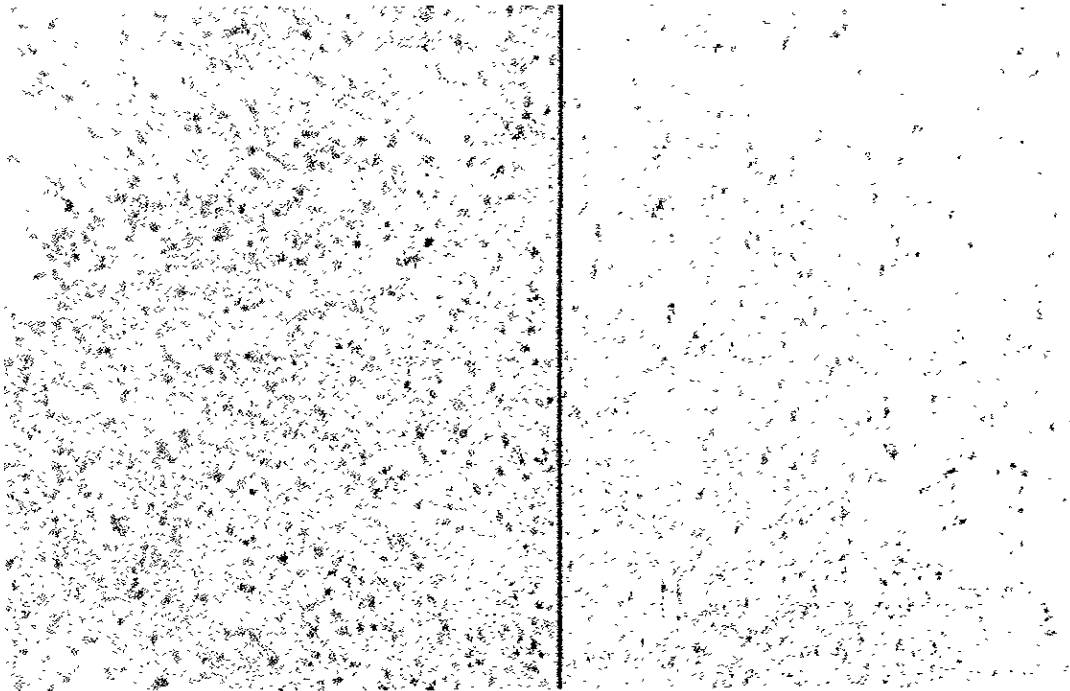
### **9.6 Histología.-**

Los animales fueron profundamente anestesiados con una sobredosis de pentobarbital (>50 mg/kg.) y perfundidos por vía intracardiaca primero con 250 ml de buffer fosfato al 0.1 M estabilizado a un pH de 7.4, seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% en solución buffer fosfato al 0.1 M (pH=7.4) a 4° C. El encéfalo fue extraído después de perfundir al animal, manteniendolo en solución fijadora (posfijación) por 24 horas y se almacenó en sacarosa al 10% a 4°C. Con el microtomo de congelación se realizaron cortes de 25 a 40 µm a nivel del trasplante y la amígdala izquierda. Los cortes de la amígdala fueron teñidos con safranina o Nissl con la finalidad de localizar el sitio de estimulación. Los cortes correspondientes al área de trasplantes fueron sometidos a la técnica de inmunohistoquímica abajo señalada.

El tejido cerebral de los animales con trasplante de células gliales fue obtenido mediante el procedimiento arriba descrito. Los cortes se realizaron con un microtomo de congelación, obteniéndose éstos de 30 µm, se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con glicerol. Estos cortes fueron observados en el microscopio de fluorescencia mediante excitación ultravioleta. Debe de resaltarse que la bis-bencimida fue utilizada como marcador de las

1. Los cortes se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en solución de peróxido al 3% para suprimir la actividad de las peroxididasas endógenas.

2. En una solución de ácido acético al 5% con alcohol etílico al 100% en relación volumétrica 1:1 se incubó durante 15 minutos a  $-20^{\circ}$  C. La incubación con esta solución se añadió al método tradicional debido a que se observó una mejor reacción del anticuerpo (fig. 7).



**Fig. 7** Las microfotografías (10x) corresponden a cortes sagitales sobre el rafe mesencefálico marcadas con anticuerpo anti 5-HT. Nótese una mayor y mejor marca en la fotografía del lado izquierdo, misma que fue incubada con la solución del ac. Acético y metanol de acuerdo al paso 2 del procedimiento de inmunohistoquímica en tejido. La comparación se realizó únicamente visual mediante microscopía de luz.

3. Se incubó con el anticuerpo primario respectivo a las siguientes diluciones y tiempos: 5-HT diluido 1:50 durante 48 h. a 4° C.; GFAP diluido 1:200 durante 12 h. a 4° C. y DBH diluido 1:1000 durante 48 h. a 4° C.

4. Se incubó con el anticuerpo secundario biotilnado, diluido 1:10 durante 2 h. a 4° C.

5. En una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

6. Con solución cromógena de 3, 3'-diaminobencidina se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con buffer fosfato al 0.1 M. Los cortes fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados y cubiertos con resina para colocar el cubreobjetos.

Como control positivo para DBH y 5-HT se utilizaron cortes sagitales de tallo cerebral, donde se observó la reacción para DBH al limitar el núcleo del Locus Ceruleus y 5-HT al limitar los núcleo del rafe mesencefálico y de la protuberancia. El control positivo para GFAP se realizó en cortes coronales donde se observaron las células gliales con una distribución ubiqua.

El control negativo se realizó en cortes similares a los utilizados para el control positivo, omitiendo la incubación con el anticuerpo primario (DBH, 5-HT o GFAP). No se observó ninguna reacción.

No se realizó control de especificidad (incubación del anticuerpo primario en presencia de su antígeno en solución) debido a que no contamos con los antígenos para esta prueba. Sin embargo, los controles positivo

mostraron mucha especificidad con respecto a la localización de su reacción, lo cuál apoya la alta especificidad indicada por los fabricantes de los anticuerpos.

### **9.7.2 Inmunohistoquímica en cultivo primario.-**

Las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos previamente recubierto con fibronectina al 1 M, se dejaron proliferar hasta que lo recubrieron en su totalidad. El procedimiento de inmunohistoquímica fue el siguiente:

1. Se colocó el cubreobjetos en paraformaldehído al 4% con un pH de 7.4 a 4° C. durante 15 minutos.
2. En una solución de ácido acético al 5% con etanol al 100% en relación volumétrica 1:1 se incubó durante 5 minutos a -20° C.
3. Se incubó en solución bloqueadora de suero de caballo al 10% en buffer fosfato al 0.1 M. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Se incubó con el anticuerpo primario, en este caso anti-GFAP diluido 1:200 a temperatura ambiente y en una cámara húmeda durante 12h.
5. Se incubó con el anticuerpo secundario biotilnado, sin diluir durante 2 h. a temperatura ambiente y en una cámara húmeda.
6. En una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en una cámara húmeda.
7. Con solución cromógena de 3, 3'-diaminobencidina se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Entre cada paso se lavó 3 veces con solución de buffer fosfato al 0.1 M.

Se dejó secar y se montó sobre un portaobjetos con resina sintética.

Se realizaron dos tipos de control negativo: en el primero se realizó el procedimiento en fibroblastos inmortalizados (F3T3), sin observarse ninguna reacción. Además, en el segundo se realizó el procedimiento en células de nuestro cultivo primario (glial) sin incubar con el anticuerpo a GFAP, sin observarse ninguna reacción.

El control positivo no se realizó porque no contamos con células gliales inmortalizadas (tumoraes o por manipulación genética) y el control de especificidad tampoco se realizó porque no contamos con la proteína GFAP purificada. Sin embargo la reacción del anticuerpo a GFAP en las células se observa solo en el citoplasma siendo este un dato de especificidad (ver adelante especificidad de la bis-bencimida).

## **10. Valoración de resultados.-**

1) Se registró en cada animal el tiempo de permanencia en cada una de las fases conductuales, el número de estímulos necesarios para presentar la primera crisis generalizada, la duración y frecuencia de las posdescargas.

2) Se estableció la localización de la punta de los electrodos de estimulación y se registró de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1982).

3) Se estableció una correlación entre los datos inmunohistoquímicos y los resultados experimentales de los grupos experimentales.

## 10.1 Pruebas Estadísticas.-

Se utilizó un ANOVA para cada fase conductual, siendo las comparaciones de interés solo entre las mismas variables. El método de Pos Hoc de comparación múltiple fue el de Bonferroni. La prueba se realizó con un poder de al menos 0.8 y un error tipo I de 0.05.

En caso de no cumplirse los supuestos del modelo paramétrico, se utilizó el Análisis de Varianza con un solo criterio de clasificación de Kruskal-Wallis. El método de comparación múltiple fue el de Dunn.

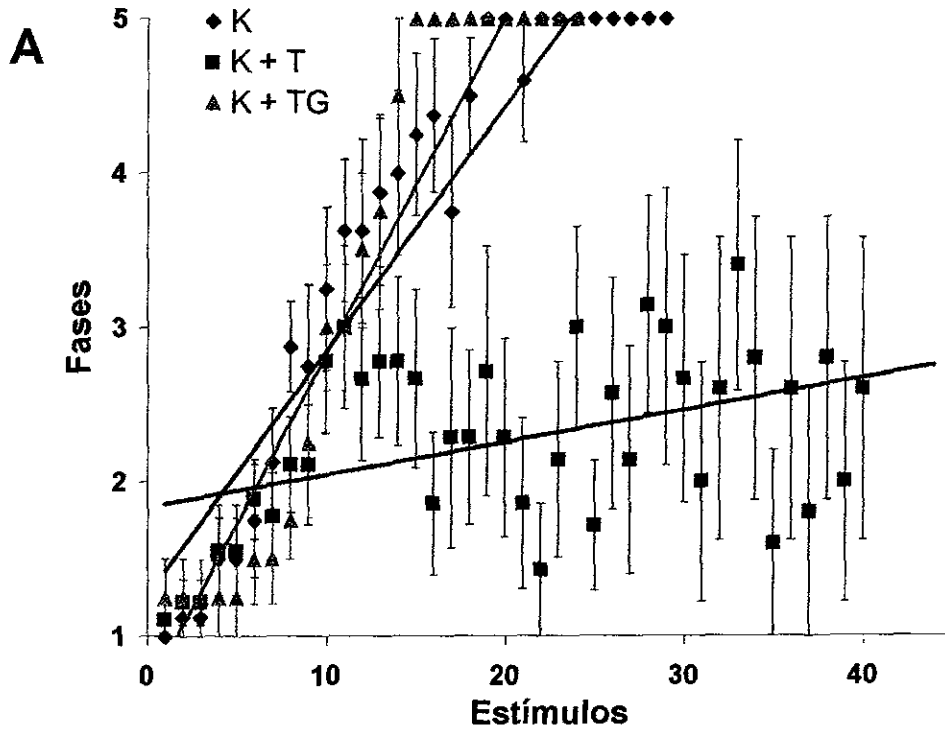
## 11. Resultados.-

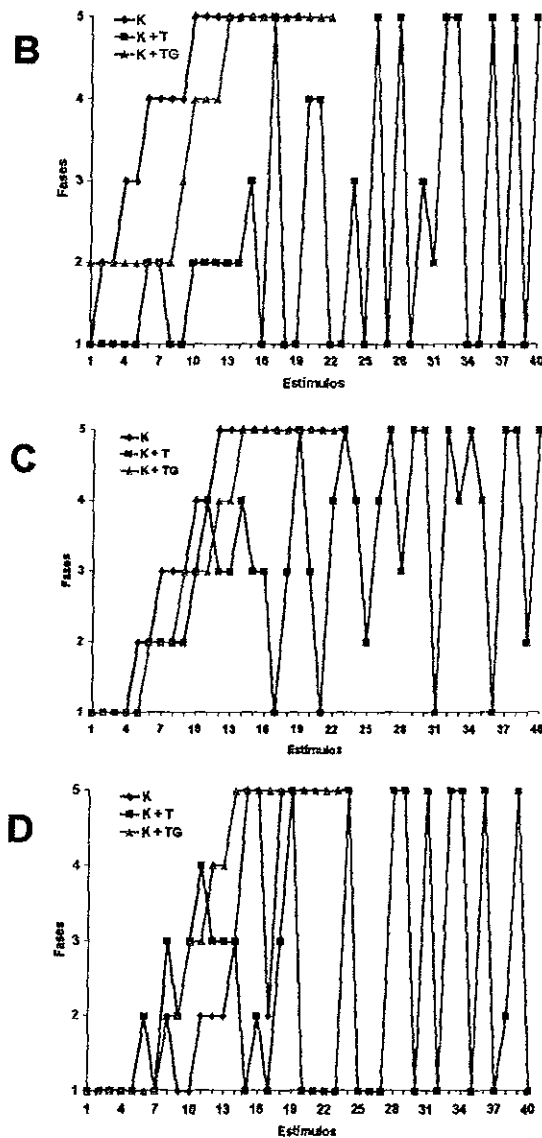
Se analizaron los resultados de 36 ratas macho albinas, de las cuales 26 fueron de la cepa Wistar y 10 de la cepa Sprague-Dawley. Los animales se dividieron de la siguiente manera: 9 en el grupo *kindling* (K); 5 en el grupo falso trasplante + *kindling* (K+ST); 4 en el grupo trasplante control muerto + *kindling* (K+TCM); 4 en el grupo trasplante control vivo + *kindling* (K+TCC); 9 en el grupo trasplante neuronal + *kindling* (K+T); 5 en el grupo trasplante glial + *kindling* (K+TG). Las 10 ratas de la cepa Sprague-Dawley formaron parte de los grupos K (2 ratas), K+ST (2 ratas), K+T (1 rata) y K+TG (5 ratas), sin encontrarse diferencia (conductual y EEG) con respecto a los animales de la cepa Wistar ( $p=0.6556$ ).



### 11.1 Resultados por Fase Conductual.-

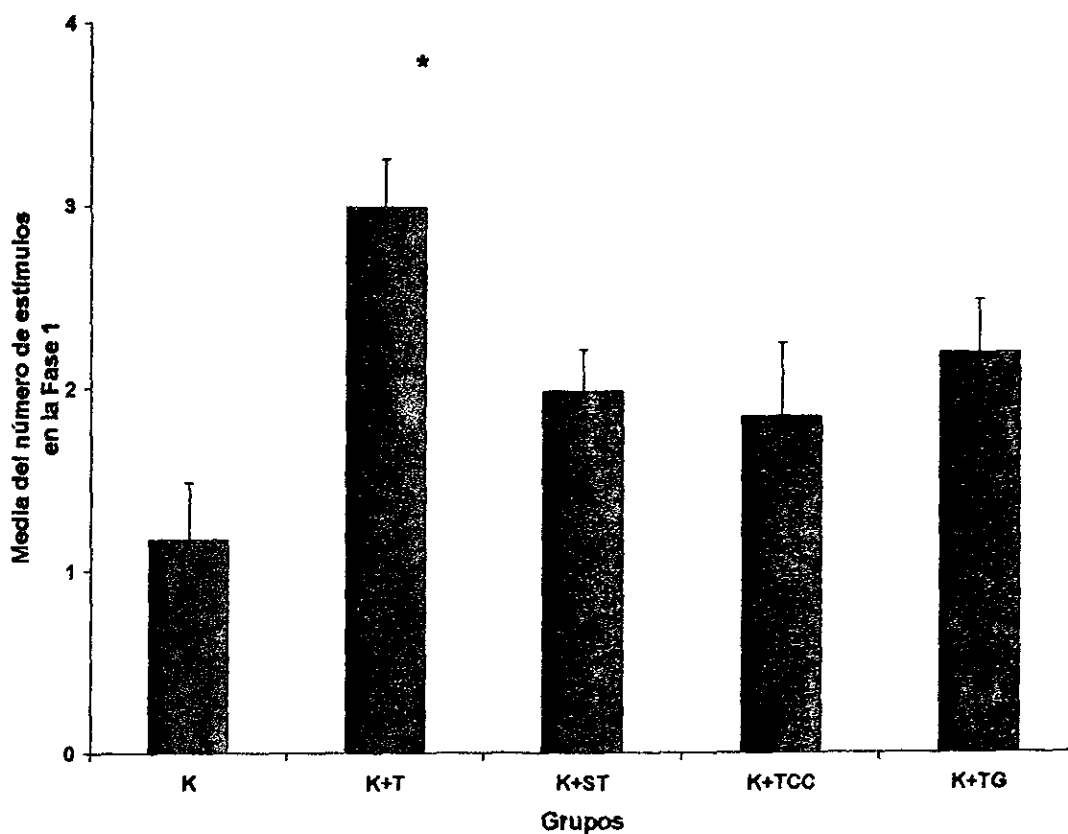
Los grupos de K, K+ST, K+TCM K+TCC y K+TG presentaron en orden ascendente cada una de las fases conductuales a través de las estimulaciones, no así el grupo K+T en el que no se presentó la evolución ordenada a través de las fases conductuales (fig. 8).



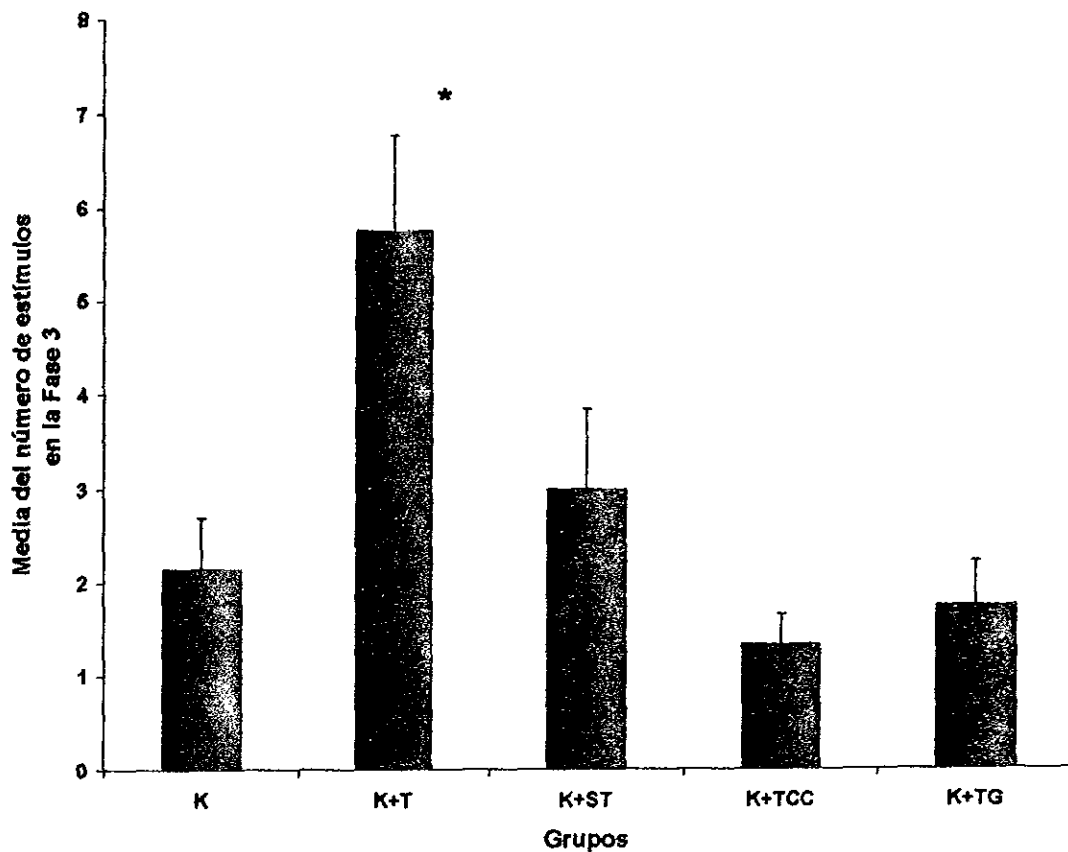


**Fig. 8. Fases conductuales con respecto a los estímulos. A) Se compara la tendencia en la evolución de los grupos *Kindling* (K), *Kindling* + trasplante neuronal (K+T) y *Kindling* + trasplante glial (K+TG) a través de los estímulos con respecto a la presentación media de las fases conductuales. Observese que los animales del grupo K+T no llegan a presentar crisis en fase 5. Las líneas verticales representan el error estándar. B), C) y D) Cada gráficas muestra la evolución de tres animales, uno de cada grupo (K, K+T y K+TG). Debe de resaltarse que los grupos K y K+TG presentaron las fases de manera progresiva y ordenada, no así los animales del grupo K+T.**

El análisis de permanencia de los animales en las diferentes fases conductuales demostró que aquellos del grupo K+T presentaron una mayor permanencia en las fases conductuales 1 (fig. 9) y 3 (fig. 10) con respecto al resto de los grupos ( $p < 0.05$ ). Los animales del grupo K+TG no presentaron diferencia en el número de estímulos en cada una de las fases conductuales con respecto a los grupos K, K+ST y K+TCC.

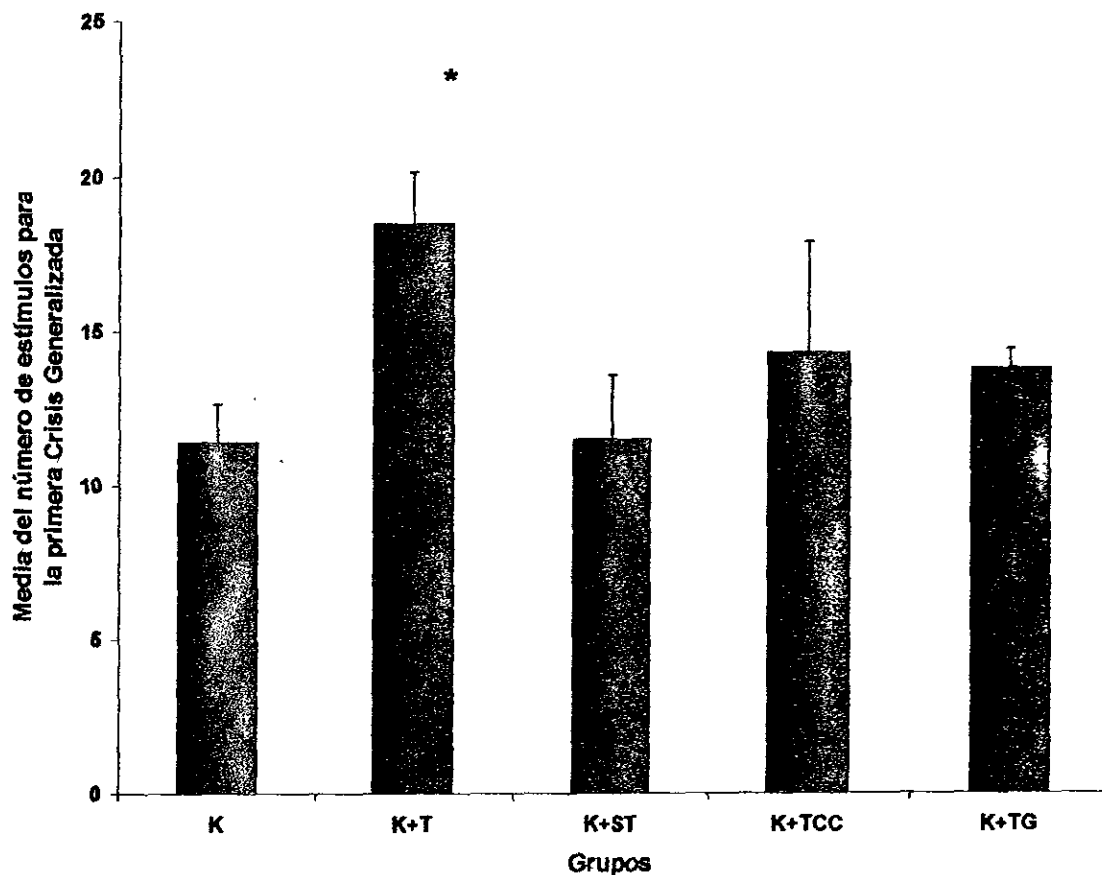


**Fig. 9** Media del número de estímulos en la Fase conductual 1. El grupo K+T presentó una mayor estancia en esta primera fase conductual. Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $p < 0.05$  (\*).



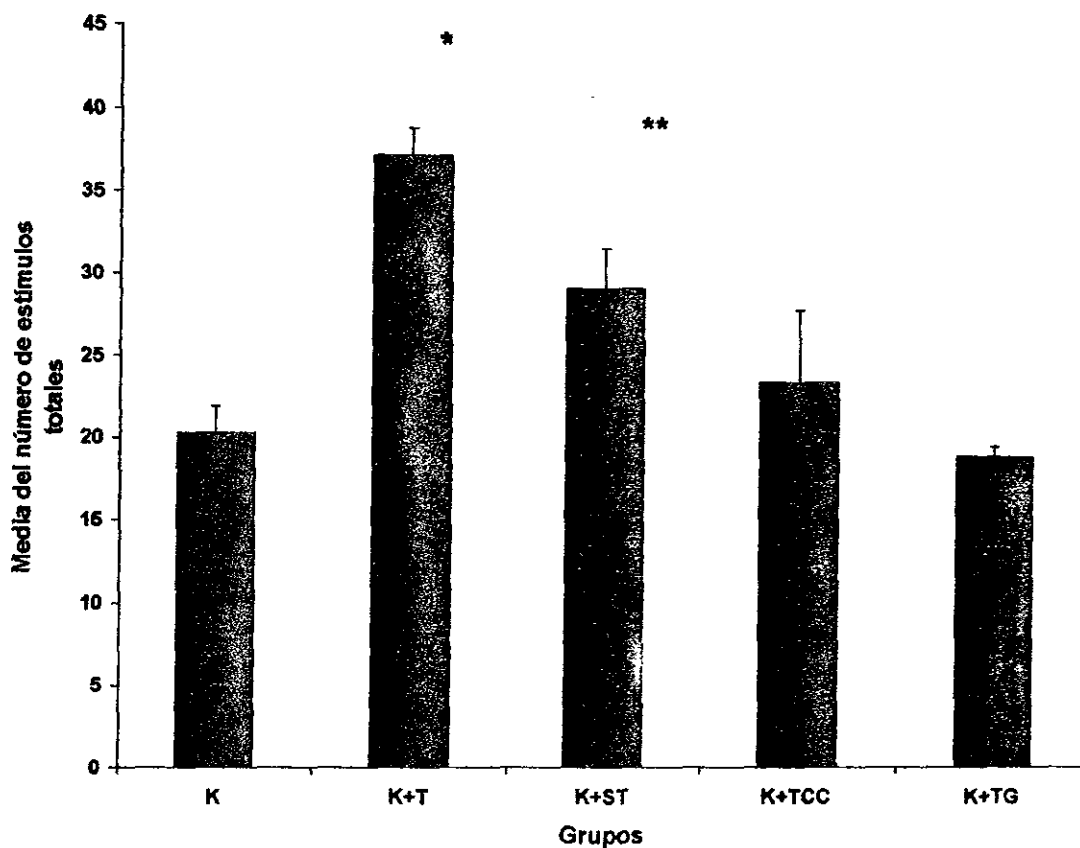
**Fig. 10** Media del número de estímulos en la fase conductual 3. El grupo K+T presentó una mayor estancia en la tercera fase conductual. Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $P < 0.01$  (\*)

La cantidad de estímulos necesarios para presentar la primera crisis generalizada (fase 5) fue mayor en el grupo K+T con respecto al grupo K ( $p < 0.05$ ). Los grupos K+ST, K+TCC y K+TG no presentaron diferencia entre ellos ni con los grupos K y K+T (Fig. 11).



**Fig. 11** Media del número de estímulos para presentar la primera crisis convulsiva generalizada (fase 5). El grupo K+T requirió un mayor número de estímulos para presentar la primera crisis en fase 5 con respecto al grupo K. Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $p < 0.05$  (\*).

Los estímulos totales necesarios para presentar 10 crisis en fase 5 y/o 40 estimulaciones en el caso de aquellos animales que no lograron presentar las 10 crisis generalizadas fue mayor para el grupo K+T con respecto a los grupos K, K+TCC y K+TG ( $p < 0.01$ ). Los animales del grupo K+ST también requirieron un mayor número de estímulos con respecto a los grupos K y K+TG ( $p < 0.05$ ) (fig. 12).



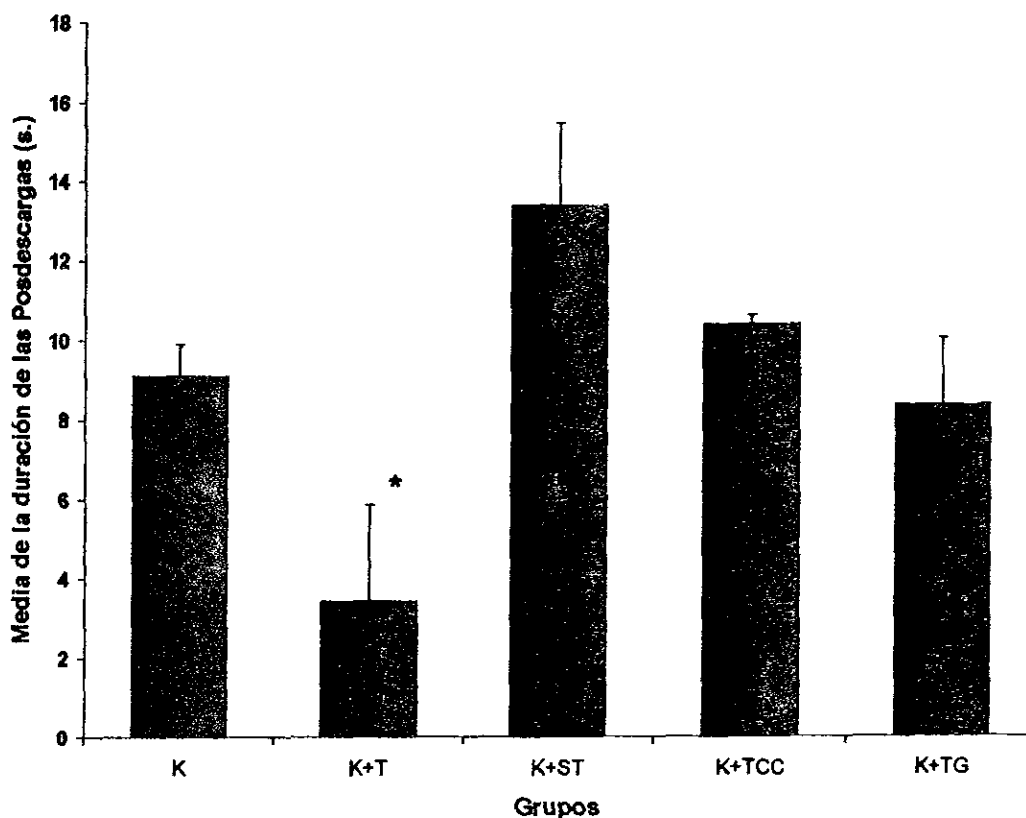
**Fig. 12** Media del número de estímulos totales para presentar 10 crisis convulsivas generalizadas (Fase 5). El grupo K+T requirió un número mayor de estímulos para presentar 10 crisis en fase 5 con respecto a los grupos K, K+TCC y K+TG (\*). El grupo K+ST requirió un mayor número de estímulos con respecto a los grupos K y K+TG (\*\*). Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $p < 0.01$  (\*) y  $p < 0.05$  (\*\*).

## **11.2 Resultados de la Duración y la Frecuencia de las Posdescargas.-**

El análisis de la duración y la frecuencia de las posdescargas se realizó para cada una de las fases conductuales. La frecuencia de la

posdescarga no presentó diferencia entre los grupos en ninguna de las fases conductuales.

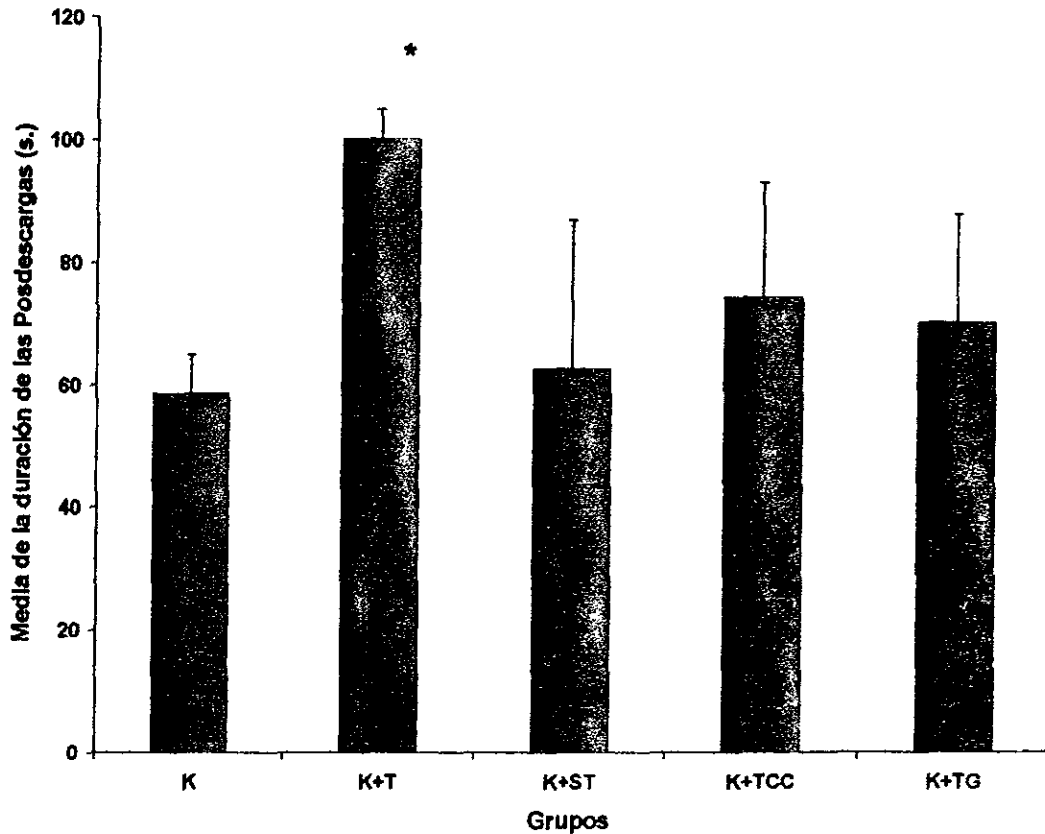
La duración de la posdescarga fue menor en el grupo K+T para la fase conductual 1 ( $p < 0.05$ ) aún cuando existe una gran varianza en cada uno de los grupos (fig. 13).



**Fig. 13** Media de la duración de las posdescargas en la fase 1. Obsérvese una menor duración de las posdescargas en el grupo K+T que en el resto de los grupos. Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $p < 0.05$  (\*).

La duración de las posdescargas en la fase 3 fue mayor para el grupo K+T con respecto al grupo K ( $p < 0.05$ ) (fig. 14). En el resto de las fases

conductuales no se presentó diferencia en la duración de las posdescargas entre los grupos. El análisis de la duración total de las posdescargas al presentar 10 crisis convulsivas generalizadas no mostró ninguna diferencia entre los grupos.



**Fig. 14** Media de la duración de las posdescargas en la fase 3. Obsérvese una mayor duración en el grupo K+T con relación al grupo K. Las líneas verticales corresponden al error estándar.  $p < 0.05$  (\*).



### 11.3 Resultados de Inmunohistoquímica e Histológicos.-

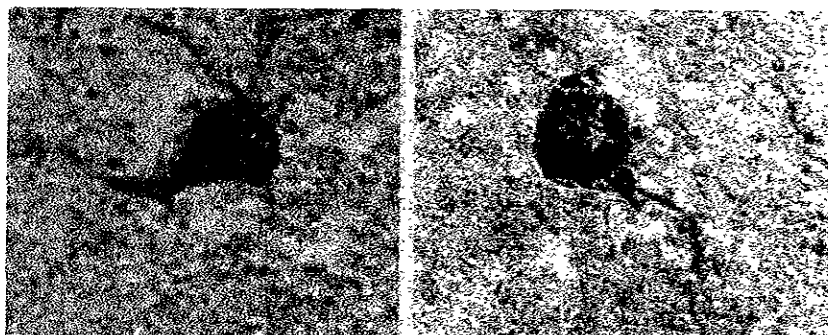
Todos los animales incluidos en el análisis presentaron la punta del electrodo de estimulación en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda.

El trasplante en los animales del grupo K+T, K+TCC fue muy evidente incluso de manera macroscópica (fig. 15).



**Fig. 15** Microfotografía de un corte de 30µm donde se observa el tejido transplantedo (señalado por las flechas). El trasplante está ubicado en el ventrículo lateral izquierdo. La amplificación es de 20 diámetros, observado con microscopía de luz.

Los cortes histológicos obtenidos de los animales del grupo K+T, fueron positivos en la región del trasplante para el anticuerpo anti-5 HT y negativos para el anticuerpo a dopa-β-hidroxilasa. Debe señalarse que la cantidad de células serotoninérgicas (fig. 16) en los trasplantes fue escasa.



**Fig. 16. Microfotografías de células de transplante marcadas con el anticuerpo a 5-HT. Las fotografías fueron tomadas en inmersión (1000 diámetros) mediante microscopía de luz.**

La zona periférica al transplante presentó una ligera reacción glial, demostrado por la reacción a GFAP (fig. 17).

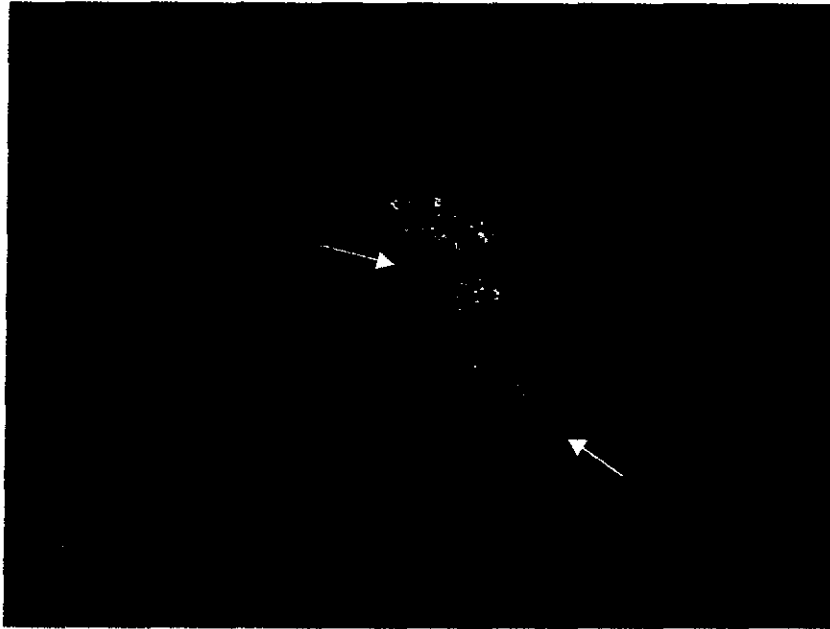
Los cortes de los animales del grupo K+TCC fueron negativos para 5 HT y D $\beta$ H.



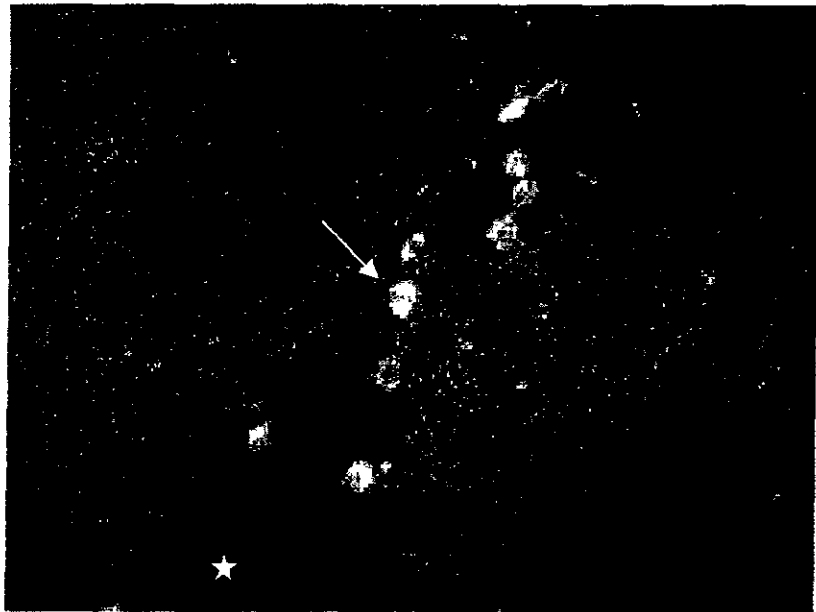
**Fig. 17 Microfotografías de un transplante con tinción inmunohistoquímica para GFAP. La imagen de la izquierda corresponde a un transplante en el ventrículo lateral izquierdo, obsérvese la escasa reacción glial en la interfase del tejido transplantado (t) y el huésped (H). La imagen de la derecha es una ampliación del recuadro de la izquierda. Las fotografías corresponden a magnificaciones de 40 y 200 diámetros tomadas con un microscopio de luz.**

Los trasplantes de tejido glial fueron localizados por medio de microscopía de fluorescencia con excitación ultravioleta (fig. 18 y 19). Antes de

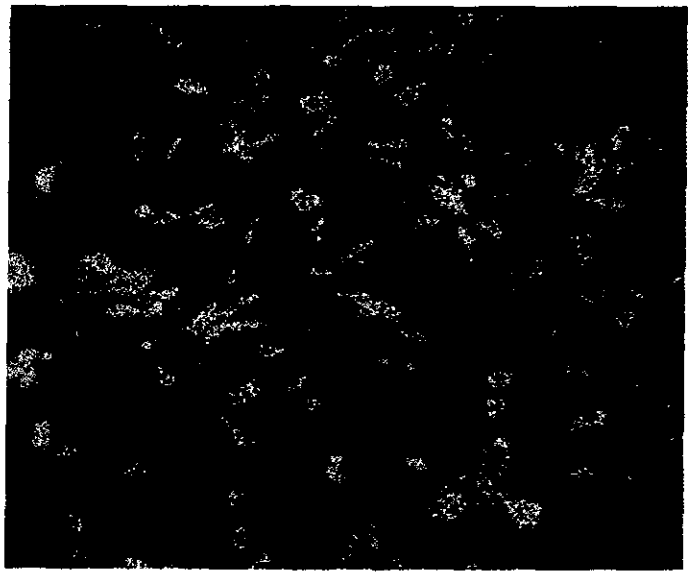
realizarse el trasplante se comprobó el origen glial de las células, así como su fluorescencia con bis-bencimida. Estas pruebas se realizaron a partir de una alícuota obtenida de la suspensión de células del cultivo primario a transplantar (fig. 6 y 20).



**Fig. 18** Microfotografía de un corte histológico donde se observa el trasplante de células gliales después de 6 semanas de transplantadas, marcadas con bis-bencimida (entre las flechas). El trasplante se encuentra localizado en la región amigdalina del lado derecho. El trasplante se localizó mediante microscopía de fluorescencia y la imagen se obtuvo mediante microscopía confocal con un aumento de 4x.



**Fig. 19** Microfotografía de un corte histológico donde se observan las células gliales después de 6 semanas de transplantadas, marcadas con bis-bencimida (flechas). Las células se encuentran en la cercanía de un vaso sanguíneo (estrella). El transplante se localizó mediante microscopía de fluorescencia y la imagen se obtuvo mediante microscopía confocal con un aumento de 40x.



**Fig. 20** Microfotografía de cultivo primario de células gliales marcadas con bis-bencimida. Las células corresponden a una alícuota de la suspensión celular que fue transplantada. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia y la imagen se obtuvo mediante microscopía confocal con un aumento de 20x.

## 12. Discusión.

El modelo del *kindling* eléctrico amigdalino tiene numerosas ventajas sobre otros modelos de epilepsia, entre las más importantes son: su evolución gradual y estereotipada, el no utilizar sustancias extrañas al organismo, la presencia de un foco en espejo y el ser un modelo que genera cambios con alta semejanza a los encontrados en el humano con epilepsia (McNamara *et al.*, 1980; McNamara, 1986; Lopes da Silva *et al.*, 1992).

Este modelo permite predecir y estudiar los efectos de los medicamentos y las sustancias al semejar diversos tipos de crisis epilépticas, como son: las crisis parciales complejas (focales límbicas), las parciales simples (focales en isocorteza), las tónico-clónicas generalizadas (estado *kindled*) y las crisis parciales secundariamente generalizadas (McIntyre, 1991). Dependiendo del sitio de estimulación, el momento de evaluación y los parámetros registrados es posible el estudio de diferentes tipos de crisis epilépticas en este modelo. Por ejemplo: se puede estudiar el efecto de algún fármaco en el proceso de epileptogénesis al comparar el número de estímulos necesarios para que ocurra la transformación de una crisis focal en una crisis generalizada. Asimismo es posible estudiar el efecto del fármaco sobre cada una de las etapas de evolución mediante la cuantificación de algún componente estereotipado (i.e. duración y frecuencia de la posdescarga) (Albright *et al.*, 1986).

En el presente estudio se evaluó el efecto de los trasplantes sobre la evolución del *kindling* y sobre cada una de sus fases. La evolución se evaluó con base en el número de estímulos necesarios para presentar una crisis generalizada, así como mediante la permanencia en cada fase conductual. El efecto en cada fase se evaluó mediante la frecuencia y la duración de las posdescargas.

La evolución gradual y estereotipada del *kindling* nos permitió hacer comparaciones bajo parámetros bien definidos entre cada uno de los grupos experimentales. Los parámetros que se analizaron fueron conductuales (fases) y electrofisiológicos (duración y frecuencia de la posdescarga).

Debido a que los animales del grupo con trasplante de rafe mesencefálico fetal no presentaron una evolución gradual (fig. 8), el análisis se realizó por fase conductual y no de acuerdo a los estímulos consecutivos. El analizar los resultados de esta forma nos permite conocer de manera aproximada las regiones involucradas en la actividad paroxística, gracias a la relación existente entre las fases y las regiones involucradas (Racine, 1972b).

En este trabajo se utilizó la técnica de trasplante debido a que la liberación del neurotransmisor se realiza de manera más fisiológica que la administración sistémica o local de algún agonista serotoninérgico (Schwartzkroin y Lindvall, 1991).

La técnica de trasplante para el rafe mesencefálico fue con tejido semidisociado, porque las células transplantadas de esta manera tienen una mejor sobrevivencia que las células completamente dissociadas (Björklund y

Dunnet, 1991) y porque la colocación del trasplante en el encéfalo sin una lesión previa dificulta la sobrevivencia de éste, en especial cuando las células se disocian (Björklund y Dunnet, 1991). Por otro lado, existe el inconveniente de que el efecto observado es una mezcla de las diferentes sustancias producidas por el trasplante.

El trasplante de tejido glial se realizó a partir de cultivo primario para asegurar que el efecto fuera el de las células de interés y no otro, como es el caso de los trasplantes con tejido sólido o semidisociado. Además, esto nos permite inferir que el efecto del trasplante de rafe mesencefálico no se debió a las células gliales, sin poder descartar que lo observado puede deberse al conjunto de ambas (gliales y serotoninérgicas).

El uso de células, a partir de cultivo primario, posterior a varios pases tiene el inconveniente de ocasionar pérdida de diferenciación celular y cambios en las funciones de las células *in-situ* (Ian, 1994). Se utilizaron células en el tercer pase para evitar este fenómeno de desdiferenciación, sin embargo se encontró una falta de respuesta de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa a la serotonina (comunicación personal del Dr. Jorge Hernández), así como una ausencia de migración de las células transplantadas como la reportada por Goldberg y Bernstein (1987). Lo anterior plantea un probable efecto de desdiferenciación o modificación de las características originales (Kesslak y Bridges, 1994).

El trasplante de células gliales se colocó en la amígdala contralateral al sitio de estimulación debido a que el trasplante de células disociadas tiene mejores resultados al realizarse en el parénquima (Björklund y Dunnet, 1991).

La amígdala contralateral fue seleccionada para intentar observar un efecto bloqueando el reclutamiento del foco en espejo.

Los resultados indican que el trasplante procedente de rafe mesencefálico fetal ocasiona cambios en la evolución normal del *kindling* eléctrico amigdalino. Entre estos cambios se encuentra una pérdida en la secuencia progresiva y acumulativa de las diferentes fases conductuales presentándose de manera desordenada.

Los animales con trasplante procedente del rafe mesencefálico fetal requirieron un mayor número de estímulos para presentar la primera crisis convulsiva generalizada (CCG), así como para acumular 10 CCG. La permanencia en las fases conductuales 1 y 3 se incrementó en los animales con trasplante de rafe mesencefálico.

De la misma forma, la duración de la posdescarga durante la fase conductual 1 disminuyó en los animales del grupo con trasplante de rafe mesencefálico fetal, no así en la fase conductual 3 en la que se incrementó la duración de la posdescarga. El análisis de la frecuencia de la posdescarga no demostró diferencias entre los grupos para cada fase conductual.

Los animales con trasplante de células gliales de cultivo primario no presentaron ninguna modificación en los parámetros basales del *kindling*.

Estos resultados señalan que el trasplante de rafe mesencefálico fetal tiene efecto cuando la actividad epileptiforme se encuentra en el hemisferio ipsilateral al sitio de la estimulación, de acuerdo con la correlación entre la fase conductual y la topografía de la actividad paroxística (Racine, 1972b;



McNamara *et al.*, 1980). Los resultados obtenidos sugieren que el efecto del trasplante de rafe mesencefálico es sobre la propagación de la actividad epiléptica y no sobre el proceso ya generalizado.

La mayor permanencia en la fase conductual 1 y la disminución en la duración de las posdescargas en esta misma fase conductual, plantean que el trasplante tiene efecto sobre las crisis parciales complejas (McIntyre, 1991) y sobre la propagación de la actividad epiléptica.

El efecto del trasplante de rafe mesencefálico puede deberse a diferentes causas: a) el tejido transplantado puede tener una influencia trófica en el área receptora y estimular mecanismos de recuperación (Björklund *et al.*, 1984) que mantengan localizada la actividad paroxística; b) el trasplante puede funcionar como una bomba que libere neurotransmisor al tejido cercano sin establecer conexiones sinápticas, pudiendo ser su efecto tanto en neuronas como en glia (Schwartzkroin y Lindvall, 1991); c) el tejido transplantado puede establecer contactos sinápticos funcionales y ejercer una acción inhibitoria tónica local sobre las neuronas con las que establece contacto (Schwartzkroin y Lindvall, 1991); d) el trasplante puede tener una acción inespecífica de masa y por esto retrasar la propagación de la actividad paroxística.

Para descartar que el retraso en la evolución que se observó se deba a un efecto de masa, se incluyó un grupo con trasplante de tejido vivo (corteza), diferente al potencialmente serotoninérgico, sin encontrarse diferencias con el grupo *kindling* aún cuando los trasplantes de tejido cortical crecieron de manera considerable. Es interesante que el grupo K+ST requirió un mayor

número de estímulos para presentar 10 CCG con respecto al grupo K. Esto puede deberse a la activación de algún sistema homeostático en el sitio de la inyección de la solución salina o del tejido muerto.

En los animales del grupo trasplante control (tejido cortical muerto; K+TCM) no se encontró ningún tejido al realizar el estudio histológico y al ser el comportamiento conductual y electrofisiológico de este grupo similar al del grupo K+ST, se analizaron de manera conjunta. Estos grupos analizados de manera separada también requirieron un mayor número de estímulos para presentar 10 CCG.

La disociación entre la manifestación conductual y la duración de la posdescarga que se presentó en la fase conductual 3, puede deberse a que el trasplante impide la propagación de la actividad paroxística al hemisferio contralateral al sitio de estimulación, sin tener efecto limitando la duración de la actividad paroxística ipsilateral. Este resultado es de gran interés porque plantea que el trasplante de rafe mesencefálico fetal inhibe o bloquea el reclutamiento de nuevas estructuras sin tener efecto sobre las estructuras ya involucradas en el proceso de la epilepsia. Además, implica que alguna(s) substancia(s) secretada(s) por el trasplante tiene(n) una acción profiláctica reforzando la homeostasis de las estructuras aún no involucradas en la epileptización.

La falta de efecto del trasplante de células gliales puede deberse al ya mencionado mecanismo de desdiferenciación (Jan, 1994), sin embargo no se pueden descartar otras causas como: a) un bajo número de células

transplantadas; b) la localización del trasplante pudo no corresponder al sitio donde se formó el foco en espejo; c) un efecto secundario de la glia en la fisiopatología de la epilepsia e imposible de ser evidenciado mediante la técnica de trasplante (Kesslak y Bridges, 1994).

En el diseño de la mayoría de los estudios con relación al efecto de los trasplantes sobre alguno de los aspectos del *kindling*, se lesiona inicialmente el sistema o estructura de interés para posteriormente documentar su importancia mediante el uso de trasplantes. En el caso del modelo de *kindling*, la manera más común de evaluar los efectos del trasplante es mediante la cuantificación del número de estímulos en cada fase conductual, el número de estímulos para presentar la primera crisis generalizada y la duración de la posdescarga.

Bengzon *et al.* (1993) demostraron que el trasplante bilateral de *locus coeruleus* en el hipocampo de animales previamente depletados del sistema noradrenérgico recupera los parámetros normales del *kindling*, sin tener preferencia por alguna de las fases de evolución o modificando las crisis ya establecidas. Los animales no depletados de este sistema de neurotransmisión al ser transplantados, no presentaron ninguna modificación en los parámetros del *kindling*, como las encontradas en nuestro estudio.

Camu *et al.* (1990) transplantaron células del rafe mesencefálico fetal en el bulbo olfatorio de animales previamente depletados del sistema serotoninérgico, encontrando que el trasplante ocasiona una recuperación total de los parámetros del *kindling* en las fases conductuales 1 y 2. En el resto

de las fases, que corresponden a la actividad epiléptica fuera del sistema límbico ipsilateral, solo existe una recuperación parcial de los parámetros. Estos resultados concuerdan con los nuestros donde encontramos un efecto del trasplante de rafe mesencefálico preferente sobre la primera fase conductual (actividad focal ipsilateral). En el estudio de Camu *et al.* (1990) se colocó el trasplante en un sitio muy cercano al de estimulación (1 mm de distancia), en el nuestro se colocó en el ventrículo ipsilateral al de estimulación. La comparación de ambos estudios descarta un efecto puramente local sobre el sitio de estimulación, como lo interpretado por Camu *et al.* (1990), planteando que la acción del trasplante es sobre una región más extensa.

Comparando el estudio de Bengzon *et al.* (1993), el de Camu *et al.*, (1990) y el nuestro se puede concluir que el trasplante noradrenérgico tiene un efecto global sobre el fenómeno de epileptización, sin tener preferencia sobre alguna de las fases como es el caso de los trasplantes de rafe mesencefálico. Por otro lado, ninguno de los estudios demostró que los trasplantes modifiquen los parámetros del estado *kindled*.

El trasplante de rafe mesencefálico fetal tiene un efecto similar al de algunas sustancias que ocasionan un retraso o bloqueo en la evolución del *kindling* (epileptogénesis) sin bloquear el *kindled* ya establecido, entre ellas: los antagonistas muscarínicos, agonistas de noradrenalina, antagonistas glutamatérgicos e inhibidores de la recaptura de serotonina. Asimismo, los antiepilépticos utilizados en humanos para las crisis tónico-clónicas generalizadas tienen efecto bloqueando la evolución del *kindling* (McIntyre,

1991, Prendiville y Gale, 1993). Entre estos se encuentra la carbamazepina que es utilizada como medicamento de primera línea para el control de las crisis parciales complejas. Entre sus diversos mecanismos de acción se encuentra el aumentar la concentración central de serotonina (Yang *et al.*, 1989).

Resulta de interés que los agonistas serotoninérgicos (Favale *et al.*, 1995; Prendiville y Gale, 1993) y la carbamazepina (Yang *et al.*, 1989) sean medicamentos para el control de las crisis parciales complejas, mismo tipo de crisis donde encontramos un efecto selectivo por parte del trasplante de rafe mesencefálico fetal.

Nuestros resultados permiten especular que de acuerdo con los datos *in-vitro* de Hernández y Condés-Lara (1990, 1992) esta acción profiláctica podría corresponder a una sobreactivación de la bomba  $[Na^+/K^+]$  ATPasa en respuesta al incremento de la concentración de serotonina. La sobreactivación de esta ATPasa disminuiría la concentración extracelular de  $K^+$  dificultando la propagación de la actividad paroxística (ver fig. 1 de Traynelis y Dingledine, 1988). Sin embargo, debe de considerarse que el efecto observado puede deberse también a la acción inhibitoria de la serotonina sobre las células neuronales (Kovacz y Zoll, 1974).

El presente trabajo aporta conocimientos sobre el efecto de los trasplantes de rafe mesencefálico fetal sobre el proceso de epileptogénesis. Es necesario continuar investigando el mecanismo por el cual estos

transplantes retrasan el fenómeno de la epileptogénesis y tienen un efecto selectivo sobre la fase 1 descrita por Racine.

Los resultados presentados plantean la necesidad de formular nuevos experimentos para esclarecer el mecanismo de acción de los transplantes de rafe mesencefálico. Entre ellos es la cuantificación de sustancias como la serotonina; características electrofisiológicas del trasplante; el esclarecer la participación de diversas sustancias por medio del uso de agonistas y antagonistas; utilizar transplantes de células procedentes de cultivos específicos e incluso de células manipuladas genéticamente para favorecer la expresión o inhibición de alguna característica; etc.

De la misma manera, la falta de efecto por parte de los transplantes de células gliales plantea la necesidad de continuar trabajando sobre esta línea, inicialmente comprobando que la falta de efecto es por la desdiferenciación y no por un papel secundario de las células gliales en la fisiopatología de la epilepsia.

El tratamiento actual tanto médico como quirúrgico para el control de la epilepsia es en su mayoría paliativo y difícilmente curativo. Esto es debido a la falta del conocimiento exacto de la fisiopatología de esta enfermedad. Antes de plantear a los transplantes cerebrales como una tercera posibilidad para el tratamiento de la epilepsia, debemos de utilizar esta herramienta para encontrar los detalles aún desconocidos de esta disfunción cerebral y poder plantear nuevas estrategias terapéuticas.

### 13. Bibliografia.-

- Adams R. D., Victor M. eds. Principles of Neurology 1993 McGraw-Hill, New York.
- Albright P.S., Burnham W.M., Livingston K.E. Seizure patterns and pharmacological responses in the *kindling* model. En The limbic system: functional organization and clinical disorders. Doane B.K., Livingston K.E. (eds.) 1986. Raven Press, New York.
- Altobelli R. 1914, Gazz. Int. Med. Chir. 17:25 Innessi cerebrali
- Antonelli M. C., Costa-Lieste M., Mercado R, Hernández R. J.. 1998, Neuro. Chem. Res. 23:941-946 Serotonin modulation of low affinity ouabain binding in rat brain determined by quantitative autoradiography.
- Bancaud J., Talairach J., Morell P., Bresson M., Bonis A., Geiger S., Hemon E., Buser P. 1974, Clin. Neurophysiol. 37:275-282 Generalized epileptic seizures elicited by electrical stimulation of the frontal lobe in man.
- Barry DJ., Kakvadze I., Brundin P., Bolwing TG., Björklund A., Lindvall O. 1987, Proc Natl Acad Sci USA 84:8712-8715 Grafted noradrenergic neurons suppress seizure development in *kindling*-induced epilepsy.
- Barry DJ., Wanscher B., Kragh J., Bolwing TG., Kokaia M., Brundin P., Björklund A., Lindvall O. 1989, Exp Neurol. 106:125-132 Grafts of fetal *locus coeruleus* neurons in rat amygdala-piriform cortex suppress seizure development in hippocampal *kindling*.
- Bengzon J., Brundin P., Kalén P., Kokaia M., Lindvall O. 1991, Exp Neurol. 111:49-54 Host regulation of noradrenaline release from grafts of seizure-suppressant locus coeruleus neurons.
- Bengzon J., Kokaia Z., Lindvall O. 1993, Experimental Neurology. 122:143-154 Specific functions of grafted *locus coeruleus* neurons in the *kindling* model of epilepsy.
- Bengzon J., Kokaia M., Brundin P., Lindvall O. 1990, Exp Brain Res. 81:433-437 Seizure suppression in *kindling* epilepsy by intrahippocampal *locus coeruleus* grafts: evidence for an alpha-2-adrenoreceptor mediated mechanism.
- Björklund A., Dunnett S.B., Neuronal transplantation in adult rats. En Neuronal transplantation: a practical approach Dunnett SB., Björklund A. (Eds.) 1991 IRL press, Oxford.
- Björklund A., Stenevi U. 1984, Ann Rev Neurosci. 7:279-308 Intracerebral neuronal implants: neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries.
- Bradley P.B. 1986, Neuropharmacology 25, 563-576 Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-HT.

- Brailowsky S., Silva-Barrat C., Naquet R. **1989**, *Salud Mental* 12: 53-61 Actualización por Temas: elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental.
- Brudin P. Grafting of dissociated neuronal tissue (cell suspension transplantation). En: *Neuronal transplantation: a practical approach* Dunnett SB., Bjorklund A. (Eds.) **1991** IRL press, Oxford.
- Buzsáki G., Masliah E., Chen-Lan S., Horváth Z., Terry R., Gage F. H. **1991**, *Brain Res.* 554:30-37 Hippocampal grafts into the intact brain induced epileptic patterns.
- Buzsáki G., Ponomareff G., Bayardo F., Shaw T., Gage FG. **1988**, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9327-9330 Suppression and induction of epileptic activity by neuronal grafts.
- Cain D.P. **1977**, *Ann N Y Acad Sci.* 290:200-216 Seizure development following repeated electrical stimulation of central olfactory structures.
- Cain P. D., Corcoran E. M. **1985**, *Brain Res.* 338:327-336 Epileptiform effects of Met-enkephalin, b-endorphin and morphine: *kindling* of generalized seizures and potentiation of epileptiform effects by handling.
- Cameron R., Klein L., Shyjan A. W., Rakic P., Levenson R. **1994**, *Mol. Brain Res.* 21: 333-343 Neurons and astroglia express distinct subsets of Na, K-ATPase a and b subunits.
- Camu W., Marlier L., Lemer-Natoli M., Rondouin G., Privat A. **1990**, *Brain Res.* 518: 23-30 Transplantation of serotonergic neurons into the 5,7-DHT-lesioned rat olfactory bulb restores the parameters of *kindling*.
- Cavaleiro E. A., Fernández M. J., Turski L., Naffah- Mazzacoratti G. **1994**, *Epilepsia* 35:1-11 Spontaneous Recurrent Seizures in Rats : Amino Acid and Monoamine Determination in the hippocampus.
- Cavazos J. E., Golarai G., Sutula T. P. **1991**, *J. Neurosci.* 11:2795-2803 Mossy fibre synaptic reorganisation induced by *kindling*: time course for development progression and permanence.
- Clark M., Weis Susan RB., Post Robert M. **1993**, *Neur. Letters.* 161 :21-26 Autoradiographic analysis of serotonin receptors and transporter in *kindling* rat brain.
- Clough R., Statnick M., Maring-Smith M., Wang C., Eells J., Browning R., Dailey J., Jobe P. **1996**, *Neuroreport* 8:341-346 Fetal raphe transplants reduce seizure severity in serotonin-depleted GEPRs.
- Clough R.W., Browning R.A., Maring M.L., Jobe P.C. **1991**, *Exp. Neurol.* 112, 195-199 Intracerebral Grafting of Fetal Dorsal Pons in Genetically Epilepsy-Prone Rats: Effects on Audiogenic-Induced Seizures.



- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **1981**, *Epilepsia* 22:489-501 Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **1989**, *Epilepsia* 30:389-399 Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes.
- Cronin J., Obenaus A., Houser C. R., Dudek F. E. **1992**, *Brain Res.* 573:305-310 Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers.
- Chamberlin N. L., Dingledine R. **1988**, *Brain Res.* 445:12-18 GABAergic inhibition and the spontaneous epileptiform activity by low chloride and high potassium in the hippocampal slice.
- D'Abundo G. **1913**, *Riv. Ital. Neuropat. Psichiat. Elettrotet.* 6:145 Sulle manifestazioni di vitalità nei trapianti del tessuto nervoso
- Dahlström A., Fuxe K. **1964**, *Experientia* 20:398-399 Localization of monoamines in the lower brainstem.
- Dailey J.W., Mishra P.K., Ko K.H. **1992**, *Life Sci.* 50 :319-326 Serotonergic abnormalities in the CNS of seizure-naive genetically Epilepsy-Prone rats.
- Das G.D., Hallas B.H., Das K.B. **1979**, *Experientia* 35:143-153 Transplantation of neural tissue in the brains of laboratory mammals: technical details and comments.
- Daszuta A., Kalen P., Strecker R.E., Brudin P., Bjorklund A. **1989**, *Brain Res.* 498 :323-332 Serotonin neurons grafted to the adult rat hippocampus. II. 5-HT release as studied by intracerebral microdialysis.
- Daszuta A., Strecker R.E., Brudin P., Bjorklund A. **1988**, *Brain Res.* 458:1-19 Serotonin neurons grafted to the adult rat hippocampus. I. Time of growth as studied by immunohistochemistry and biochemistry.
- David W., McCandless, Abel M.S. Genetically based animal models of seizures. In *Animal models of neurological disease* Boulton A. A., Baker G. B., Butterworth R. F. eds. Vol II. **1992**:169-181. Humana Press, New Jersey.
- Delgado J., Sevillano M. **1961**, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 13:722-733 Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat.
- Dichter M. A., Ayala G.F. **1987**, *Science* July :157-164 Cellular mechanisms of epilepsy: a status report.
- Dichter M. A., Herman C. J., Selzer M. **1972**, *Brain Res.* 48:173-183 Silent cells during interictal discharges and seizures of hippocampal penicillin foci. Evidence for the role of extracellular  $K^+$  in the transition from the interictal state to seizures.

- Dingle R., McBain C. B., McNamara J. O. 1990, Trends. Pharmacol. Sci. 11:334-338 Excitatory amino acid in epilepsy.
- Drucker-Colín R., Aguilar-Roblero R., García-Hernández F., Fernández-Cancino F., Bermudez Rattoni F. 1984, Brain Res. 311:353-357 Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats.
- Dunn E. H. 1917, J. Comp. Neurol. 27:565 Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat.
- Dunnett S.B., Björklund A., Staging and dissection of the rat embryos. En: Neuronal transplantation: a practical approach Dunnett SB., Björklund A. (Eds.) 1991 IRL press, Oxford
- Dutar P., Nicoll R. A. 1988, Nature 332:156-158 A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors in the central nervous system.
- Elwes R. D. S., Johnson A. L., Shorvon A. D., Reynolds E. H. 1984, N. Engl. J. Med. 311:944-947 The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy.
- Favale E., Rubino V., Mainardi P., Lunardi G., Albano C. 1995, Neurology 45:1926-1927 Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans.
- Fernández-Guardiola A. 1992, Gaceta Médica de México. 128/4 Modelos experimentales de epilepsia.
- Fernández-Guardiola A., Condés-Lara M., Calvo J. M. Synaptic changes induced by optic chiasm low intensity repetitive electrical stimulation (The *kindling* effect). En: Regulatory mechanisms of synaptic transmission. Tapia R., Cotman C. (eds.) 1981:331 Plenum Press, New York.
- Fernández-Guardiola A., Martínez A., Fernández-Mas R. 1995, Epilepsy Res. 22:127-136 Repeated penicillin-induced amygdala epileptic focus in freely moving cats. EEG, polysomnographic (23-h recording), and brain mapping study.
- Fine A., Meldrum B.S., Patel S. 1990, Neuropsychologia, 28:627-634 Modulation of experimentally induced epilepsy by intracerebral grafts of fetal GABAergic neurons.
- Foster G.A., Schultzberg M., Gage .FH., Björklund A. 1988, Exp. Brain Res. 70:242-255 Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphe neurones after transplantation to the adult rat CNS. III. Grafts to the striatum.
- Freed W. J., Hoffer B. J., Olson L., Wyatt R. J. Transplantation of catecholamine-containing tissues to restore the functional capacity of the damaged nigrostriatal system. En Neuronal transplants, Sladek John R., Gash Don M. (eds.), 1984 Plenum Press. New York.

- Freeman J. M. A clinician's look at the developmental neurobiology of epilepsy. En Brain development and epilepsy, Schawartzkroin, Moshé, Noebels, Swann (Eds.) 1995. University Press, Oxford
- Gash D. M. Neuronal transplants in mammals, a historical overview. En Neuronal transplants. Sladek John R., Gash Don M.(eds.), 1984 Plenum Press, New York.
- Giordano M., Freed W. J. An overview of transplantation techniques in small animals. En: Methods in cell transplantation. Ricordi Camillo (Ed) 1995 Landes Company, New York.
- Giordano M., Hagenmeyer-Houser S.H., Sanberg P.R. 1988, Brain Res. 446:183-188 Intraparenchymal fetal striatal transplants and recovery in kainic acid lesioned rats.
- Girgis M. 1981, Neuroscience 6:1695-1706 *Kindling* as a model for limbic epilepsy.
- Glass M., Dragunow M. 1995, Brain Res. Review 21 :29-41 Neurochemical and morfological changes associated with human epilepsy.
- Gloor P. 1968, Epilepsia 9:249-263 Generalized cortico-reticular epilepsies. Some consideration of the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge.
- Goddard G. V., McIntyre D. C., Leech C. K. 1969, Experimental Neurology 25:295-330 A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
- Goldberg W.J., Bernstein J.J. 1987, J. Neurosci. Res. 17:391-403 Transplant-derived astrocytes migrate into host lumbar and cervical spinal cord after implantation of E14 fetal cerebral cortex into adult thoracic spinal cord.
- Goldstein D.S., Nadi N.S., Stull R. 1988, J. Neurochem. 50 :225-229 Levels of catechols in epileptogenic and non epileptogenic regions of the human brain.
- Grisar T., Frere J.M., Franck G. 1979, Brain Res. 165:87-103 Effect of K<sup>+</sup> ions on kinetic properties of the (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase (EC 3.6.1.3) of bulk isolated glial cells, perikarya and synaptosomes from rabbit brain cortex.
- Hauser W. A, Hesdorffer D. C. Eds. Epilepsy: frequency causes and consequences. 1990 Demos, New York.
- Hauser W. A, Hesdorffer D. C. Eds. Epilepsy: frequency causes and consequences. 1988 Churchill Livingstone, New York.
- Hernández J., Condes-Lara M. 1989, Brain Res. 480 :403-406 Serotonin dependent (Na,K)ATPase in *kindling* rats: a study in various brain regions.
- Hernández J., Condes-Lara M. 1992, Brain Res. 593 :239-244 Brain Na/K ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and *kindled* rats.
- Hernández R. J. 1987, Brain Res. 408:399-402 Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor.

- Hernández R.J. 1982, Dev. Neurosci. 5:326-331 A serotonin agonist-antagonist reversible effect on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the developing rat brain.
- Hernández-R. J. 1992, Neurochem Int. 20:1-10 Invited Review. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Regulation by neurotransmitters.
- Hess W. R. 1929, Arch. Psychiat. 88:813 Lokalisatorische Ergebnisse der Hirnreizversuche mit Schlafeffect.
- Hoffer B., Seiger A., 1974, Brain Res, 79:165-184 Electrophysiological and cytological studies of brain homografts in the anterior chamber of the eye: maturation of cerebellar cortex in oculo.
- Holmes G. L., Thompson J. L., Smeyne R. J., Wallace R. B. 1987, Epilepsia 28:242-250 Failure of neocortical transplants to alter seizure susceptibility in previously *kindled* rats.
- Holmes G. L., Thompson J. L., Stuart J. D., Carl G. F. 1992, Exp. Neurol. 116:2-63 Effects of neural transplantation on seizures in the immature genetically epilepsy-prone rat.
- Ian F. R. Culture of specific cell types. En Culture of animal cells. Ian F. R. (Ed.) 1994;309-348. Wiley-Liss, New York.
- Jackson J. H. Selected writings of J. Hughlings Jackson. En : On epilepsy and epileptiform convulsions. Taylor J.A. (Ed) 1931, Vol. 1: Hodder and Staughton London.
- Johnston D., Brown T. H. 1981, Science 211:294-297 Giant synaptic potential hypothesis for epileptiform activity.
- Joy R. M. 1985, Fundamental and Applied Toxicology 5:41-65 The effects of neurotoxicants on *kindling* and *kindled* seizures.
- Kalen P., Cenci M.A., Daszuta A., Lindvall O., Björklund A. 1990, Prog. Brain Res. 82:329-338 In vivo microdialysis: A new approach for the study of functional activity of grafted monoaminergic neurons and their interaction with the host brain.
- Kalichman Michael W. 1982, Neurosci. Biobehav. Rev. 6:165-181 Neurochemical correlates of the *kindling* model of epilepsy.
- Kesslak J. P., Bridges R. J. Application of astrocyte transplants as a therapeutic intervention. En: Providing pharmacological access to the brain alternate approaches. Flanagan T. R., Emerich D. F., Winn S. R. (Eds.) 1994 Academic Press, New York.
- Kesslak J. P., Nieto-Sampedro M., Globus J., Cotman C. W. 1986, Exp. Neurol. 92:377-390 Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation.
- Kikvadeze I., Foster G.A. 1995, Brain Research 692:111-117 Action Potential dependent output of 5-HT in the anaesthetized rat amygdalopiriform cortex is strongly inhibited by tonic 5HT(1B) receptors stimulation.
- Kimelberg H. K. 1995, Neurochem. Int. 26:27-40 Receptors on astrocytes-what possible functions?.

- Kimelberg H. K., Narumi S., Bourke R.S. **1978**, Brain Res. 153:55-77 Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures, and enzyme development in vivo.
- Kokaian M., Kalén P., Bengzon J., Lindvall O. **1989**, Neuroscience 32 :647-356 Noradrenaline and 5-HT release in the hippocampus during seizures induced by hippocampal *kindling* stimulation: An in vivo microdialysis study.
- Kovacz D.A., Zoll J.G. **1974**, Brain Res. 70:165 Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in the rat.
- Kromer L. F. Intracerebral embryonic transplants: a new experimental preparation for developmental neurobiology. En Neuronal transplants. Sladek John R., Gash Don M., **1984** Plenum Press, New York.
- Le Gros Clark W.E. **1940**, J Neurol. Psychiatry 3:263 Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue.
- Lerner-Natoli M. **1987**, Int . J. Neurosci. 36:3-4,139-151 Serotonin and *kindling* development.
- Lindvall O. **1991**, Trends Neurosci. 14:376-384 Prospects of transplantation in human neurodegenerative disease.
- Lopes da Silva F.H., Kamphuis W., Wadman W.J. **1992**, Acta Neurol Scand. Suppl. :34-40. Epileptogenesis as a plastic phenomenon of the brain, a short review.
- Loscher W., Ebert U., Lehmann H., Rosenthal C., Nikkhah G. **1998**, J. Neurosci. Res. 51:196-209 Seizure suppression in *kindling* epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra.
- Lund R.D., Hauschka S.D. **1976**, Science 193:582 Transplanted neural tissue develops connections with host rat brain.
- Madrazo I., Drucker-Colín R., Diaz V., Martínez-Mata J., Torres C., Becerra J.J. **1987**, N Engl J Med Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease.
- Malow B. A. **1996**, Neurol. Clin. 14:765-89 Sleep and epilepsy.
- Martínez-Lorenzana G. Tesis de Maestría **1998**, UNAM, México.
- May R. M. **1930**, Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 26:433 La greffe dans l'oeil de rat blanc adulte du tissu cerebral de rat nouveau-ne.
- May R. M. **1945**, Bull. Biol. Fr. Belg. 79:155 Régénération cérébrale provoquée par la greffe intraoculaire simultanée de tissu cérébral de nouveau-né et de nerf sciatique chez la souris.
- McGear L.P., Eccles J.S. (eds.) Molecular Neurobiology of the Mammalian brain. **1987**, London press, New York .

- McIntyre B. Anticonvulsants and the *kindling* model: a critical analysis. En: *Kindling and synaptic plasticity: the legacy of Graham Goddard*. Morrell F. (Ed.) 1991: 272-288. Birkhauser, Boston.
- McNamara J. O. 1984, Federation Proceedings 43:2516-2520 Role of neurotransmitters in seizure mechanisms in the *kindling* model of epilepsy.
- McNamara J. O. 1994, J. Neurosci. 14:3413-3425 Cellular and molecular basis of epilepsy.
- McNamara J. O. *Kindling* model of epilepsy. En : *Advances in Neurology* 1986, Vol. 44 :303-318 .
- McNamara J. O., Byrne M. C., Dasheiff R. M., Fitz J. G. The *kindling* model of epilepsy: a review. En : *Progress in Neurobiology* 1980, Vol. 15 :139-159 .
- McNamara J. O., Morriset R., Nadler J. V. Recent advances in understanding mechanisms of the *kindling* model. En : *Advances in Neurology* 1992, Vol. 57 :555-560
- Mercado R., Hemández J. 1992, Neurochem. Internatl. 21:119-127 Regulatoty role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase in rat brain.
- Miyamoto O., Itano T., Yamamoto Y. 1993, Brain Res. 603:143-147 Effect of embryonic hippocampal transplantation in amygdaloid *kindled* rat.
- Morison R. S., Dempsey E. W. 1942, Amer. J. Physiol. 135:281 A study of thalamocortical relations.
- Morison R. S., Dempsey E. W. 1943, Amer. J. Physiol. 138:297-308 Mechanism of thalamocortical augmentation and repetition.
- Moshé S. L., Shinnar S., Swann J. W. Partial (focal) seizures in developing brain. En : *Brain development and epilepsy* Schawartzkroin, Moshé, Noebels, Swann (Eds.) 1995. University Press, Oxford.
- Nikkhah G., Olsson M., Eberhard J., Bentlage C., Cunningham M.G., Björklund A. 1994, Neuroscience 63:57-72 A microtrasplantation approach for cell suspension grafting in the rat parkinson model: a detailed account of the methodology.
- Olney J. W., Fuller T., de Gubareff T. 1979, Brain Res. 76:91-100 Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats.
- Olson L., and Malmfors T. 1970, Acta Physiol. Scand. Suppl. Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat: fluorescence, histochemical and 3H-noradrenaline uptake studies using tissue transplantations to the anterior chamber of the eye.
- Paxinos George, Watson Charles The rat brain in stereotaxic coordinates. 1982, Academic Press, London
- Penfield W., Jasper H. 1954, Epilepsy and functional anatomy of the human brain. Little Brown & Co., Boston.

- Peña-Rangel T., Mercado R., Hernández-Rodríguez J. En prensa Regulation of brain Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase by serotonin: Identification of the participation receptors.
- Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L., Wyatt R.J. 1979, Science 204:643 Brain grafts reduced motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system.
- Peroutka S.J. 1988, Trends Neurosci. 11 :496-500 5-HT receptors subtypes: Molecular, biochemical and physiological characterization.
- Prendiville S., Gale K. 1993, Epilepsia 34:381-384 Anticonvulsant effect of fluoxetine on focally evoked limbic motor seizures in rats.
- Racine R. J. 1972a, Electroenceph. clin. Neurophysiol. 32:269-279 Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. After-discharge threshold.
- Racine R. J. 1972b, Electroenceph. clin. Neurophysiol. 32:281-294 Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure.
- Richter-Levin G., Greenberger V., Segal M. 1993, Exp. Neurol. 121 :256-260 Regional specificity of raphe graft induced recovery of behavioral functions impaired by combined serotonergic/cholinergic lesions
- Richter-Levin G., Segal M. 1989, Brain Res. 478 :184-186 Raphe cell grafted into hippocampus can ameliorate spacial memory deficits in rats with combined serotonergic deficiencies.
- Richter-Levin G., Segal M. 1990, Brain Res. 521 :1-6 Grafting of midbrain neurons into the hippocampus restores serotonergic modulation of hippocampal activity in the rat
- Richter-Levin G., Segal M. 1991, Brain Res. 566 :21-25 Restoration of serotonergic innervation underlies the behavioral effects of raphe grafts
- Rutecki P. Seizures and epilepsy. En: Secrets of Neurology Rolak L. A. (ed.) . 1993:275-288. Mosby, St. Louis, MO.
- Salgado D., Alkadhi K.A. 1995, Brain Res 669 :176-182 Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons.
- Saitykov S. 1905, Arch. Psychiatr. 40:329 Versuche über Gehirnreplantation, zugleich ein Beitrag zur Kenntniss reactiver Vorgänge an den zellinger Gehimelementen.
- Schwartzkroin P. A., Lindvall O. Kindling and transplantation: technical and conceptual issues for future research. En Kindling and synaptic plasticity. Morrell F. ed. 1991:252-271. Kirkhauser, Boston.
- Segal M. 1987, Ann.New.York.Acad.Sci. 495 :284-295 Interactions between grafted serotonin neurons and adults host rat hippocampus.
- Segal M., Azmitia EC. 1986, Brain Res. 364 :162-166 Fetal raphe neurons grafted into hippocampus develop normal adult physiological properties.

- Seilhean D., Gansmuller A., Baron-Van Evercooren A., Gumpel M., Lachapelle F. 1996, *Acta Neuropathol (Berl)* 91:82-88 Myelination by transplanted human and mouse central nervous system tissue after long-term cryopreservation.
- Siegel J., Murphy G.J. 1979, *Brain Res.* 174:337 Serotonergic inhibition of amigdala *kindled* seizures in cats.
- Sloviter R. S. 1987, *Science* 235:73-76 Decreased hippocampal inhibition and selective loss of interneurons in experimental epilepsy.
- Sloviter R. S. 1991, *Hippocampus* 1:41-66 Permanently altered hippocampal structure, excitability and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy.
- Sloviter R. S. 1994, *Hippocampus* 4 :250-253 On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals.
- Snead O. Carter. *The Sacred Disease: the neurochemistry of epilepsy.* En : *International Review of Neurology*, 1983, Vol. 24: 93-179.
- Spencer D.D., Robbins R.J., Naftolin F., Marek K.L., Vollmer T., Leranath C., Roth R.H., Price L.H., Gjedde A., Bunney B.S. 1992, *N Engl J Med*, 327:1541-1548 Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease.
- Stephen E., Amira K. 1995, *American.J.Physiology.* 269 :38-2 c295 Hormonal regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase: Mechanism underlying rapid and sustained changes in pump activity.
- Steriade M. Cellular substrates of brain rhythms. En *Electroencephalography basic principles, clinical application and related fields.* Niedermeyer E., Lopes da Silva F. (eds.) 1993:27-62. Williams and Wilkins, London.
- Stevens J. R., Phillips I., Freed W. J., Poltorak M. 1988, *Epilepsia* 29:731-737, Cerebral transplants for seizures: Preliminary results.
- Sthal W.L. 1986, *Neurochem. Int.* 8:449-476 The Na,K-ATPase of nervous tissue.
- Sutula T. P., Cavazos J. E., Woodard A. R. 1994, *Hippocampus* 4:254-258 Long-Term structural and functional alterations induced in the hippocampus by *kindling*: Implications for memory dysfunction and the development of epilepsy.
- Sweadner Kathleen J. 1992, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:S255-S259 Overlapping and diverse distribution of Na-K ATPase isozymes in neurons and glia.
- Talavera E. *et al.* 1998, Aceptado para publicación en *Nitric Oxide*.
- Talavera E., Omaña-Zapata I., Asai Miguel, Condés-Lara M. 1989, *Brain Res.* 485:141-148 Regional brain IR-Met-, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid *kindling*.



- Tauck D. L., Nadler J. V. 1985, J. Neurosci. 5:1016-1022 Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats.
- Thompson W.G., 1890, N.Y.Med.J. 28:701 Successful brain grafting.
- Traynelis S. F., Dingledine R. 1988, J. Neurophysiol. 59:259-276 Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice
- Tucker L. M., Morton A. J. 1995, J. Neurosci. Methods. 59:217-23 A simple method for quantifying changes in neuronal populations in primary cultures of dissociated rat brain.
- Verma A.K., Gupta S.K., Maheshwari M.C. 1984, Epilepsia 25 :449-501 5-HIAA in cerebrospinal fluid of patients with status epilepticus.
- Vizi E.S., Oberfrank F. 1992, Neurochem. Int. 20:11-17  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, Its endogenous ligands and neurotransmitter release.
- Wada Y., Nakamura M., Hasegawa H. 1993a, Neur. Letters. 159 :179-182 Intra-hippocampal injection of (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by *kindling* stimulation in cats.
- Wada Y., Nakamura M., Hasegawa H. 1993b, Neurosci.Res.Comm. 13 :143-148 Microinjection of the serotonin uptake inhibition fluoxetine elevates hippocampal seizures threshold in rats
- Wada Y., Shiraishi J., Nakamura M., Hasegawa H. 1995, Psychopharmacology 118:305-309 Prolonged but not acute fluoxetine administration produces its inhibitory effect on hippocampal Seizures in rats
- Wasterlain C. G., Denson G. F., LaRoy P., Raman S. 1993, Epilepsia 34 :537-553 Pathophysiological mechanism of brain damage from status epilepticus.
- Whitaker-Azmitia P. M., Clarke C., Azmitia E. C. 1993, Synapse 14:201-205 Localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors to astroglial cells in adult rats: Implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action.
- Wiklund L., Björklund A. 1980, Brain Res. 191:109-127 Mechanism of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II Fluorescence histochemical observations.
- Yan Q. S., Jobe P.C., Dailly J.W. 1995, Br. J. Pharmacol. 115 :1314-1318 Further evidence of anticonvulsant role for 5-HT in genetically epilepsy rats.
- Yang J., Elphick M., Sharpley A., Cowen P. 1989, Biol Psychiatry 26:324-328 Effects of carbamazepine on sleep in healthy volunteers.
- Zhou F.C., Auerbach S.B., Azmitia E.C. 1988, Brain Res. 450 :51-59 Transplanted raphe and hippocampal fetal neurons do not displace afferent inputs to the dorsal hippocampus from serotonergic neurons in the median raphe nucleus of the rat.

**Este trabajo se realizó con el apoyo de las Becas CONACyT  
# 114011, DGAPA 96/98 y Telmex # 2220010022**