

131



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

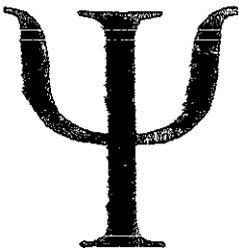
FACULTAD DE PSICOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

"CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA E  
HISTOLOGICA DE UN MODELO DE  
EPILEPTOGENESIS FOCAL EN EL HIPOCAMPO  
DORSAL DE LA RATA"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN PSICOLOGIA  
P R E S E N T A :  
HORTENCIA GERALDINE NIÑO CABRERA

DIRECTOR DE TESIS: MTRA. MARIA ROSA AVILA COSTA



MEXICO, D. F.

279072

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

La parte experimental de este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Simón Brailowsky K, en el laboratorio de neurofarmacología, departamento de Neurociencias, perteneciente al Instituto de Fisiología Celular (UNAM), con apoyo de DGAPA, U.N.A.M. (IN-203295).

Al estudiar el cerebro se pueden conocer las sustancias que contiene y entender el porqué de los efectos de las drogas capaces de afectarlo. Y cuanto mejor se conozca el cerebro, combatiremos sus enfermedades.

Dr. Simón Brailowsky

En memoria

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES, HORTENSIA CABRERA Y ADRIAN NIÑO POR HABER HECHO DE MI LO QUE SOY, POR SU AMOR, PACIENCIA Y APOYO INCONDICIONAL.

A PAPA ARTURO...TE QUIERO Y TE EXTRAÑO.

A ADRIAN, MI GRAN COMPAÑERO DE VIDA, COMPARTIENDO JUEGOS Y ENSEÑANZAS.

A VERO, POR ESCUCHARME Y SOPORTARME CUANDO ESTOY EN LA HISTERIA.

A YETLI, LA GRAN LUZ QUE ILUMINA MI VIDA.

A FERNANDO POR SER PARTE DE MI VIDA Y BRINDARME TODOS LOS MOMENTOS FELICES...;YA SABES!, GRACIAS POR TU PACIENCIA, AYUDA E INTERÉS. ESTE TRABAJO TAMBIÉN ES TUYO.

A LA FAMILIA CABRERA, GRACIAS POR HABERME BRINDADO CARIÑO Y COMPRENSIÓN, POR AGUANTARME TANTO Y POR AYUDARME A ENTENDER LA VIDA.

A LA FAMILIA NIÑO.

A MIS AMIGOS.- ANITA, MARY, RICARDIN, MIGUELÓN, CLAUDIA GONZALEZ, CLAUDIA DURAN, ISMAEL Y PAZ.

A MIS COMPAÑEROS DEL LAB.- CESAR, OSCAR, ESPERANZA, TERE, LUZ; EN ESPECIAL A LALO, ANGELICO Y PAZ, GRACIAS POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS Y POR HABER FORMADO PARTE DE MI VIDA, AUNQUE AHORA NO ESTEMOS JUNTOS. Y A TI CECI POR HABER CUIDADO A MIS RATAS.

## AGRADECIMIENTOS

A LA MTRA. MARIA ROSA AVILA COSTA POR AYUDARME A CONCLUIR ESTE TRABAJO, QUE VIO DESARROLLARSE.

AL DR. EDUARDO CALIXTO, POR SUS CRÍTICAS, SUGERENCIAS, CONSEJO Y ESTÍMULO.

A TERESA MONTIEL POR SU AYUDA EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

AL MTRO. ALFONSO SALGADO, AL DR. ISAAC SELIGSON, A LA DRA. SELENE CANSINO Y A LA LIC. GABRIELA OROZCO POR EL TIEMPO DEDICADO EN LA REVISIÓN Y COMENTARIOS DE ESTE TRABAJO.

SINODALES ASIGNADOS:  
MTRO. ALFONSO SALGADO  
DR. ISAAC SELIGSON  
DRA. SELENE CANSINO  
MTRA. MARIA ROSA AVILA  
LIC. GABRIELA OROZCO

## RESUMEN

La importancia clínica de la epilepsia focal justifica la búsqueda continua para nuevos y mejores modelos de la enfermedad en la cual los mecanismos y terapias potenciales pueden ser investigados.

Es sabido que la interrupción de un tratamiento prolongado con benzodiazepinas, carbamazepina, fenitoina o barbitúricos, induce a patrones electroencefalográficos alterados, como lo es la epilepsia, parecido al observado en la epilepsia generalizada o en epilepsia secundariamente generalizada.

El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG), es un modelo de epilepsia focal inducida por la interrupción abrupta de la infusión intracortical del ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Este modelo de hiperexcitabilidad neuronal ha sido estudiado ampliamente en la corteza cerebral, no así en estructuras del sistema límbico como el hipocampo *in vivo*. Con el antecedente de que el hipocampo es una estructura muy sensible a desarrollar epilepsia, se propuso caracterizar el SAG en esta región, así como los cambios histológicos producidos por el foco epiléptico.

Los resultados obtenidos indican que el cese de la infusión de GABA en el hipocampo (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) durante dos horas a un flujo constante de 3  $\mu\text{l}/\text{hr}$  producen un SAG cuya duración es mayor que la inducida por concentraciones 10 veces mayores del aminoácido en la misma estructura. La duración del SAG en el hipocampo dorsal es mayor que la observada en la corteza motora bajo las mismas condiciones de inducción.

El SAG es un modelo de plasticidad cerebral que destaca el sistema GABAérgico en la generación de la epilepsia. En este estudio se encontró una propagación del foco epiléptico al hipocampo contralateral, efecto que también se observa a nivel histológico, ya que se observa una reacción glial en el sitio de infusión y en el hipocampo contralateral. Es importante destacar que es la primera vez que se caracteriza el SAG en el hipocampo.

# ÍNDICE

## I. Introducción

1.1. Antecedentes históricos	1
1.2. Definición y clasificación de las epilepsias	1
1.3. Modelos de epilepsia	3
1.4. Definición del foco epiléptico en crisis epilépticas locales	4
1.5. El sistema GABAérgico	7
1.5.1. Metabolismo del GABA	7
1.5.1.1. La GAD	7
1.5.1.2. APOGAD	7
1.5.1.3. HOLOGAD	8
1.5.1.4. Mecanismos de regulación de la GAD	8
1.5.1.5. Mecanismos de inhibición de la GAD	8
1.5.2. Catabolismo del GABA	9
1.5.2.1. GABA-T	10
1.5.3. Receptores GABAérgicos	11
1.5.3.1. GABA <sub>A</sub>	11
1.5.3.2. GABA <sub>B</sub>	14
1.5.3.3. GABA <sub>C</sub>	15
1.5.3.4. GABA <sub>D</sub>	15
1.5.4. El sistema GABAérgico y la epilepsia	15
1.6. Organización anatómica y funcional del hipocampo	16
1.6.1. Aferencias hipocámpicas	18
1.6.2. Eferencias hipocámpicas	18
1.6.3. Tipos celulares	19
1.6.3.1. Neurotransmisión extrínseca	20
1.6.4. Conexiones sinápticas	20
1.6.5. Sinapsis de las colaterales de schaffer	20
1.6.6. Interacción local del área CA1	20
1.6.7. Neurotransmisión	21
1.6.7.1. El receptor GABA <sub>A</sub> en el hipocampo	21

1.6.8. Hipocampo y epilepsia	21
1.7. Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)	22
1.7.1. SAG en la rata	23
1.7.2. Patrones electroencefalográficos del SAG	24
1.7.3. Cambios histológicos	26
1.7.4. Cambios metabólicos	26
1.7.5. Cambios microfisiológicos	27
1.7.6. El SAG <i>in vitro</i>	27
1.7.7. Farmacología del SAG	27
II. JUSTIFICACIÓN	29
III. OBJETIVOS	29
IV. MÉTODO	30
V. RESULTADOS	33
VI. DISCUSIÓN	44
VII. CONCLUSIÓN	53
VIII. GLOSARIO	54
IX. REFERENCIAS	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
AOAA	Ácido aminooxiacético
ApoGAD	GAD <sub>65</sub> pegada a la membrana citoplasmática
Bb	Barbitúrico
Bz	Benzodiazepina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEG	Electroencefalograma
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil eter) N, N, N', N' tetracético
EOS	Sulfato de etanolamina
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor de GABA tipo A
GABA <sub>B</sub>	Receptor de GABA tipo B
GABA <sub>C</sub>	Receptor de GABA tipo C
GABA <sub>D</sub>	Receptor de GABA tipo D
GABA-T	γ-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa (GABA transaminasa)
GAD	L-glutamato-1-carboxiliasa (descarboxilasa del glutamato)
GDP	Guanosina difosfato
GLN	Glutamina
GLNASA	Glutaminasa
GLU	Ácido glutámico
GLY	Glicina

GS	Glutamino sintetasa
GTP	Guanosina trifosfato
GVG	Ácido 4-amino-hexa-5-enóico ó $\gamma$ -vinil GABA
HoloGAD	GAD <sub>67</sub> soluble
KG o $\alpha$ -CG	$\alpha$ -cetoglutarato
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	o-ftaldialdehído
PAL	Piridoxal
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLP	Fosfato de piridoxal
PMA	Piridoxamina-5'P
PXA	Piridoxina
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensajero
SAG	Síndrome de abstinencia al GABA
SAS	Semialdehído succínico
SNC	Sistema Nervioso Central
TAU	Taurina
TBPS	t-butilbiciclofosforotionato
THIP	4,5,6,7-tetrahidroisoxasol-piridinol

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

La palabra epilepsia deriva de una preposición y de un verbo irregular griego: *epilambanein*, que significa: ser sobrecogido bruscamente.

Desde hace mucho tiempo a la epilepsia se le ha considerado como un signo de castigo o motivo de persecución, de posesión del demonio o como una enfermedad contagiosa, lo cual prevaleció durante siglos (Rubio, 1997). Esta patología ha sido catalogada de diversas maneras a lo largo del tiempo; hacia el año 2000 a.C., en el código de Hammurabi (colección de leyes Babilónicas) ya existían reglas sociales específicas con respecto a la epilepsia, en este escrito se describen detalladamente lo que ahora llamamos crisis epilépticas tónico-clónicas generalizadas de tipo ausencia y crisis gelásticas (crisis de risa incontrolable), así como sus factores desencadenantes como son las emociones y la falta de sueño (Rubio, 1997). En México, durante la época prehispánica ya se distinguían dos tipos de epilepsia, una caracterizada por temblores y la otra por convulsiones y espasmos; se utilizaban algunos tratamientos o remedios herbolarios (citados en el código Badiano en 1552), como es el uso de "la flor de corazón", entre otras (Brailowsky, 1991).

### 1.2. Definición y clasificación de las epilepsias

La epilepsia es una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debida a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas (definición aceptada por la OMS, 1973).

Las epilepsias se dividen en tres grandes grupos: generalizadas, parciales y no clasificadas (ver cuadro 1), I) las crisis generalizadas en las que comúnmente no se puede identificar su origen en la corteza cerebral y presentan una propagación casi simultánea a todo el cerebro; II) las crisis epilépticas focales, tienen un origen en un área determinada de la corteza cerebral, en él los eventos clínicos y electroencefalográficos se observan por la activación de un grupo neuronal, localizado en una superficie específica cortical y III) las no clasificadas en los grupos anteriores (Feria y Tapia, 1986).

Cuadro 1.  
Clasificación Internacional de las epilepsias

---

- I) Parciales
    - Simples
      - Motoras
      - Sensitivas
      - Sensitivo-motoras
      - Autonómica-viscerales
      - Cognitivas
    - Complejas (Psicomotoras)
      - Con o sin aura
      - Con o sin automatismo
    - Secundariamente generalizadas
  - II) Generalizadas
    - Ausencias (petit mal)
    - Tónico-clónicas (grand mal)
    - Micoclónicas
    - Tónicas
    - Clónicas
    - Atónicas
  - III) Sin clasificar
- 

(Tomado de Fisher, 1991)

### 1.3. Modelos de epilepsia

Existen diferentes modelos en animales para inducir o generar hiperexcitabilidad *in vivo* e *in vitro*, estos modelos en animales presentan características similares a las observadas en las epilepsias humanas, estos han contribuido al estudio de la fisiopatología, el desarrollo e investigación de medicamentos en el tratamiento de las epilepsias. De acuerdo a su origen (inducción) estos modelos se agrupan como se muestra en el cuadro 2.

## Cuadro 2. Modelos de Epilepsia en Animales

### A Modelos de actividad epileptógena generalizada

1. Modelos Genéticos: Gallina, ratón (cepa DBA/2, Tottering); ciertas ratas Wistar y Fisher; Mandril senegalés *Papio papio*.

2. Crisis inducidas por estimulación eléctrica: Electrochoque, Kindling.

### 3. Modelos Farmacológicos

3.1 Agonistas de neurotransmisores excitadores: Glutamato, Aspartato, Homocisteinato, NMDA (N-metil-D-aspartato), Kainato, Pentilentetrazol, Flourotil, etc.

3.2 Agonistas de neurotransmisores inhibitorios: THIP (4.5.6.7-Tetrahidroisoxazolo[5,4-c] piridin-3-ol), Muscimol,  $\gamma$ -hidroxibutirato.

3.3 Antagonistas específicos de la inhibición GABAérgica: Alilglícina, ácido 3-mercaptopropiónico, Bicuculina, Picrotoxina, Penicilina,  $\beta$ -carbolinas, etc.

3.4 Convulsivantes de tipo Metabólico: Metionina, Sulfoximina, Acido-monofluoroacético, Deoxiglucosa.

3.5 Inhalantes: Fluorotil, Tolueno, Benzeno.

3.6 Crisis inducidas por abstinencia: GABA, Barbitúricos, Benzodiazepinas, alcohol, bromuros, etc.

### B. Modelos de actividad epileptógena parcial

1. Metales convulsivantes: Cobalto, Tungsteno, Fierro, Crema de aluminio, etc.

2. Temperatura: congelación, hipertermia

3. Estimulación eléctrica focal: Kindling.

4. Fármacos aplicados localmente en la corteza cerebral: Bicuculina, Picrotoxina, Penicilina, Baclofén, Ouabaina, estriocnina, Kainato, Toxina tetánica, Estrógenos conjugados, acetilcarnitina, etc.

5. Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG).

### C. Modelos *in vitro*.

1. Tejido epiléptico (Proveniente de animales con hiperexcitabilidad *in vivo*).

2. Estimulación eléctrica.

3. Manipulación iónica: alto potasio, cero magnesio, bajo calcio.

4. Infusión de fármacos en tejidos aislados: Bicuculina, Picrotoxina, Penicilina, 4-Aminopiridina, etc.

5. Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG).

Modificado de Brailowsky, 1991.

Debido a la información generada por los modelos enumerados en el cuadro 2, es posible entender los fenómenos neuronales relacionados con la generación de las crisis epilépticas. En experimentos *in vivo*, la inyección de agentes químicos de manera local o sistémica disminuyen los sistemas inhibitorios o incrementan la excitación induciendo epilepsia en el laboratorio; otro ejemplo es el grupo de epilepsia experimental relacionado con la producción de crisis recurrentes mediante la interferencia de la función sináptica. Se ha demostrado que la actividad epiléptica *in vitro* es causa de la excitación sináptica con características de sincronización de potenciales de acción en redes de neuronas piramidales del hipocampo acompañado por un decremento en la inhibición GABAérgica. También se ha cuantificado que los cambios iónicos intra o extra celular pueden favorecer las crisis epilépticas. Estos avances en el conocimiento del fenómeno epiléptico basados en modelos experimentales tienen como objetivo el mejor tratamiento de las epilepsias (Brailowsky, 1991).

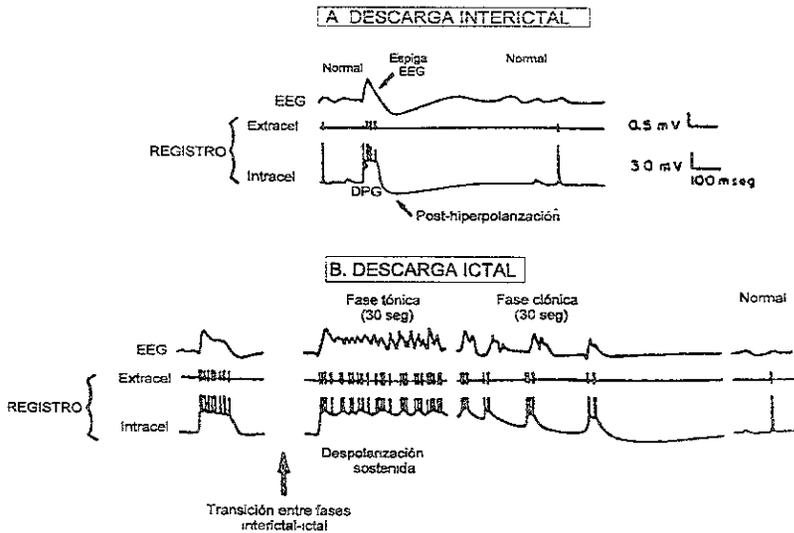
#### 1.4. Definición del foco epiléptico en crisis epilépticas locales

En estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha evidenciado una relación entre la actividad neuronal y la descarga epiléptica; actualmente se pueden distinguir varios tipos de neuronas por la actividad eléctrica que desarrollan las neuronas que se encuentran en el centro del foco epiléptico: las del grupo I (Brailowsky, 1997) son células capaces de producir descargas paroxísticas (potenciales de acción en ráfaga), esta actividad se caracteriza en el EEG por generar un grupo de ondas de aparición y desaparición abrupta, que contrastan con la actividad de fondo por su frecuencia, morfología y amplitud, puesto que ésta es continua, persistente y generalizada. Las neuronas del grupo II se encuentran alrededor de las del núcleo formado por las de tipo I, y son capaces de descargar en forma normal o en modo epiléptico (en trenes de alta frecuencia).

Se ha sugerido que las espigas del EEG reflejan la sincronización de un gran número de neuronas del grupo I, al encontrar estos dos grupos de neuronas en número suficiente y en estado de mayor excitabilidad, el reclutamiento de las mismas produce una descarga epiléptica que al propagarse generará una crisis focal y secundariamente generalizada. En registros de tipo intracelular de focos epilépticos se ha identificado una despolarización lenta de gran amplitud,

asociada con un tren de potenciales de acción de alta frecuencia, este complejo de despolarización sostenida se denomina despolarización paroxística gigante (*paroxysmal depolarization shifts-PDS*) (Fig. 1), en la generación de estas crisis participan diversos factores, entre los principales se encuentran:

1. Incremento en la actividad de grupos neuronales con propiedades intrínsecas de generación de descargas paroxísticas en forma de tren.
2. La pérdida de los mecanismos post-sinápticos inhibitorios (desinhibición).
3. El acoplamiento sináptico excitatorio al interior de las poblaciones neuronales.
4. Modificación de la modulación de corrientes iónicas, por ejemplo canales de calcio tipos T y L, y/o cambios en las conductancias de K<sup>+</sup>.



Tomado de Brailowsky, 1997.

Fig.1. El proceso epiléptico se identifica electrofisiológicamente por la aparición de dos tipos de espigas, (A) las interictales, las cuales pueden ser espigas locales o se pueden propagar a otras áreas del cerebro con intensidad variada y corta duración en el electroencefalograma (EEG), éstas están representadas como espigas punta-onda; y (B) las ictales, éstas consisten en descargas paroxísticas de morfología diversa en el EEG, caracterizada por puntas rítmicas rápidas, que aumentan de amplitud y disminuyen de frecuencia.

DPG = despolarización paroxística gigante.

La glia es otro factor de importancia en las crisis convulsivas (Brailowsky y cols, 1989), ya que estas células aumentan en número, y en su actividad enzimática, metabólica y de intercambio iónico (ATPasas, glucolisis, gluconeogénesis, cambios en los ambientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , etc.); este incremento en la capacidad de la glia para regular la homeostasis iónica puede ser un factor de control en la propagación y extinción de la actividad convulsiva; por el contrario, una disfunción de estos mecanismos gliales interviene en el inicio y mantenimiento de las descargas epilépticas.

## 1.5. El sistema GABAérgico

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el SNC de los mamíferos; juega un papel importante junto con el glutamato en el mantenimiento del equilibrio entre las sinapsis inhibitoras y excitadoras (Tapia, 1983; 1991; Olsen, 1991).

### 1.5.1. Metabolismo del GABA

El metabolismo del GABA tiene como precursor al glutamato ya que su síntesis está dada mediante una sola reacción a partir de la enzima, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) -por sus siglas en inglés- y con la coenzima: fosfato de piridoxal (PLP), (Olsen, 1991).

#### 1.5.1.1. La GAD

Es una enzima que utiliza como sustrato al ácido glutámico proveniente de la transaminación del  $\alpha$ -ceto glutarato ( $\alpha$ -CG) metabolito del ciclo de Krebs, o de la desaminación de la glutamina. La GAD sintetiza al GABA mediante una reacción de descarboxilación del sustrato, produciéndose también CO<sub>2</sub> en el proceso (Tapia 1983; Pasantes y cols, 1991).

Se han descrito dos tipos de GAD, una en forma de apoenzima (separada del cofactor) y la otra como holoenzima (unida al cofactor), permitiendo la existencia de variabilidad en la regulación de la función GABAérgica (Tapia y cols, 1971; Bayón y cols, 1977; Cobarrubias y Tapia 1980).

#### 1.5.1.2. A) APOGAD

Ante los diversos trabajos realizados con el fin de caracterizar a la enzima, se encontró que la apoenzima tiene un peso molecular de 65 KDa, por lo que se denomina GAD65 (Erlander y cols, 1991; Martín y cols, 1991; Karlsen y cols, 1991; Bu y cols, 1992). Esta proteína se encuentra en terminales nerviosas (Greif y cols, 1991, 1992), unida a la membrana y liposomas (Tapia y Sandoval 1971; Covarrubias y Tapia, 1978 y 1980). Además de que necesita al cofactor (PLP) para su activación (Tapia, 1983; Kaufman y cols, 1991; Denner y Wu, 1985); el cual se encuentra libre en el citoplasma, para la posterior síntesis de la cinasa de piridoxal (PK) a partir del piridoxal (PAL), que a su vez se interconvierte con la piridoxina, o la piridoxamina, componentes de la vitamina B6.

De lo anterior se desprende la importancia de la concentración de PLP libre para la regulación de la GAD (Tapia, 1983; Pasantes y cols 1991).

#### 1.5.1.3. B) HOLOGAD

La holoenzima tiene un peso molecular de 67 KDa por lo que se denomina GAD67 (Erlander y cols, 1991; Pasantes y cols, 1991), esta proteína se encuentra soluble en el sinaptoplasma (Tapia, 1983; Tapia y Sandoval, 1971; Bayón y cols, 1977; Covarrubias y Tapia, 1980; Kaufman y cols, 1991; Denner y Wu, 1985).

#### 1.5.1.4. C) Mecanismos de regulación de la GAD

La GAD es una enzima estrechamente relacionada con los procesos de inhibición GABAérgica del SNC. La holo y la apoenzima se pueden interconvertir por medio de una serie de reacciones propias del metabolismo de la GAD. La cinasa de piridoxal (CP) mantiene las pozas endógenas de PLP que activan a la apoenzima (Tapia, 1983; Martin y Rimvall, 1993) y modula también la cantidad activa de ésta. Si existe exceso de PLP, el ATP se separa de la enzima. Los niveles de sustratos pueden actuar como reguladores de la GAD (Tapia, 1983) en donde el GABA actúa como inhibidor competitivo de la enzima por un mecanismo de retroalimentación negativa (Grossfeld y cols, 1984). También el ácido glutámico aumenta o disminuye la actividad de la GAD, así como la disponibilidad de glutamato, es decir que a niveles bajos de este sustrato disminuye la síntesis de GABA. A su vez la concentración de glutamina regula la enzima y por consiguiente también a los niveles de GABA (Tapia, 1983; 1991).

Existen otros factores reguladores de la actividad de la GAD, tales como el ATP y el fosfato inorgánico (Pi), (Erlander y cols, 1991; Tapia, 1983). El ATP además de mantener los niveles de PLP es un inhibidor indirecto de la apoenzima actuando en un sitio alostérico. Por otra parte algunos iones como el zinc podrían mantener alguna intervención en el proceso de regulación de la actividad de la GAD puesto que sus niveles fisiológicos pueden activar a la cinasa de piridoxal, que a su vez regula los niveles de PLP necesarios para la activación de la GAD (Tapia, 1983).

#### 1.5.1.5. Mecanismos de inhibición de la GAD

La disminución en la actividad de la GAD produce un decremento en las pozas endógenas del GABA.

Los inhibidores competitivos de la GAD inducen epilepsia, por ejemplo el ácido 3-mercaptopropiónico produce crisis en tiempos muy cortos después de su administración (Tapia, 1975).

En un modelo de convulsiones febriles en ratas jóvenes (Arias y cols. 1992), se cuantificó como característica principal una disminución de la actividad de la GAD; en estos animales los niveles endógenos de GABA disminuyen, siendo la causa más probable para generar la aparición de crisis. Otros factores que generan crisis o las desencadenan pueden ser las dietas deficientes en vitamina B6 o en alguno de sus componentes, el piridoxal, la piridoxina y la piridoxamina, así como la utilización de análogos estructurales, como la 4-desoxipiridoxina, o las hidrazidas. Los efectos pueden revertirse administrando PLP o vitamina B6. Los mecanismos de acción asociados con estas crisis tienen que ver con la inhibición de la cinasa del piridoxal, el bloqueo de la síntesis del PLP o la competencia con el PLP por sus sitios de unión en la apoenzima. En estudios realizados en ratas (Sharma y Dakshinamurti, 1992), demostraron que una dieta deficiente en piridoxina durante 10 semanas, produce una actividad convulsiva espontánea. Los animales al tener menor disponibilidad de PLP libre, cofactor necesario para la GAD, muestran un decremento en la actividad de esta enzima, lo cual favorece un incremento en la sensibilidad a las crisis epilépticas inducidas por picrotoxina.

Otro ejemplo es el modelo de epilepsia inducido en ratas jóvenes por la administración intraperitoneal de la hidrazona del ácido glutámico, droga que afecta directamente a la GAD disminuyendo su actividad. Los homogenados del cerebro de estos animales, muestran un decremento tanto en los niveles de GABA como en la actividad de la GAD (Massieu y cols, 1994).

### 1.5.2. Catabolismo del GABA

#### 1.5.2.1. GABA-T

El GABA, es recapturado por la terminal nerviosa o introducido por la glia por un transporte activo dependiente de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>; el aminoácido es metabolizado por la transaminación producida por la transaminasa del GABA (GABA T); esta enzima tiene como cosustrato al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar de nuevo glutamato y semialdehído succínico (Tapia, 1983). La GABA-T es una enzima que se localiza en las mitocondrias de las neuronas y de la glia. (Ver fig. 2) La inhibición de esta enzima incrementa la concentración de GABA en las terminales presinápticas. Se han utilizado diferentes inhibidores de la GABA-T por sus efectos

anticonvulsivos en diferentes modelos de epilepsia. Sin embargo, la disminución de la excitabilidad neuronal no siempre se favorece por el incremento de GABA.

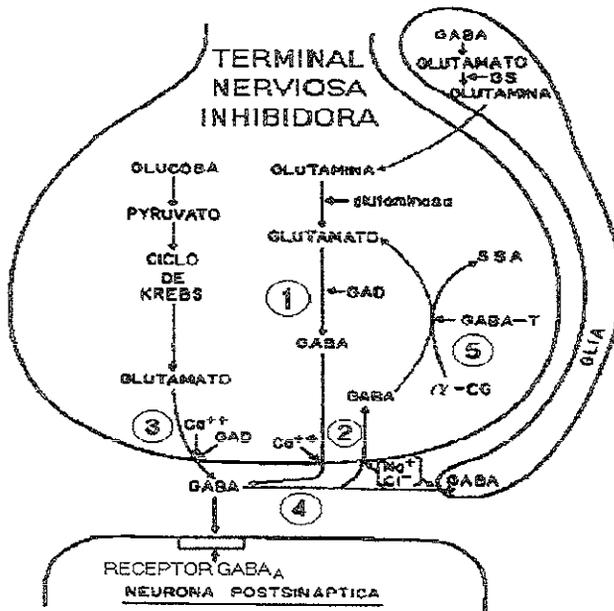


Fig. 2. Sinapsis GABAérgica. 1) En la terminal nerviosa inhibitoria, el GABA se sintetiza por la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD); 2) Esta enzima puede estar soluble en el citoplasma de la terminal y alimenta una poza de GABA que es liberado mediante el mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ , sin embargo, otra población de la GAD puede unirse a la membrana presináptica, 3) unión que depende de la presencia de cationes como el  $Ca^{2+}$ , de tal modo que la liberación de GABA ocurre de manera acoplada a su síntesis. El GABA liberado por cualquiera de estos dos mecanismos puede ser recapturado por la terminal o por las células gliales, 4) mediante un transporte activo que depende de  $Na^+$  y de  $Cl^-$ , y es metabolizado mediante una reacción de transaminación, 5) con  $\alpha$ -cetoglutarato como cosustrato, catalizada por la GABA-transaminasa (GABA-T), de esta reacción se forman semialdehído succínico (SSA) y glutamato, el que al estar en la glia puede ser utilizado para formar glutamato, precursora a su vez del glutamato en la terminal (Tapia,1991).

En diferentes modelos de epilepsia, el incremento en la concentración endógena de GABA, favorece una transmisión GABAérgica. Kendall y colaboradores en 1981 demostraron que varias horas después de administrar sistémicamente en ratones  $\gamma$ -vinil-GABA (VVG), el cual inhibe a la enzima que cataboliza al GABA, los niveles de GABA se incrementan y disminuyen las crisis tónico-clónicas inducidas por bicuculina o picrotoxina.

Löscher y colaboradores en 1989 demostraron que, el ácido amino-oxiacético (AOAA) administrado sistemicamente, durante 30 min, inhibe la GABA-T en diferentes regiones cerebrales de la rata: la corteza frontal, el estriado, el hipocampo, el tálamo, en la sustancia nigra, el cerebelo, etc., al mismo tiempo se incrementan los niveles de GABA en estas mismas regiones. La conducta de los animales no se modifica y no se afecta la actividad de la GAD, ya que se requieren concentraciones elevadas de AOAA para hacerlo. Estos resultados sugieren que diferentes inhibidores de la catálisis del GABA pueden utilizarse como antiepilépticos al incrementar los niveles endógenos de GABA.

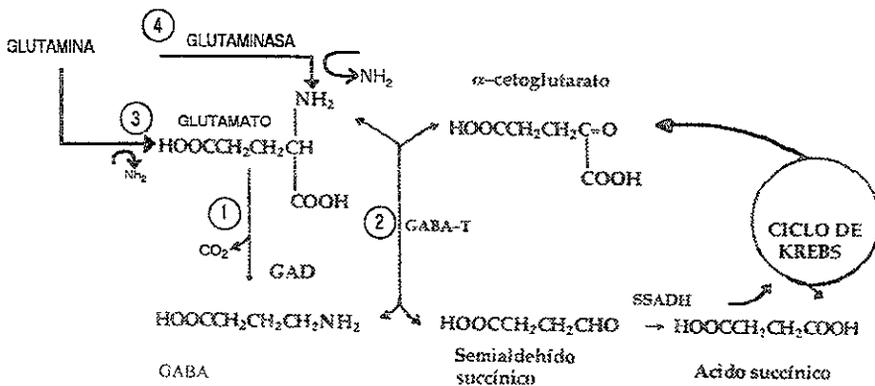


Fig. 3. 1) El GABA es catalizado por la GABA-T. 2) El glutamato formado en esta reacción es utilizado para formar glutamina, 3) la cual es transportada a las terminales sinápticas en donde mediante la acción de la glutaminasa, sirve como precursor del glutamato, que a su vez es descarboxilado por la GAD para producir GABA (Tapia, 1991).

### 1.5.3. Receptores GABAérgicos

Algunos aminoácidos ejercen su acción en el cerebro sobre proteínas membranales específicas. En el caso del GABA son de 2 tipos principales: el receptor  $\text{GABA}_A$  y el receptor  $\text{GABA}_B$  (Bormann 1988; Olsen y Tobin, 1990).

#### 1.5.3.1. $\text{GABA}_A$

El receptor  $\text{GABA}_A$  está localizado a nivel postsináptico (DeLorey y Olsen, 1992), cambia su conformación tridimensional al unirse el GABA o con análogos estructurales a éste, como el muscimol, producto natural proveniente del hongo alucinógeno *Amanita muscaria*, ó el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolpiridinol

(THIP) que es un análogo sintético. El agonista al interactuar con el receptor permite el paso de iones de cloro al interior de la célula, a favor de su fuerza electromotriz; esos iones con carga negativa generan una hiperpolarización membranal y de esta manera se inhibe la excitabilidad neuronal. El receptor posee diferentes sitios de reconocimiento: uno es específico para el GABA, para su agonista el muscimol, uno reconoce a la bicuculina que es un antagonista competitivo. Otros sitios dentro de la estructura del receptor son para las benzodiazepinas (BZ) y los barbitúricos (Bb), en este sitio también se reconoce al etanol, otro sitio es reconocido por algunos esteroides, además de un sitio para la unión de picrotoxina. Este último es reconocido también por el TBPS (t-butilbencilo-fosforotionato).

La estructura molecular del receptor-canal  $GABA_A$ , está conformada por varios subtipos de proteínas membranales o subunidades (Olsen y cols, 1991). Existen seis tipos de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_{1-5}$ ) (Fuchs y cols, 1990; Khrestchatisky y cols, 1989; Lüddens y cols, 1990; Pritchett y Seeburg, 1990; Stephenson y cols, 1989; Wisden y cols, 1991; Ymer y cols, 1989a), 4 de tipo  $\beta$  ( $\beta_{1-4}$ ) (Bateson y cols, 1991; Lolait y cols, 1989; Ymer y cols, 1989b), 3 de tipo  $\gamma$  ( $\gamma_{1-3}$ ) (Herb y cols, 1992; Kofuji y cols, 1991; Pritchett y cols, 1989; Wilson-Shaw y cols, 1991), las variantes de éstas las  $\gamma_{2L}$  y  $\gamma_{2S}$  (Kofuji y cols, 1991; Whiting y cols, 1990), 1 de tipo  $\delta$  ( $\delta_1$ ) (Benke y cols, 1991; Olsen y cols, 1991; Lüddens y Wisden, 1991) y 1 de tipo  $\rho$  ( $\rho_1$ ) (Cutting y cols, 1991).

Cada subunidad contiene cuatro regiones hidrofóbicas que cruzan la membrana (dominios  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  y  $M_4$ ), los extremos amino y carboxilo se localizan en el exterior y el dominio  $M_2$  participa en la formación del revestimiento del canal de  $Cl^-$  dentro del receptor (Barnard y cols, 1987; Mohler y cols, 1990; Olsen y Tobin, 1990). (Ver fig. 4) Teóricamente se pueden producir cerca de 10,000 subtipos diferentes del receptor  $GABA_A$ ; que poseen diversa susceptibilidad farmacológica al mismo GABA y a los fármacos que modulan su actividad (Bureau y Olsen, 1990; Gallagher y Tallman, 1990; Knoflach y cols, 1992; Mohler y cols, 1990; Pritchett y cols, 1989; Siegel y cols, 1990; Wisden y cols, 1991), por ejemplo, los receptores  $GABA_A$  que expresan la subunidad  $\gamma_2$  en combinación ya sea con  $\alpha$  y  $\beta$  son altamente sensibles a las benzodiazepinas (Knoflach y cols, 1992; Lolait y cols, 1989; Lüddens y Wisden, 1991; Pritchett y Seeburg, 1990; Pritchett y cols, 1989; Puia y cols, 1989; Ymer y cols, 1989 a y b).

No obstante de las diferentes subunidades que pueden conformar al receptor, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son necesarias para la actividad del receptor en presencia de benzodiazepinas (Olsen y Tobin, 1990). Las diferentes combinaciones de estas subunidades proporcionan una amplia diversidad en las propiedades farmacológicas de este receptor. La subunidad  $\beta$  es reconocida por el GABA o por sus agonistas. Las benzodiazepinas (DeLorey y Olsen, 1992) modulan la respuesta del receptor incrementando la frecuencia de apertura del canal de  $\text{Cl}^-$ . Este efecto se inhibe en forma eficiente con los agonistas inversos de las benzodiazepinas, como son las  $\beta$ -carbolinas (Bormann, 1988). Los barbitúricos modulan la actividad del receptor prolongando el tiempo que dura abierto el canal a  $\text{Cl}^-$  (DeLorey y Olsen, 1992).

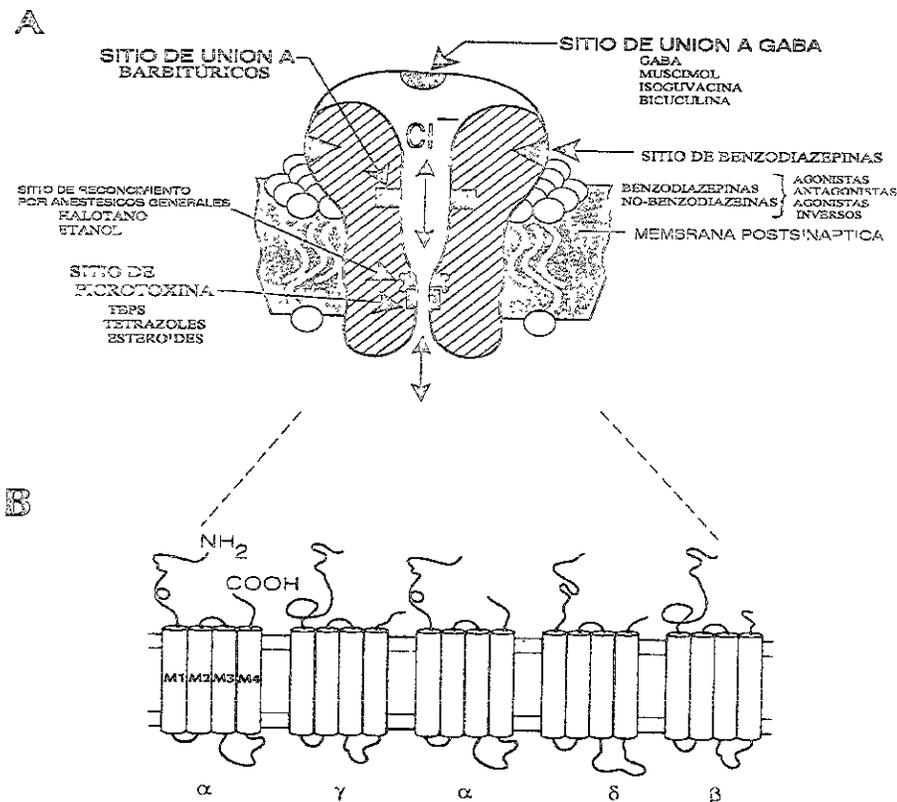


Fig. 4. Receptor ionotrópico tipo GABA<sub>A</sub>; complejo macromolecular que permite observar al receptor funcional como un canal aniónico (Cl<sup>-</sup>). A: se muestran sus sitios funcionales y específicos de unión, los sitios de unión para el GABA y los diversos agonistas y antagonistas. B: se observan los dominios transmembranales de cada subunidad que conforman al receptor (M1, M2, M3 y M4). Tomado de Grayson y cols., 1991.

#### 1.5.3.2. Receptor GABA<sub>B</sub>

El receptor GABA<sub>B</sub> es primordialmente pre-sináptico (Bormann, 1988). La unión del GABA a este receptor, puede iniciar dos tipos de respuesta a nivel intracelular: la primera involucra al segundo mensajero, GMPc; la segunda interviene en el cierre de canales de Ca<sup>2+</sup>, las cuales controlan la liberación de transmisores de las terminales nerviosas. Un agonista del receptor GABA<sub>B</sub> es el baclofen y el antagonista selectivo el faclofen (Barnard y cols., 1998).

#### 1.5.3.3. Receptor GABA<sub>c</sub>

El receptor GABA<sub>c</sub> es de tipo ionotrópico e insensible a bicuculina y baclofen. Sus respuestas son de asociación rápida con la apertura de un canal aniónico, sin afectación por parte de los moduladores típicos del receptor GABA<sub>A</sub>. La respuesta nativa de este tipo de receptor ocurre en las células bipolares y horizontales de la retina. Comparado con el receptor GABA<sub>A</sub>, el receptor GABA<sub>c</sub> es activado con bajas concentraciones de GABA y su inhibición es más duradera que la mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> (Johnston, 1996).

#### 1.5.3.4. Receptor GABA<sub>b</sub>

Otro tipo de receptor es el GABA<sub>b</sub>, el cual es de tipo ionotrópico, es insensible a antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, y del GABA<sub>c</sub> (Barnard y cols., 1998).

Este receptor se ha localizado en el tallo cerebral de embriones de rata y en neuronas piramidales hipocampales. Estudios realizados por Perkins y cols., 1996, sugieren que este receptor se expresa en situaciones de cambios en la excitabilidad como lo es en la ontogenia, en neuronas piramidales del hipocampo, donde puede ocurrir una selectividad iónica diferente vista al de tipo GABA<sub>A</sub>; en la que tiene lugar un cotransporte de Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>.

#### 1.5.4. El sistema GABAérgico y la epilepsia

En condiciones normales los sistemas excitatorios e inhibitorios del cerebro se encuentran en equilibrio, pero al existir un incremento del tono glutamatérgico o una disminución en la neurotransmisión GABAérgica, se induce una hiperexcitabilidad neuronal, lo cual es la característica de la epilepsia (Tapia, 1991).

El estudio de la génesis y mantenimiento de la mayoría de las epilepsias, ha mostrado que existen alteraciones específicas en la transmisión GABAérgica, como: a) degeneración de las terminales GABAérgicas (Ribak y cols., 1986); b) interferencia con la acción sobre receptores específicos debidos al bloqueo en la corriente de cloro del receptor GABA<sub>A</sub>, a los cambios en la cantidad de receptores disponibles, o a la disminución de la afinidad del ligando por su receptor (Manyam y cols., 1980; Lloyd y cols., 1986); c) reducción en la concentración endógena

del GABA, por la inhibición en la síntesis del neurotransmisor o por el incremento en la actividad de los sistemas de degradación del neurotransmisor, o por un decremento en la liberación del aminoácido (Arias y cols., 1992; Sharma y cols., 1992; Massieu y cols., 1994).

#### 1.6. Organización anatómica y funcional del hipocampo

El hipocampo constituye sólo una parte del sistema límbico y se relaciona con aspectos emocionales relativos a la supervivencia del individuo y de la especie, respuestas vegetativas y mecanismos para la memoria. También al hipocampo se le ha considerado como la más compleja de las áreas de asociación supramodal, ya que esta estructura recibe e integra información de todas las modalidades sensoriales (Brown y Zador, 1990). El hipocampo en humanos está formado por el giro dentado, las astas de Ammon (CA) y el subículo. Posee una corteza trilaminar a nivel del giro dentado y del asta de Ammon, pero existe una transición en el subículo en donde se observa la formación de 6 capas (Bayer, 1985).

El hipocampo en mamíferos puede ser dividido en cuatro regiones que están designadas como CA1-CA4. En donde la región CA2 es tan pequeña o indistinta que en algunas especies es ignorada, la región CA1 y CA3 constituyen propiamente la mayor parte del hipocampo y el área entre el giro dentado y el estrato granuloso de la región CA3 es llamado el hilus.

El hipocampo y el giro dentado de rata tienen cortezas de tres capas. Las tres capas del hipocampo son el estrato oriens (capa polimórfica), estrato piramidal (capa piramidal) y estrato lacunoso molecular (capa molecular). El giro dentado consiste en una capa polimórfica (hilus), una capa granular (estrato granular), y una capa molecular (estrato molecular). La capa molecular del dentado es continua con la del hipocampo.

Adyacente al giro dentado hay un sistema de asociación con extensas fibras, las cuales terminan sobre dendritas de la capa molecular. Las células granulares tienen una proyección a CA3 la cual no es recíproca; la formación neuronal de CA3 da extensas proyecciones a otros niveles de CA3. Otras fibras colaterales son las de Schaffer, las cuales llegan a la capa CA1. Tanto en CA1 como en CA3 hay interneuronas, las cuales contribuyen con proyecciones locales inhibitorias.

El asta de Ammon se compone del estrato alveus donde cursan las fibras aferentes de otras regiones que llegan al hipocampo, y las eferentes que son los axones de las células piramidales del hipocampo; en el estrato oriens se encuentran fibras aferentes, eferentes, células en canasta y otras células pequeñas, dirigiendo todas estas sus axones a estratos más profundos. El estrato de células piramidales da origen a las dendritas basales que se distribuyen horizontalmente por el estrato oriens y una dendrita apical que ramifica en los estratos radiados y molecular. De la base de su soma, parte el axón que llega a los estratos oriens y alveus pasa a la fimbria, posteriormente al fornix, que constituye la principal vía eferente del hipocampo, sus axones dan ramas colaterales (colaterales de Schaffer) que penetran al estrato lacunoso-molecular, y hacen sinapsis con las dendritas apicales de otras células piramidales. En el estrato radiado se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales; finalmente el estrato lagunoso molecular es el más profundo y contiene las ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras que llegan al hipocampo (Barr, 1975; Brown y Zador, 1990). Ver figura 5.

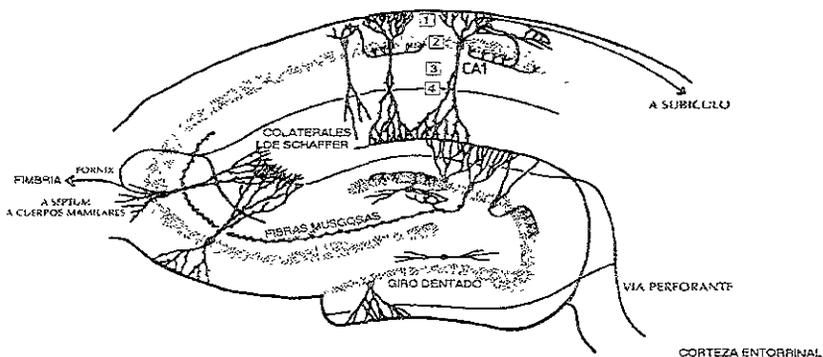


Figura 5. Esquema de un corte sagital de hipocampo de rata. Elementos neuronales de la formación hipocampal. El hipocampo en CA está dividido en estrato oriens (1), estrato piramidal (2), capa de cuerpos neuronales, estrato radiado (3), y estrato lacunoso molecular (4). La principal aferencia de la corteza cerebral al hipocampo esta dada por la corteza entorrinal, así como las proyecciones que se dirigen al hipocampo a través del subículo y corteza entorrinal (Tomado de Brown y Zador, 1990).

### 1.6.1. Aferencias hipocámpicas

El hipocampo tiene conexiones con fibras provenientes del tallo cerebral, en esta se incluyen proyecciones noradrenérgicas del locus coeruleus y serotoninérgicas del núcleo del raquí; también existe una entrada dopaminérgica originada en el área tegmental ventral. Otra es la proyección hipotalámica de un grupo de células cercanas a los cuerpos mamilares, pasando por la fimbria terminando en la capa molecular del giro dentado y la región de CA2 y CA3. El núcleo talámico anterior proyecta a áreas cercanas al subículo (Kandel y Schwartz, 1985; Brown y Zador, 1990).

El núcleo medial talámico inerva fibras en la corteza entorrinal, el subículo y la región de CA1. Fibras corticales de asociación llegan al giro dentado, el cual está conformado no sólo por células granulares, algunas de ellas son interneuronas, las cuales tienen proyecciones inhibitorias, otras están localizadas en la capa polimórfica.

Dentro de las vías aferentes de la corteza a CA1 existen dos rutas. La primera en forma directa, la cual consiste en proyecciones del área parahipocámpal a otras partes de la zona dendrítica de CA1 y la vía no directa, la cual consta de un proceso secuencial hipocámpal, pasando por giro dentado, CA3 y finalmente CA1 (Cohen y Eichembaum., 1993). Ver Fig. 5.

### 1.6.2. Eferencias hipocámpicas

Proyección con estructuras subcorticales.

La mayor salida de fibras del hipocampo está dada a través de la fimbria, la cual está compuesta por los axones de las células piramidales y células del subículo, éstos cruzan la línea media del cerebro. Las fibras precomisurales del fornix cruzan rostralmente la comisura anterior e inervan al núcleo lateral del complejo septal. Otra salida de fibras está dada por el subículo y en las capas profundas de la corteza entorrinal. Esta eferencia hipocámpal forma parte del sistema de fibras periventriculares, las cuales corren a lo largo de la materia gris del tercer al cuarto ventrículo. Estas fibras tanto ascendentes como descendentes conectan con estructuras de la línea media del tálamo, cerebromedio y puente (Bayer, 1985; Brown y Zador, 1990).

## CONEXIONES HIPOCAMPALES

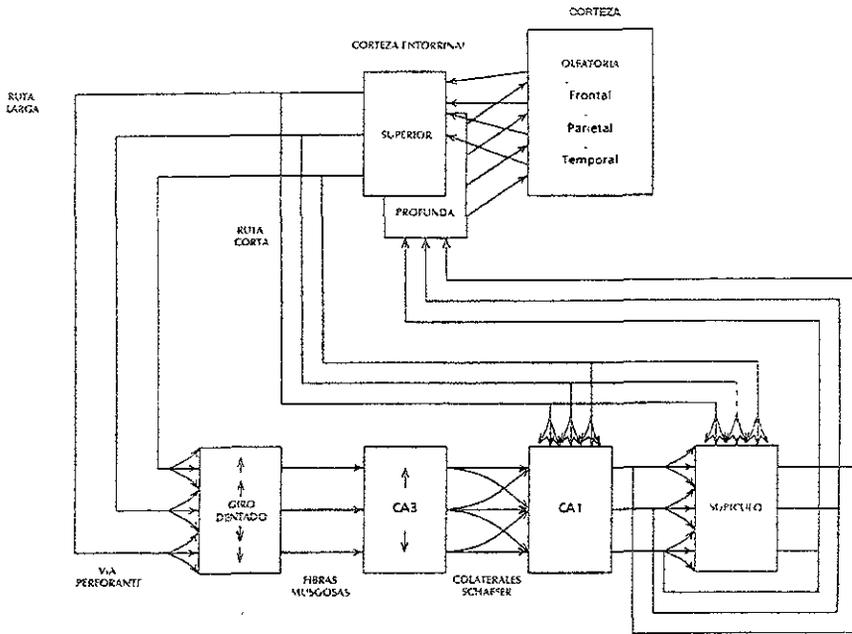


Fig.6. Diagrama esquemático de las conexiones bi-direccionales de la información entre las áreas corticales de asociación y los componentes del sistema hipocampal aunado a las conexiones hipocampales con áreas subcorticales. Nótese la interacción del área CA1 con diversas estructuras. El circuito que conforma el hipocampo permite una reverberación de la información. Tomado de Cohen y Eichenbaum, 1993.

### 1.6.3. Tipos celulares en el hipocampo

Las neuronas intrínsecas están conformadas por neuronas piramidales y principalmente por células en cesta e interneuronas, las cuales se localizan en los bordes de los estratos oriens y alveus en la región CA1, y en el lacunoso-molecular en la misma región. El hilus es una compleja circuitería local conformada por distintos tipos de interneuronas incluyendo cinco tipos de células en cesta distinguibles morfológicamente. Las células más abundantes del hilus son las células musgosas. Sus dendritas proximales hacen sinapsis con las espinas de los axones de las células granulares (Chan-Palay y cols., 1989).

#### 1.6.3.1. Neurotransmisión extrínseca.

En el hipocampo está presente una neurotransmisión de origen extrínseco. Por ejemplo, la que incluye a las fibras serotoninérgicas las cuales provienen de núcleos del rafé, proyecciones noradrenérgicas del locus coeruleus, y la inervación colinérgica del núcleo septal. Estas entradas producen generalmente respuestas postsinápticas lentas y por lo tanto pueden llevar sólo información de baja frecuencia. La información de entrada es modulada o regulada por un flujo global de la actividad o el control de varios tipos de plasticidad neural (Chan-Palay y cols., 1989).

#### 1.6.4. Conexiones sinápticas en el hipocampo

Las conexiones sinápticas en el hipocampo son generalmente axodendríticas y axosomáticas, aunque en menor proporción también axoaxónicas (Brown y Zador, 1990).

#### 1.6.5. Sinapsis de las colaterales de Schaffer

Los axones de las colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de la región CA3 están parcialmente mielinizadas. Uno a tres axones desmielinizados emergen de cada nodo y se desvían para alinearse paralelos a las fibras de origen, las cuales hacen contacto con espinas dendríticas (Brown y Zador, 1990).

Las sinapsis de las colaterales de Schaffer se caracterizan por su membrana asimétrica gruesa y vesículas redondas. Las sinapsis de las colaterales de Schaffer son generalmente sobre espinas dendríticas. Una característica de ellas es el giro "spinule" en donde éstas sobresalen en la terminal presináptica (Brown y Zador, 1990).

#### 1.6.6. Interacción local del área CA1

Existen dos tipos morfológicos de interneuronas inhibitorias en la región de CA1. Unas de las más estudiadas son las células en cesta, las cuales están localizadas en el estrato piramidal y borde del estrato oriens de CA1. Las células en cesta hacen contactos inhibitorios con las células piramidales de CA1, las cuales reciben una entrada excitatoria de las células piramidales. Las células en cesta también reciben una entrada excitatoria directa de aferentes del estrato radiado y oriens (Brown, 1990; Chan-Palay y cols., 1989). Otro tipo de

interneuronas están localizadas en el estrato oriens y en el alveus, las cuales reciben eferencia de las células piramidales colaterales y aferentes extrínsecas (Brown y Zador, 1990).

#### 1.6.7. Neurotransmisión

Un gran número de neurotransmisores y neuromoduladores han sido estudiados en el hipocampo. El GABA es el mayor neurotransmisor inhibitorio y la norepinefrina y la acetilcolina neurotransmisores excitatorios distribuidos en todo el hipocampo; sin embargo, el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante en esta estructura; además otros neuromoduladores son coliberados incluyendo algunos opioides, serotonina y el péptido intestinal vasoactivo VIP (Bayer, 1985).

##### 1.6.7.1. El receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo

En estudios histoquímicos se ha observado la distribución heterogénea de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo, en donde las neuronas piramidales son distintas funcionalmente, debido a que expresan diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, es probable que este receptor se adapte a los requerimientos funcionales específicos del área. En la formación hipocampal se observa una expresión mayor de las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2-3$ , y  $\gamma 2$ . Específicamente la distribución de las subunidades del receptor en el estrato piramidal CA1 se encuentran  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2-3$  y  $\gamma 2$ , en tanto que en el estrato oriens y radiado en la misma área, las subunidades con mayor expresión son  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2-3$  y  $\gamma 2$ , mientras que en el estrato lacunoso molecular se cuantifican con mayor frecuencia  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2-3$ ,  $\gamma 2$  (Fritschy y Mohler, 1995); esto indica que los receptores muestran una susceptibilidad diferencial dentro del mismo hipocampo al propio GABA y a los fármacos que modulan su actividad como las benzodiazepinas por ejemplo.

##### 1.6.8. Hipocampo y epilepsia

La interacción eléctrica del hipocampo fortalece la sincronización de la actividad eléctrica. El arreglo anatómico de las neuronas dentro de las capas proveen y subministran las condiciones de un sustrato ideal para la acción del campo eléctrico sobre los cambios en los potenciales de membrana (Brown y Zador, 1990).

Calvalheiro y colaboradores en 1982 realizaron un experimento utilizando ácido kaínico en hipocampo, observaron una excitación neuronal y un desarrollo de rebrote de fibras musgosas y paroxismos crónicos. En 1991, Sutula indujo epilepsia en el hipocampo por medio de Kindling, encontrando una reorganización en las fibras musgosas, lo que es ocasionado por un circuito local de retroalimentación excitatoria, esto produce hiperexcitabilidad y crisis crónicas.

Kapur y Coulter, en 1995, estudiaron al GABA en la región piramidal de CA1 en hipocampo, en estatus epiléptico inducido por pilocarpina, y observaron una reducción en la corriente, lo cual se debe probablemente a una disminución en la eficacia de GABA en la activación del canal de cloro.

Wasterlain y cols., en 1996, estudiaron los posibles mecanismos de la epilepsia crónica restringida al hipocampo, induciendo la epilepsia por el método de Kindling, estimulando en la vía perforante, observaron una disminución en la inhibición por medio de registros intracelulares en células hipocámpales y observaron que un daño circunscrito al hipocampo es suficiente para causar paroxismos recurrentes crónicos.

#### 1.7. El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

El síndrome de abstinencia al GABA, SAG, es un modelo de epilepsia focal el cual se caracteriza por una hiperexcitabilidad neuronal, producida a partir del cese de la infusión intracortical de GABA.

Los primeros experimentos en los que se identificó este modelo se realizaron en monos *Papio papio* fotosensibles (Brailowsky y cols., 1987), estos mandriles presentan una hiperexcitabilidad genética inducida por estimulación con flashes luminosos de 25 Hz, esto permite la aparición de una epilepsia generalizada, identificada en registros de la actividad eléctrica cerebral, en donde dependiendo del grado de fotosensibilidad, los animales muestran conductualmente desde mioclonias de los párpados hasta crisis tónico-clónicas generalizadas. Los sitios neuronales generadores de la descarga anormal se encuentran bilateralmente en las regiones fronto-rolándicas (Silva-Barrat y cols., 1989). Los estudios farmacológicos realizados por Brailowsky y colaboradores en 1990b, evidencian que los fármacos que interfieren con la transmisión GABAérgica facilitan la fotosensibilidad, en tanto que los que la ayudan tienen efectos anticonvulsivos.

En la investigación sobre el papel del GABA en este modelo de epilepsia genética, se realizaron experimentos en donde se administró GABA, por medio de infusiones corticales locales en cuatro áreas cerebrales: corteza occipital, corteza motora, área premotora y corteza prefrontal. Las infusiones realizadas en la corteza occipital y en la motora tuvieron un efecto de bloqueo total de la epilepsia fotosensible, mientras que las infusiones en el área premotora tuvieron efectos anticonvulsivos parciales, y las infusiones en el área prefrontal no mostraron ningún efecto antiepiléptico, es decir, la corteza occipital tiene un papel permisivo y la corteza motora, ejecutivo en este síndrome epiléptico. En forma interesante en estos animales se encontraron focos de actividad paroxística en forma de espiga-onda y poliespigas horas después de haber suspendido la infusión del GABA, las cuales se correlacionaban con mioclonos de las porciones distales del miembro inferior, la duración de estos focos fueron de tres a cinco días, reapareciendo la fotosensibilidad entre dos a cuatro días posteriores al cese de la administración del GABA, permitiendo la coexistencia de la epilepsia generalizada (fotosensibilidad) y la focal. A este modelo de actividad epiléptica focal generada por la interrupción de la infusión del aminoácido se le denominó Síndrome de abstinencia al GABA (SAG) (Brailowsky y cols., 1987, 1988, 1990a; Fukuda y cols., 1987; Silva-Barrat y cols., 1989, 1992; Menini y cols., 1991).

#### 1.7.1. SAG en la rata

Se disminuyó la intensidad de las crisis motoras en ratas epilépticas que presentaban crisis generalizadas con pérdida del equilibrio mediante la infusión de GABA en el área somatomotora, sin embargo, posterior a la instilación del aminoácido se presentó un SAG, bilateral, de ambas cortezas somatomotoras (Fukuda y cols., 1987).

En otros experimentos en la rata no epiléptica, con infusión unilateral en la corteza y en el sistema límbico, se encontró que en las estructuras límbicas el SAG no persiste por más de 12 horas (Le Gal La Salle y cols., 1988).

#### Relación entre tiempo de infusión del GABA y el SAG

Para estudiar la relación entre tiempo de infusión del GABA y la latencia y la duración del fenómeno paroxístico, se realizaron infusiones que iban desde 3 horas a dos semanas, usando una dosis de GABA de 100 µg/µl/hora o de salina

(1  $\mu\text{l/hora}$ ). Se observó que para aquellas infusiones que duraban entre 6 y 24 horas, la latencia de aparición del SAG fue de entre 50 y 60 minutos en promedio, mientras que la duración de las espigas epilépticas fue de entre 90 y 170 horas. En animales en los que se infundió el GABA a la misma dosis durante 3 horas no se observó ningún SAG. En grupos de ratas en los que se administró el GABA durante 3,5,7 y 14 días, la latencia de inicio de la actividad epiléptica fue de entre 10 a 25 minutos, mientras que la duración del SAG fue de entre 10 y 40 horas. Así, aparece una relación inversa entre el tiempo de infusión del GABA y la latencia y la duración del SAG: a tiempos de infusión más cortos corresponde un SAG de latencia y duración largas (Brailowsky 1991). Posteriormente se realizaron infusiones de 1  $\mu\text{l/h}$  en un tiempo de 120 minutos, obteniendo una latencia de 80 minutos en promedio y una duración de 7 días, con una dosis de GABA de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Calixto y cols; 1995). Al encontrar un SAG cortical con esta concentración del aminoácido, se propuso investigar si a concentraciones más bajas del aminoácido también se podía reproducir el modelo epiléptico, infundiendo 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l/hr}$  en la neocorteza, encontrando un SAG con duración de tres días aproximadamente y una latencia de 35 minutos.

#### 1.7.2. Patrones electroencefalográficos del SAG

Durante la evolución del SAG se evidenciaron cambios en la morfología de los registros electroencefalográficos los cuales se caracterizaron en tres tipos de patrones: el patrón I conformado por espigas ondas de alta amplitud, 200 a 700  $\mu\text{V}$ , monofásicas, seguidas por una deflexión negativa pequeña y una frecuencia de 0.5 a 3 Hz, estas espigas marcan el inicio del SAG y se generan en la zona de infusión, este patrón se presenta unilateralmente, aunque en algunas ocasiones se pueden propagar al área cortical contralateral homóloga. El patrón II está constituido por espigas ondas seguidas de poliespigas de alta frecuencia de 8-10 Hz, la actividad paroxística en la mayoría de los casos es bilateral con una dominancia en el lado infundido, este patrón es evidente durante las primeras 3-4 horas del fenómeno paroxístico; estos dos patrones son acompañados de cambios en la actividad conductual de la rata, es decir, se distinguen mioclonías de la pata posterior contralateral a la infusión de la corteza cerebral. El patrón III se caracteriza por espigas que se propagan a las áreas contralaterales homólogas en forma de crisis de varios segundos de duración, acompañados de inmovilidad del animal y algunas veces con las llamadas sacudidas de perro mojado. Al final del

SAG, a 7 días postinfusión del GABA, la actividad paroxística desaparece en la vigilia y en el sueño de movimientos oculares rápidos, y reaparece en el sueño de ondas lentas (Brailowsky y cols., 1990a). Ver figura 7.

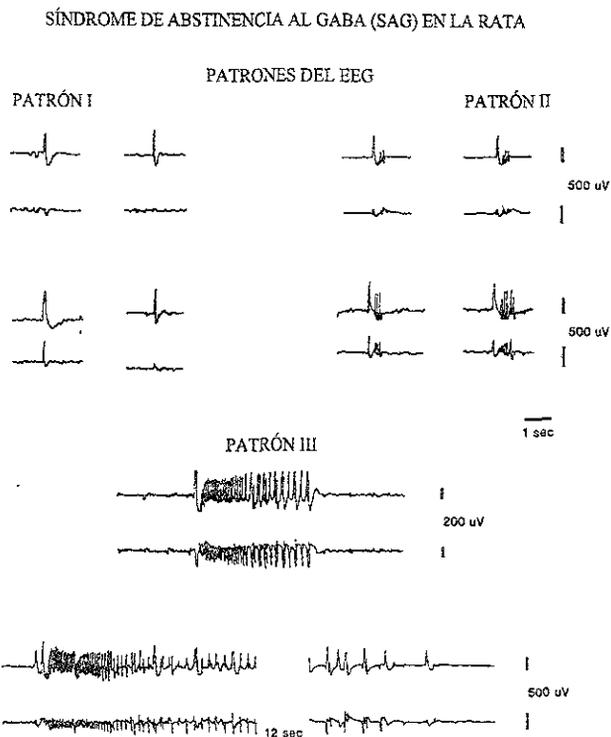


Fig. 7. Patrones electroencefalográficos característicos del Síndrome de Abstinencia al GABA en la rata. En todos los casos los trazos superiores corresponden a la Corteza frontal izquierda, y los registros inferiores a la Corteza frontal derecha. La infusión de GABA fue en el hemisferio izquierdo (Tomado de Brailowsky y cols, 1990a).

### Fenomenología del SAG

La fenomenología del SAG cortical puede ser dividido en tres estados: 1) En el inicio aparecen descargas rítmicas epilépticas localizadas en el sitio de infusión, estas se presentan minutos después de la interrupción de la infusión, 2) Propagación, aparece después de 30 minutos de la aparición de espigas-onda, se presentan manifestaciones clínicas como miclonos y complicaciones en los patrones del EEG, se observan

poliespigas-ondas, las cuales pueden presentar una expresión bilateral, pero siempre predominan en el sitio de infusión, este periodo no excede las 4 horas después de iniciado; 3) Periodo de recuperación, este periodo se caracteriza por la desaparición de síntomas clínicos y de poliespigas-ondas, durante este periodo las espigas paroxismales son estrictamente localizadas en el sitio de infusión, hay un decremento en la amplitud y frecuencia de las espigas. Este estado tarda de 24 horas a 10 días en recuperar la sincronía y simetría normal del EEG (Brailowsky y cols. 1990a).

### 1.7.3. Cambios histológicos

Tras el análisis histológico del sitio de infusión de GABA en la corteza cerebral se ha encontrado que presentan los tejidos cambios locales, así como en las áreas de proyección de las zonas corticales infundidas. El dato mas común es la despoblación neurono-glial en el área circundante a la cánula de infusión y una reacción glial (gliosis reactiva) en las regiones más adyacentes. Se ha identificado gliosis a nivel talámico (núcleos del grupo ventromedial), las cuales son áreas de proyección de la corteza motora. Se sabe que en esta zona de proyección existen terminales cortico talámicas las cuales son de tipo glutamatérgicos y probablemente su estado de excitación continua se deba a los cambios glióticos por neurotoxicidad (Brailowsky, 1991).

### 1.7.4. Cambios metabólicos

En el estudio de los cambios metabólicos bajo la técnica de 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva, es posible cuantificar el consumo local de glucosa visualizándola mediante autoradiografía, ya que la 2-DG se acumula en el sitio de su utilización. De esta manera se puede observar un incremento en las áreas cerebrales más activas. Esta técnica se utilizó con el modelo de Abstinencia al GABA, encontrándose en el área cortical involucrada con la generación de actividad paroxística, un aumento de tres a cinco veces del metabolismo local de glucosa en relación al control. También se apreció un incremento en el consumo de 2-DG en la zona talámica ipsilateral de proyección de la corteza infundida, específicamente en los núcleos posterior, ventro-postero-lateral, central-lateral, ventrolateral y reticular (Menini y cols., 1991).

### 1.7.5. Cambios microfisiológicos

Estudios electrofisiológicos realizados *in vitro*, en rebanadas de corteza de ratas a las cuales se les indujo el SAG, se observaron diferentes tipos de neuronas: 1) aquellas que mostraron capacidades intrínsecas para generar deflexiones despolarizantes paroxísticas (PDS) inducidas sinápticamente y las provocadas por inyecciones intracelulares de corriente; 2) las células capaces de generar PDS y trenes de potenciales de acción sólo cuando se estimularon sinápticamente y 3) las células que no presentaron actividad paroxística bajo ninguna de estas dos estimulaciones (Silva-Barrat y cols., 1989; Silva-Barrat y cols., 1992). Se encontró que en el primer tipo de células, hay una disminución en la sensibilidad al GABA y a la isoguvacina, (agonista del receptor GABA<sub>A</sub>). Ésta puede suceder por una desensibilización del receptor debido a una disminución en el número de receptores o cambios en su afinidad por el GABA; aunque también es probable que la tolerancia a los efectos del GABA se relacionen con un aumento en la concentración extracelular de calcio, lo cual podría provocar la alteración en la fosforilación del propio receptor GABA<sub>A</sub>, es decir, el SAG comparte muchas características electrofisiológicas e histológicas de otros modelos de epilepsia (Silva-Barrat y cols., 1989; Silva-Barrat y cols., 1992).

### 1.7.6. EL SAG *in vitro*

Después de la aplicación continua del aminoácido en rebanadas de hipocampo y neocorteza se presenta un incremento en la actividad sincrónica de las células piramidales, que propicia una potenciación en la amplitud de la espiga poblacional (García-Ugalde y cols., 1992; Montiel T. y cols, 2000), la cual tiene como característica principal el incremento en su amplitud, así como una pérdida de la inhibición recurrente, característica de esta estructura, esto se cuantifica por el protocolo de pulsos pareados, es decir, *in vitro* es posible identificar hiperexcitabilidad post-GABA.

### 1.7.7. Farmacología del SAG

En experimentos farmacológicos, la administración sistémica de anticonvulsivos tales como fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepina y diazepam produce respuestas variadas, las cuales dependen de la fase del SAG en la que se administra el fármaco, por ejemplo, éstos no tienen

ningún efecto durante el SAG en sus fases iniciales; no obstante que durante el segundo día, la administración de fármacos antagonistas del receptor NMDA, la ketamina, el amino-fosfonoheptanoato (APH) y el MK-801, o las benzodiazepinas, se observan efectos anticonvulsivos. La administración de la hidroxietil-propionamida o HEPP es capaz de aminorar la frecuencia de descarga del foco epiléptico si esta es administrada una hora después del inicio de la actividad paroxística; sin embargo, aplicarla tres días después no produce ningún cambio. En conclusión, la actividad paroxística del SAG puede ser inhibida solamente reanudando la infusión del GABA (Brailowsky y cols., 1990b).

## II. JUSTIFICACIÓN

La susceptibilidad al GABA en estructuras del SNC y los fármacos que modulan la actividad del receptor GABAérgico (incluyendo al etanol, las benzodiazepinas y los barbitúricos) pueden utilizarse para conocer los mecanismos básicos de la génesis de la epilepsia, sus tratamientos en alteraciones neurológicas y abstinencias a sustancias adictivas, así como la aparición de periodos convulsivos posteriores al cese abrupto de un tratamiento largo de antiepilépticos. Por lo antes mencionado, el SAG representa un modelo de hiperexcitabilidad neuronal, un bioensayo para avanzar en el conocimiento de este tipo de fenómenos.

Se ha descrito el SAG en la corteza cerebral, no así *in vivo* en el hipocampo, en este contexto es de gran interés estudiar la sensibilidad de esta estructura en organismos completos para el desarrollo de epilepsia parcial, a partir de cambios en la neurotransmisión GABAérgica.

## III. OBJETIVOS

1. Estudiar la relación entre el tiempo de infusión de GABA y la latencia de aparición y duración de la actividad epiléptica en hipocampo área CA1.
2. Determinar las diferencias electrofisiológicas del SAG en hipocampo con respecto al SAG en la corteza cerebral.
3. Analizar los cambios histológicos utilizando la tinción de Nissl e inmunohistoquímica para GFAP (Proteína Acídica Fibrilar Glial) en el hipocampo y corteza cerebral, posterior a la excitabilidad.

#### IV. MÉTODO

Se utilizaron 27 ratas macho de la cepa Wistar, (250-300 g.), fueron colocadas individualmente en cajas de acrílico, con libre acceso a agua y comida, mantenidas en un ciclo luz oscuridad 12:12 horas.

##### Implantación de cánulas.

Mediante anestesia general con halotano al 1.5% en carbógeno, se implantaron bilateralmente cánulas monopolares de acero inoxidable de 12 mm de longitud y 0.6 mm de diámetro. Para implantar en hipocampo área CA1, se siguieron las coordenadas estereotáxicas A.P.-3.3 mm, Lateral -2.0 mm, Ventral -2.5 mm, tomando como referencia Bregma y para corteza motora anteroposterior 2.0 mm, lateral 2.0 mm y ventral 1.5 mm (coordenadas de acuerdo a Paxinos y Watson, 1986). Estas cánulas también se utilizaron como electrodos de registro de la actividad eléctrica en la región de implantación. Se implantaron electrodos de registro epidurales, dos se colocaron a una distancia de 3 a 4 mm posteriores a las cánulas y uno en la parte frontal del lado izquierdo a la misma distancia. Los electrodos y las cánulas se soldaron a un conector para el registro EEG, este complejo se fijó al cráneo con cemento acrílico. Después de un periodo de recuperación post-quirúrgica de 7 días, se realizó un registro EEG control de 30 minutos.

##### Infusión

Después del registro EEG control, se realizaron las infusiones unilaterales del GABA (10 µg/µl), tanto para los sujetos con implante de cánula guía en hipocampo como para los individuos con cánula en corteza motora, por medio de una microbomba peristáltica (Harvard) con velocidad de infusión de 3µl/hr durante 120 minutos. A la mitad de los sujetos se les infundió en el hemisferio izquierdo y a los restantes en el hemisferio opuesto.

A las ratas control se les infundió únicamente solución salina como vehículo (NaCl al 0.9%). Las soluciones de instilación contenían azul directo 15 (colorante sin actividad biológica), para determinar el sitio anatómico de la instilación. Los animales que no presentaban la marca de dicho colorante no se incluyeron en el estudio.

## Registro Electroencefalográfico.

Antes y después a la infusión se realizaron registros EEG obtenidos en un polígrafo Grass (modelo 79E) con filtros de 1-300 Hz, amplificadores de baja frecuencia de 0.1  $\mu$ V/mm y alta frecuencia de 0.3  $\mu$ Hz a una sensibilidad de 50 mV/mm, con una velocidad del papel de registro de 5 mm/seg.

Al término de la infusión unilateral de GABA en cada sujeto, el tiempo de registro para cada animal en promedio fue de 300 minutos. Posteriormente, se llevaron a cabo registros diarios con una duración de treinta minutos cada uno, hasta comprobar la desaparición electroencefalográfica de la actividad paroxística.

## Histología

Nueve días después de la desaparición de la actividad epiléptica, que es el tiempo en el que estudios previos identificaron la mayor expresión de GFAP (Hsu y cols. 1981; Calixto y cols. 1995), los animales fueron sacrificados con dosis única de pentobarbital (3.3 ml/kg i.p.), se perfundieron (vía intracardiaca con una bomba peristáltica), inicialmente con 250 ml. de solución salina y posteriormente, 250 ml. de solución fijadora (paraformaldehído al 4%, en buffer fosfato 0.2 M, pH 7.4). Se extrajeron cuidadosamente los cerebros y se mantuvieron por un periodo de 24 horas en el fijador. Después se suspendieron en una solución crioprotectora de sacarosa (buffer fosfatos de sodio (PBS) 0.1 M, pH 7.2 a 4°C) en dos concentraciones, la primera al 20% durante 24 horas y la segunda al 30% por 48 horas.

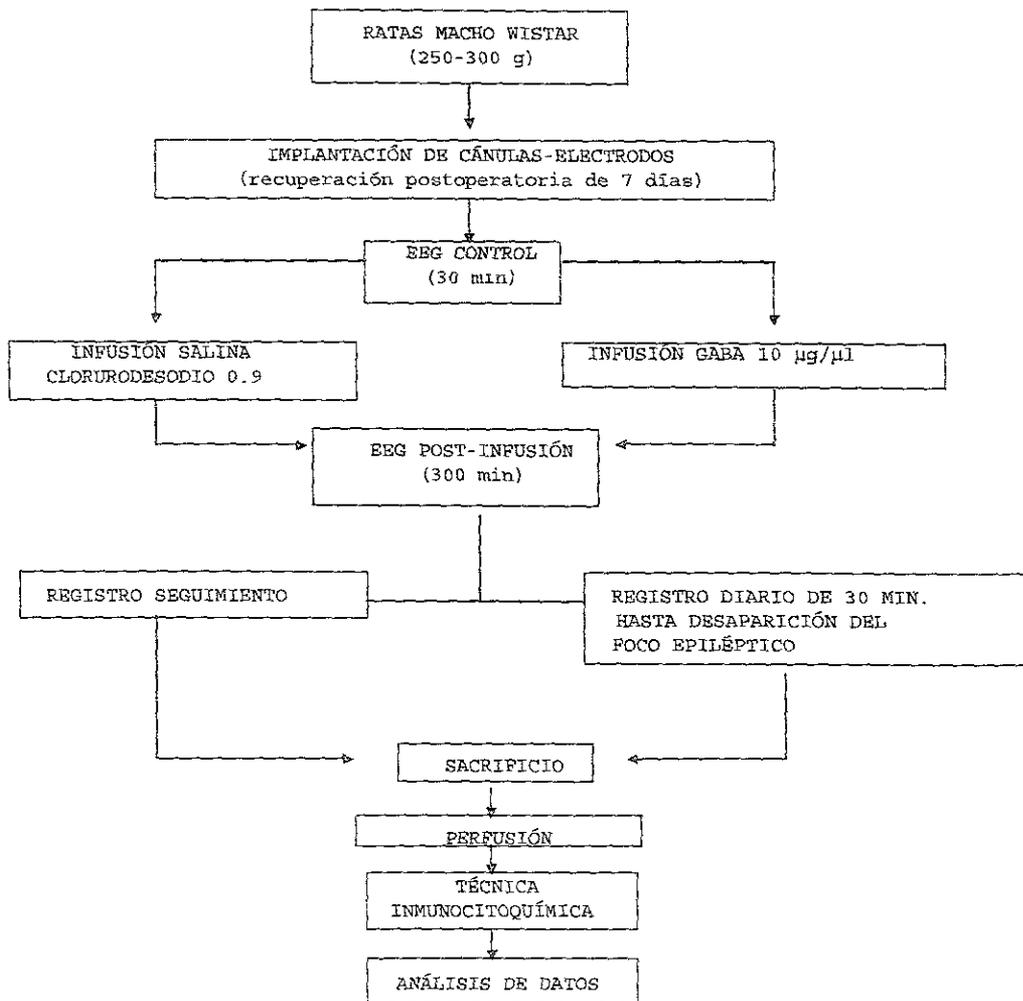
Los cerebros se cortaron por congelación en un crióstato Jung Frigocut 2800E, con un grosor de 30  $\mu$ m en plano coronal.

Los cortes fueron colectados en tres series, una de ellas se procesó con tinción de Nissl que sirve para observar cuerpos neuronales y la delimitación del área de la cánula y la otra para inmunohistoquímica de GFAP, con la cual se observan astrocitos reactivos presentes ante el daño neuronal y GFAP/HE (Proteína Fibrilar Glial y Hematoxilina), lo cual nos permitió observar glia reactiva y cuerpos neuronales.

## Análisis de resultados

Los resultados permitieron formar dos grupos de animales con SAG, producido por la suspensión de la infusión del GABA en dos estructuras diferentes: la corteza motora y el hipocampo dorsal. Con la prueba U de Mann-Whitney se analizaron los resultados de las dos estructuras, en su latencia y duración del SAG para comparar el grado de similitud entre estos.

### DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## V. Resultados

### Incidencia del SAG

Las ratas que fueron infundidas con GABA en el área CA1 (n=11) y en la corteza motora (n=11) presentaron descargas paroxísticas posteriores a la interrupción de la infusión del aminoácido. Mientras que en los animales tratados con vehículo, no se observaron cambios en el registro electroencefalográfico, n=5.

### Registros electroencefalográficos (EEG) del SAG.

La latencia en el SAG es el tiempo posterior a la infusión del aminoácido y el inicio de la actividad paroxística en donde no se observan cambios en la actividad electroencefalográfica comparada con la actividad control.

En el hipocampo, la primer descarga epiléptica presentó una latencia de  $57.09 \pm 10.22$  minutos, la espiga que indica la latencia presentó patrón EEG tipo I del SAG (ver figura 8). Durante los primeros 80 minutos de evolución del foco epiléptico se identificó un incremento en la frecuencia de estas espigas y clínicamente crisis límbicas caracterizadas por actividad eléctrica sincrónica e hipersincrónica en estructuras del sistema límbico; posteriormente, los animales tuvieron una disminución en la frecuencia de patrón I y crisis límbicas con mayor frecuencia y duración (85 seg) ver figura 9. Es decir, con descargas bilaterales con actividad asimétrica y asincrónica. En los registros secuenciales que se realizaron hasta la desaparición del fenómeno, el patrón tipo I fue constante y con ligeros incrementos en frecuencia en sueño de ondas lentas (S.O.L.).

### Patrones electroencefalográficos

Los patrones electroencefalográficos del SAG encontrados en el hipocampo dorsal de la rata fueron:

Patrón I del SAG, se presenta en toda la evolución del SAG, desde la latencia, posteriormente disminuye dramáticamente 85 minutos posteriores al comienzo de la actividad paroxística hasta 205 minutos después de la misma, predominando ulteriormente.

Patrón II del SAG, no se presenta.

Patrón III del SAG, la propagación se presenta de los 5 minutos a los 205 minutos posteriores a la primer descarga epiléptica y en un caso hasta 28 horas después, ver figura 9.

La duración del SAG fue de  $14.27 \pm 2.53$  días. La evolución del SAG hipocámpico en diferentes individuos se observa contrastando los registros de cada uno en las figuras 10.a, 10.b y 10.c en donde la latencia y duración entre sujetos es diferente, pero en todos ellos podemos observar la aparición de espigas patrón I características del SAG y su propagación hacia el área homóloga contralateral.

En la corteza motora, la primer descarga epiléptica presentó una latencia de  $35.20 \pm 5.02$  min., con una duración de  $3.30 \pm 0.57$  días, donde sólo se presentó el patrón de descarga tipo I. Ver figura 11.

La prueba U de Mann-Whitney se aplicó a los parámetros de latencia y duración del SAG en hipocampo con respecto a los datos obtenidos en corteza motora, bajo las mismas condiciones. Existen diferencias significativas en cuanto a la duración del SAG en ambas estructuras, en hipocampo se observó una mayor duración que la que se presenta en la corteza motora ( $P \leq 0.0006$ ); la latencia del SAG en ambas estructuras sí presenta diferencias significativas, teniendo una latencia mayor en hipocampo ( $P \leq 0.0002$ ).

#### Análisis Histológico.

##### Tinción de Nissl

Se realizó un análisis histológico con tinción de Nissl de los cerebros de los animales que fueron infundidos con solución salina y GABA (controles y experimentales respectivamente), observándose las lesiones causadas por el implante de las cánulas de infusión en ambos grupos de animales, no obstante, en los sujetos experimentales se observó además pérdida neuronal en el área circunscrita al sitio de infusión. Ver figs. 12, 13 y 14.

## SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA

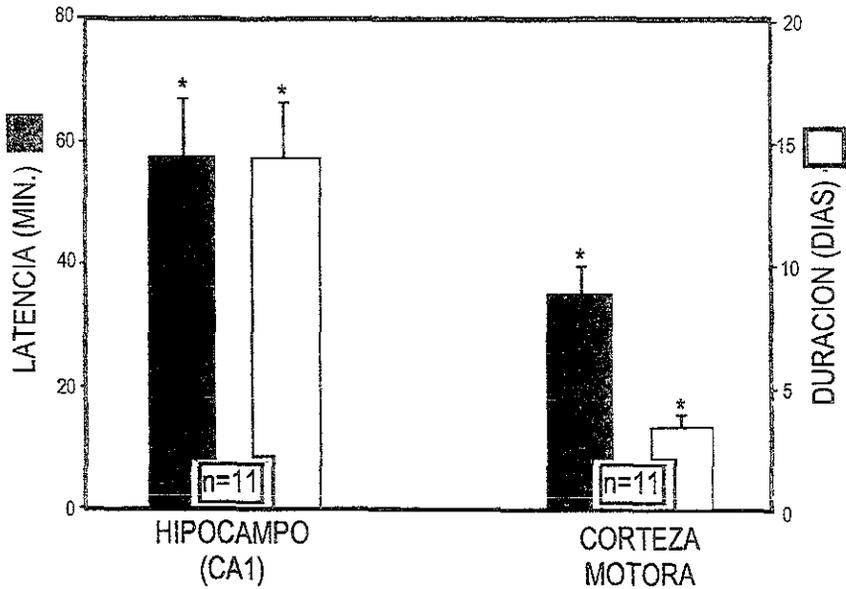


Fig. 8. Comparación entre el SAG del hipocampo y de la corteza cerebral. Las barras oscuras representan la latencia (min.). En el hipocampo la primer espiga epiléptica apareció a los  $57.09 \pm 10.22$  (E.S), (latencia), lo cual es estadísticamente significativo ya que en la corteza cerebral la latencia fue de  $35.20 \pm 5.02$  (E.S), (\* $P \leq 0.0002$ , prueba U-Mann-Whitney). En barras claras se muestra la duración (días) del SAG. En el hipocampo la duración promedio fue de  $14.27 \pm 2.53$ , en tanto que en la corteza fue de  $3.30 \pm 0.57$ . (\* $P \leq 0.0006$ , Prueba U-Mann-Whitney).

## Síndrome de Abstinencia al GABA en Hipocampo

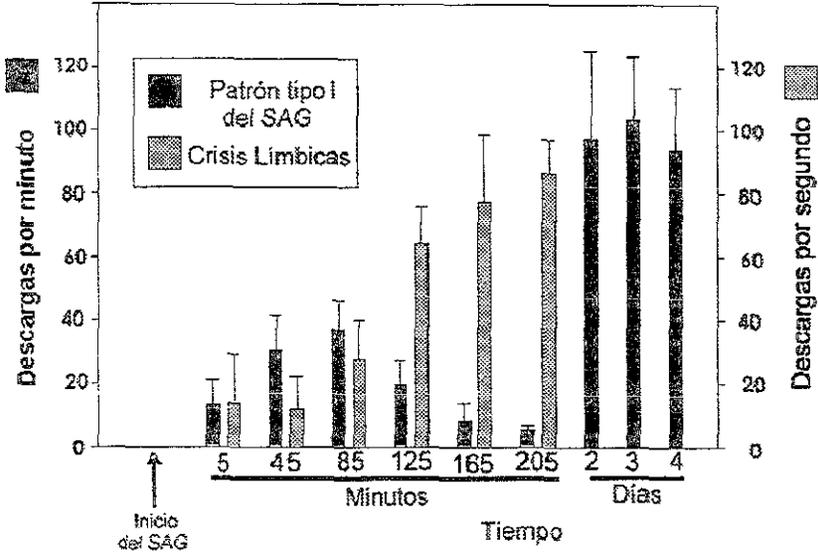


Fig. 9. Evolución temporal de los patrones de diferente excitabilidad observados durante el SAG. Se grafica la duración de descargas por minuto del patrón I (pl) y crisis límbicas (cl). Nótese la desaparición de las crisis límbicas a partir del segundo día de evolución de la epilepsia y la presencia del patrón I que gradualmente disminuye en el primer día y predomina a partir del segundo día.

## SAG EN HIPOCAMPO

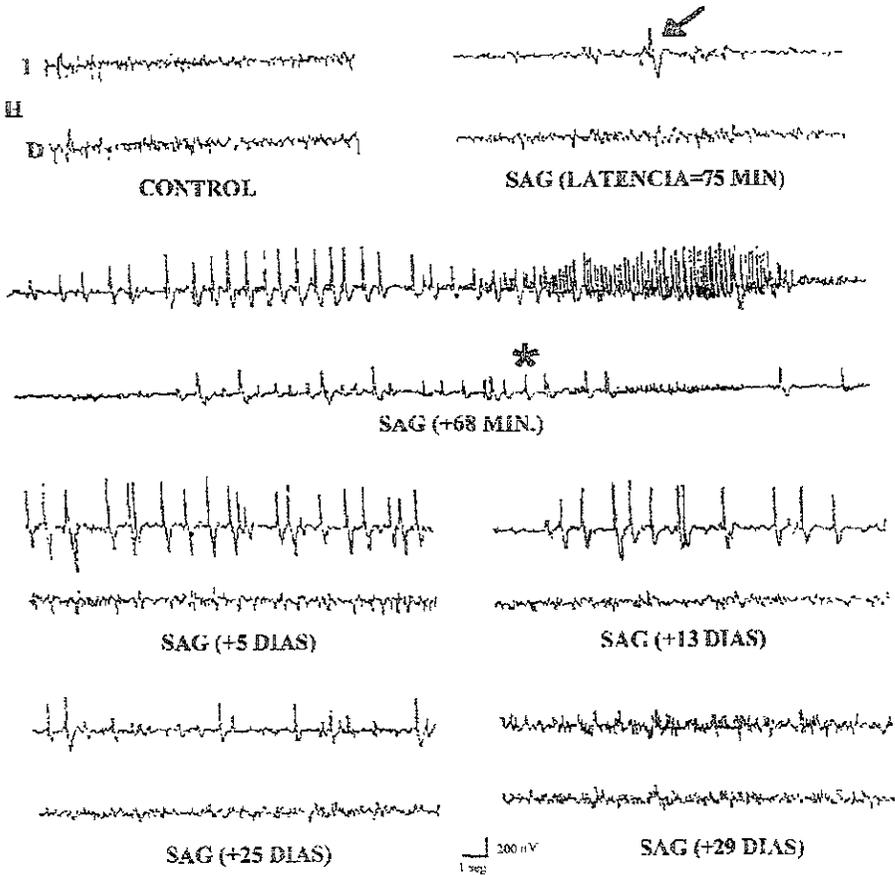


Fig. 10. a). Ejemplo de la evolución temporal del SAG en el hipocampo de rata. Se observa el registro electroencefalográfico en condiciones control, la actividad basal es simétrica, de amplitud pequeña. El inicio del SAG se observa por una espiga en el hipocampo que fue infundido, Hipocampo Izquierdo, H.I., marcado con una flecha; la latencia fue en este caso de 75 minutos; se aprecia una propagación de descarga epiléptica al hemisferio contralateral del sitio de infusión, H.D., marcado con un asterisco. La evolución del SAG se observa por la desaparición de los trenes de alta frecuencia y de gran amplitud. Nótese, que la actividad retorna a la observada en la actividad control después de 29 días.

## SAG EN HIPOCAMPO

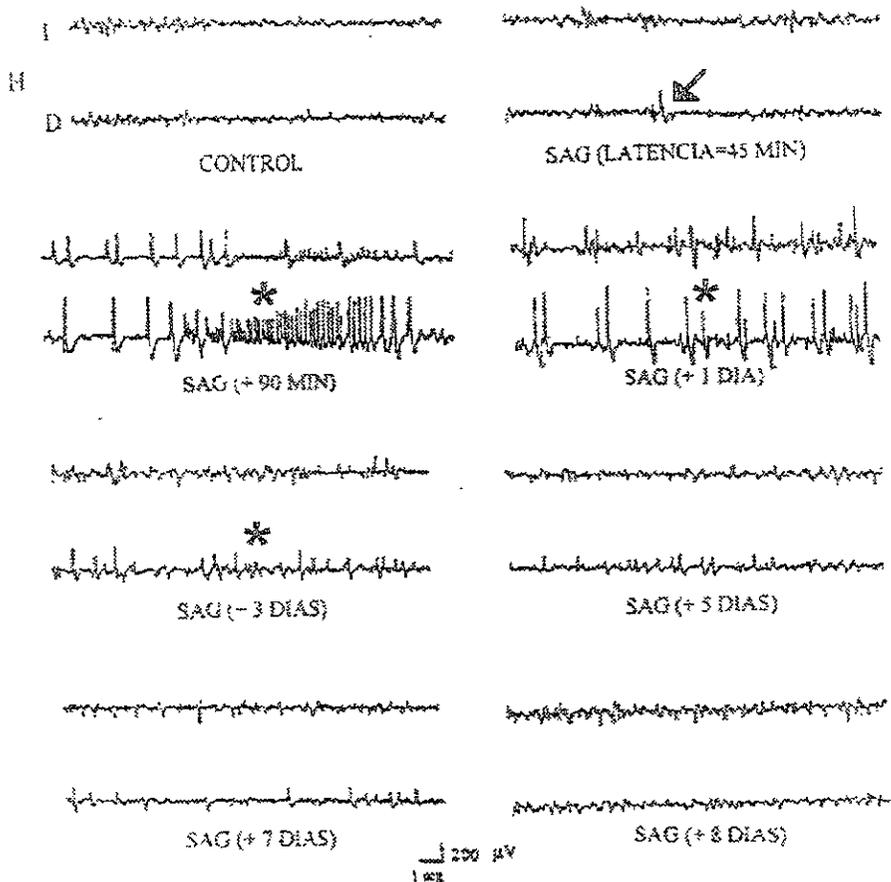


Fig. 10. b) Ejemplo de la evolución temporal del SAG en el hipocampo de rata. Este es un registro electroencefalográfico que muestra en condiciones control la actividad basal simétrica de amplitud pequeña. El inicio de SAG se observa por una espiga en el hipocampo que fue infundido en Hipocampo Derecho, H.D., en este caso con una latencia de 45 minutos, marcado con una flecha. 90 minutos después se observa propagación de la descarga epiléptica al hemisferio contralateral del sitio de infusión (H.I.) efecto que se observa hasta tres días después de haber iniciado la epilepsia, marcado con asteriscos. Durante la evolución del SAG se observa por una desaparición gradual de los trenes de alta frecuencia y de gran amplitud. Nótese que la actividad EEG retorna a la cuantificada en el registro control después del octavo día.

## SAG EN HIPOCAMPO

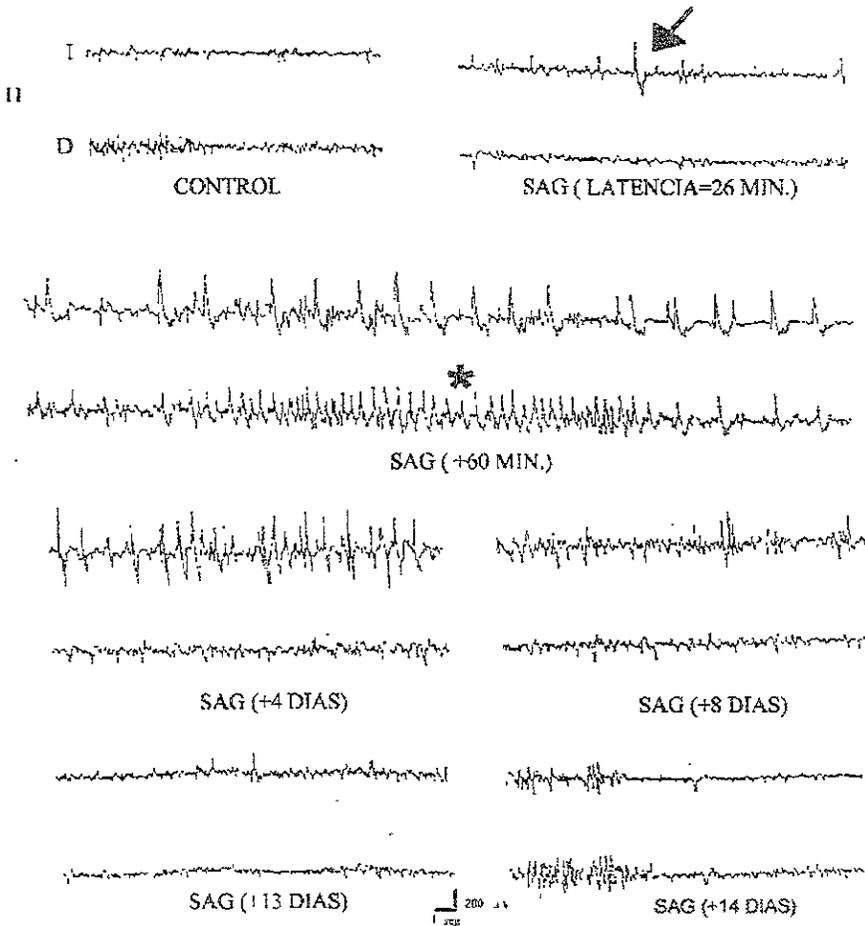


Fig. 10. c) Ejemplo de la evolución temporal del SAG en el hipocampo. Registro electroencefalográfico que muestra una actividad control de amplitud pequeña. El inicio del SAG se observa una espiga en el hipocampo que fue infundido Hipocampo Izquierdo, H.I., presentándose a los 26 minutos (latencia), marcado con una flecha. Se muestra una propagación de descarga epiléptica al hemisferio contralateral del sitio de infusión (H.D.), marcado con un asterisco. La evolución del SAG se observa por la desaparición de los trenes de alta frecuencia y de gran amplitud. Nótese que la actividad retorna a la observada en condiciones control después del día 14. \*Crisis límbica caracterizada electrofisiológicamente por un incremento en la frecuencia y disminución de voltaje.

## CORTEZA SOMATOMOTORA

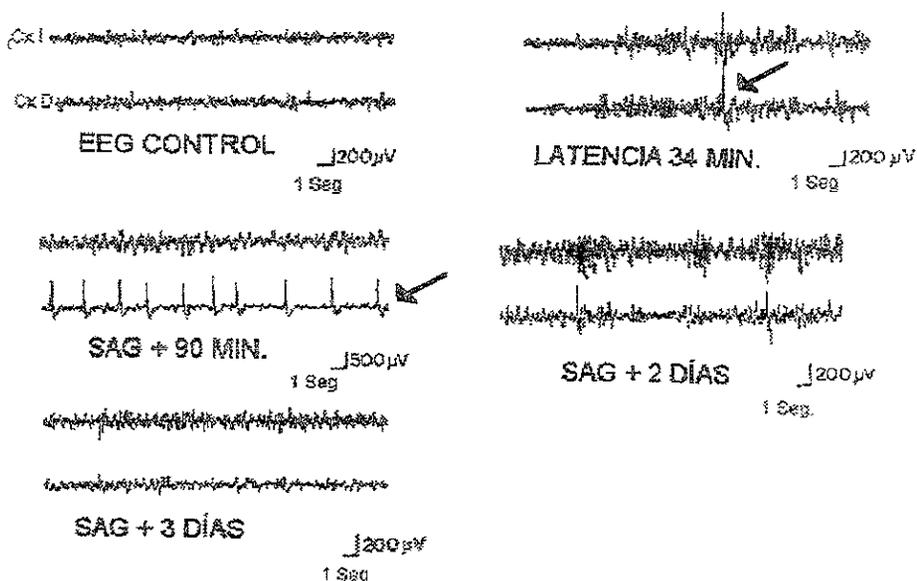


Fig. 11. Evolución temporal electroencefalográfica del SAG en corteza motora. Ejemplo de su registro electroencefalográfico en el que se muestra la actividad paroxística inducida en la corteza motora derecha (CxD), marcado con una flecha. Trazos superiores corteza motora izquierda (CxI).

### Expresión de GFAP

El análisis de inmunoreactividad a la GFAP reveló gliosis alrededor de la lesión inducida por la cánula de infusión, no obstante, en el grupo experimental la expresión de esta proteína presenta diferencias cualitativas en términos de mayor intensidad de la tinción. Ver figuras 12, 13 y 14.

### Correlación del EEG y la GFAP

Existe una correlación entre la actividad del EEG y la expresión de GFAP. La mayoría de los animales infundidos en hipocampo presentaron una propagación de la actividad epiléptica en la zona homóloga contralateral mostrando inmunoreactividad en esta área (n=7). Fig. 12 y 13.

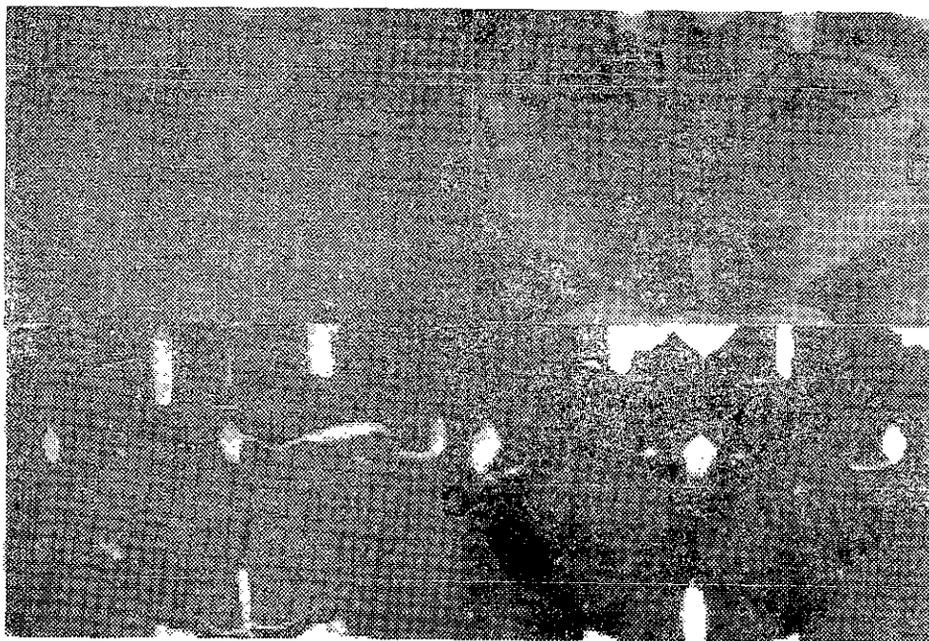


Fig. 12. Un ejemplo de los hallazgos encontrados por la infusión de GABA en hipocampo dorsal. Análisis histológico. A) Tejido control. Corte teñido con la técnica de Nissl, en donde se observa el trayecto de la cánula(I) y el sitio de infusión(II) en hipocampo izquierdo, B) Corte teñido con la técnica de Nissl, en donde se observa la trayectoria de la cánula de infusión (I), así como el sitio de infusión en el hipocampo dorsal (II). Nótese la destrucción de las células piramidales alrededor del sitio de infusión, así como los cambios morfológicos en los estratos radiado y lacunoso molecular (Hipocampo Izquierdo); C) Tejido control con inmunocitoquímica de GFAP/HE, en donde se observa el sitio de infusión en hipocampo izquierdo. D) Con la inmunocitoquímica de GFAP/HE, se observa nuevamente una reacción glial alrededor de la cánula de infusión y una mayor expresión de ésta en el sitio de infusión (hipocampo izquierdo) y en los estratos radiado y lacunoso molecular, así como en el hipocampo contralateral. (Magnificación 1X).

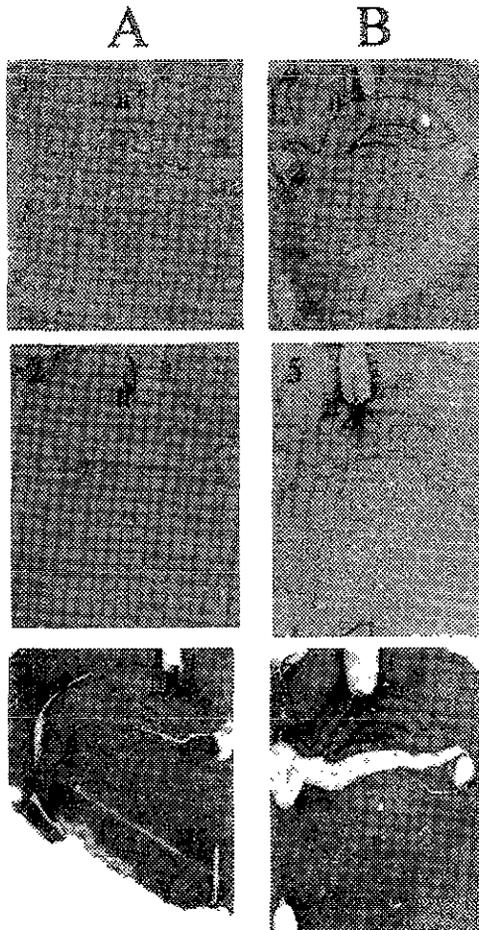


Fig. 13. Análisis histológico en tejido con infusiones realizadas en hipocampo dorsal. Comparación entre las diferentes tinciones utilizadas. A) Tejidos controlés, 1) tinción de Nissl en donde se observa la trayectoria de la cánula de infusión(I) y el daño del tejido por la misma, así como el área de infusión (II) 2) tejido con inmunocitoquímica para GFAP, observando el sitio de la cánula de infusión y la reacción glial alrededor de esta; 3) Corte con inmunocitoquímica para GFAP/HE, en donde observamos reacción glial circunscrita a la cánula de infusión. B) tejidos experimentales. 4) Tinción de Nissl en donde se observa el área de infusión, pérdida neuronal en áreas aledañas al sitio de infusión y áreas picnóticas en estrato radiado y lacunoso molecular; 5) Tejido con inmunocitoquímica de GFAP donde observamos reacción glial en la zona de infusión y en los estratos radiado y lacunoso molecular; 6) tejido con inmunocitoquímica de GFAP/HE en donde se aprecia una gran reacción glial en el área de infusión y en las diferentes áreas antes mencionadas, así como una pérdida neuronal en el área CA1, rodeando la zona de infusión. (Magnificación 1X).

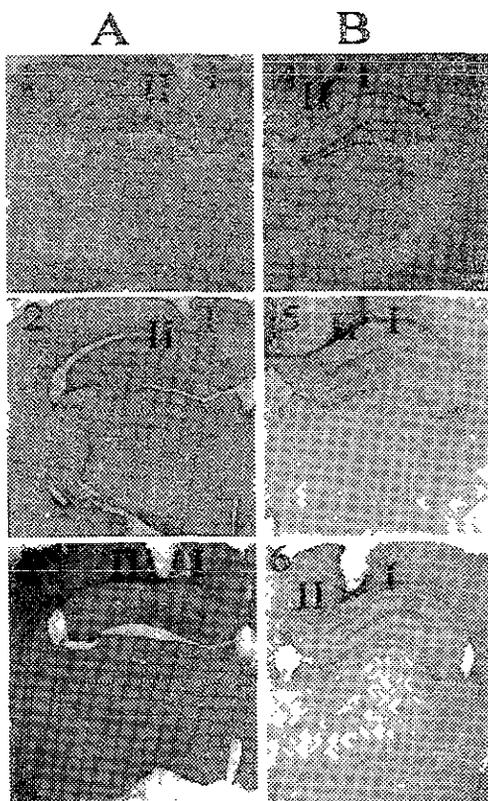


Fig. 14. Análisis histológico en tejido con infusiones realizadas en neocorteza. Comparación entre las diferentes tinciones utilizadas. A) Tejidos controles, 1) tinción de Nissl en donde se observa la trayectoria de la cánula de infusión (I) y el daño del tejido por la misma, así como el área de infusión (II) 2) tejido con inmunocitoquímica para GFAP, observando el sitio de la cánula de infusión y la reacción glial alrededor de esta; 3) Corte con inmunocitoquímica para GFAP/HE, en donde observamos reacción glial circunscrita a la cánula de infusión. B) Tejidos experimentales. 4) Tinción de Nissl en donde se observa el área de infusión, pérdida neuronal en áreas aledañas al sitio de infusión; 5) tejido con inmunocitoquímica para GFAP donde observamos reacción glial en la zona de infusión; 6) Tejido con inmunocitoquímica para GFAP/HE en donde se aprecia reacción glial en el área de infusión, así como una pérdida neuronal, rodeando la zona de infusión. (Magnificación 1X).

#### Conducta motora en el SAG del hipocampo dorsal

Tras el término de la infusión del aminoácido en el hipocampo dorsal se observó conducta en forma de crisis de varios segundos de duración (sacudidas de perro mojado), en los días posteriores no presentó ésta conducta.

## VI. Discusión

### Concentración de GABA y velocidad de infusión para generar SAG.

En corteza motora la concentración de GABA y la velocidad de infusión fueron menores que las reportadas anteriormente en otros estudios (ver introducción). En el presente estudio se generó un SAG hipocámpico con mayor duración no así en la corteza motora, lo cual indica que estas condiciones favorecen la sobreexcitación neuronal, es decir, que la interrupción de la instilación del aminoácido provoca actividad epiléptica ya que el hipocampo es una estructura con bajo umbral para generar actividad paroxística.

La latencia presentada con una infusión de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$  en hipocampo es similar a la obtenida en corteza motora con una infusión de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$ . Respecto a la duración también existe similitud entre estas dosis, esto puede deberse a características propias del parénquima en estas regiones, es decir, en corteza se necesita una concentración del aminoácido 10 veces mayor que la empleada en el presente trabajo, para poder presentar un SAG similar, obteniendo un cambio local visible como efecto de la infusión.

En cuanto a la corteza motora e hipocampo bajo las mismas condiciones experimentales, no se presentan diferencias en la latencia, es posible que en ambas estructuras con el mismo tiempo de instilación y concentración del GABA, se produce un efecto de abstinencia en tiempos similares; sin embargo, en la duración del efecto paroxismal se observan grandes diferencias que pueden ser causa de una mayor sensibilidad en el hipocampo, es decir, que la corteza motora responde con menores efectos a la instilación del aminoácido que el hipocampo.

### Fenomenología del SAG hipocámpal

En el hipocampo se pudieron observar tres estados de evolución del SAG.

1. Inicio: aparición de descargas espiga-onda localizadas en el sitio de infusión, varios minutos después de la suspensión de la infusión.
2. Propagación o periodo de agravación: aparición de trenes de poliespigas, las cuales se presentan bilateralmente y posterior a éstas una depresión post-ictal, ésta actividad predomina en el sitio de infusión, ocurriendo desde 5 minutos después de la

primer espiga de latencia hasta 205 minutos después del inicio de la actividad y en un caso hasta 28 horas después.

3. Periodo de recuperación: caracterizado por la desaparición de poliespigas y propagación al área homóloga contralateral, en este periodo las espigas paroxismales son localizadas en el sitio de infusión, decae su frecuencia y amplitud, este estado se presenta hasta los 14 días aproximadamente.

Patrones electroencefalográficos del SAG encontrados en el hipocampo dorsal de la rata

Patrón I del SAG, se presenta en toda la evolución del SAG, desde la latencia, posteriormente disminuye dramáticamente 85 minutos posteriores al comienzo de la actividad paroxística hasta 205 minutos después de la misma, predominando ulteriormente.

Patrón II del SAG, no se presenta.

Patrón III del SAG, la propagación se presenta de los 5 minutos a los 205 minutos posteriores a la primer descarga epiléptica y en un caso hasta 28 horas después.

Patrón electroencefalográfico en corteza motora

Solo se presenta patrón I, lo cual significa que los cambios en esta estructura realizados por la infusión de GABA, a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$ , no son tan amplios como los observados en el hipocampo.

En todos los casos tanto para corteza como en hipocampo, el final del SAG se anunciaba con la desaparición de la actividad anormal durante la vigilia y sueño de movimientos oculares rápidos y su reaparición en el sueño de ondas lentas. La recuperación del periodo de SAG y su extinción se puede relacionar a la actividad del GABA, como una administración sistémica de una síntesis de inhibidores GABA (alilglicina) que es capaz de reactivar el SAG (Brailowsky, 1990b).

A pesar de las diferencias individuales presentes en cada organismo, las características de patrones del SAG siempre fueron similares.

Con la administración local del GABA ha sido posible valorar los efectos de una serie de factores que afectan el umbral convulsivo en áreas restringidas del sistema nervioso como son la predisposición genética y la nutrición, entre otros. Éste tipo de administración es útil para identificar los fenómenos

neuronales en los que se basan las crisis convulsivas, dado que el sujeto se encuentra sin anestesia, es posible analizar su conducta motora y la actividad eléctrica neuronal que se obtiene tras el implante previo de electrodos para el registro bioeléctrico, obteniendo un análisis fino de la actividad neuronal. Otra ventaja es poder realizar estudios multidisciplinarios en animales con libre movimiento y con crisis recurrentes, donde el animal está libre de sensación dolorosa.

La utilidad de realizar investigación en animales íntegros es que el parénquima cerebral responde con sus mecanismos y vías neurales ante el proceso epiléptico, es decir, que se asemeja más a la epilepsia humana.

### Hiperexcitabilidad, hipersincronía y propagación

Las crisis límbicas son estados de hiper-excitabilidad que se pueden presentar en estructuras del lóbulo temporal tales como, el hipocampo, la corteza entorrinal y la amígdala (Schwartzkroin, 1993).

Las neuronas con áreas epilépticas en estructuras vulnerables como lo es el hipocampo presentan despolarización paroxística, sincronía y ráfagas de potenciales de acción. Estos eventos paroxísticos son seguidos por periodos de inhibición. La mayoría de los sucesos son únicos con una perturbación relativamente pequeña, presentándose como espigas en un registro electroencefalográfico (patrón I), tanto en áreas locales como a través de vías sinápticas hacia áreas distantes, en este caso las contralaterales, lo cual podría suceder a partir de la vía fimbria fornix que es la principal vía implicada en la bilateralización, sincronía y propagación (crisis límbicas).

La sincronización excitatoria puede ser el resultado de factores como son: la potenciación de los contactos sinápticos existentes (Schwartzkroin, 1993), la retroalimentación negativa o por algún tipo de sensibilización del receptor postsináptico que podría deberse a un cambio en la sensibilidad del receptor GABAérgico o bien a la inactivación del canal de  $Cl^-$  involucrado en dicha inhibición (Solis y colaboradores, 1991).

En un estudio con pacientes que presentan epilepsia hipocampal, Marsh y cols, en 1997, observaron anomalías bilaterales ocurridas en regiones corticales temporales. Estos datos

sugieren que las anomalías cerebrales en epilepsia hipocámpal no están limitadas a la región epileptogénica. En trabajos realizados con rebanadas de cerebro de animales que presentaban actividad epiléptica *in vivo*, se observó que los receptores GABA<sub>A</sub> eran tolerantes a la isoguvacina (agonista GABA-érgico) (Silva-Barrat, 1991), lo que apoya la idea de una disminución en la eficacia del receptor, que a su vez implica una desensibilización.

Calixto y cols 2000, realizaron con el modelo del SAG hiperexcitabilidad *in vitro*, con GABA o benzodiazepinas, induciendo un incremento gradual en la amplitud de espigas poblacionales evocadas registradas en rebanadas neocorticales. Se encontró una sensibilidad de la respuesta post-sináptica después del SAG, sugiriendo un cambio funcional en el receptor GABA<sub>A</sub>. Estos cambios pueden ser correlaciones celulares de la aparición del síndrome de abstinencia posterior a la interrupción de la administración de agonistas al receptor GABA<sub>A</sub>.

Es posible que existan cambios regulatorios en el aparato enzimático del GABA a consecuencia del aumento en la concentración del producto, es decir, que existe una disminución de la síntesis (*down-regulation*), así como la recuperación de los niveles enzimáticos, una vez suspendida la infusión del aminoácido (Salazar y cols, 1994). Se sabe que la efectividad de los agonistas del GABA<sub>A</sub>, se reduce por un incremento en la concentración de calcio intracelular o por cambios en los factores de fosforilación intracelular (Stelzer y cols, 1988). Más aun el aumento de los niveles exógenos de GABA en las terminales presinápticas disminuye la síntesis del aminoácido. Estos factores, y un posible decremento en el número de receptores activos pueden ser un elemento desencadenante en el desarrollo de la hiperexcitabilidad neuronal y el foco epiléptico (Silva-Barrat y cols, 1991).

Se ha estudiado la expresión genómica del GABA y se ha observado que ésta se afecta cuando alguna droga se administra en forma crónica, afectando los niveles del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que codifica para las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>. También se ha visto que con agonistas inversos del receptor se incrementa la cantidad de RNAm de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en la corteza. Al administrar agonistas como el diazepam disminuyen los niveles de RNAm de las mismas subunidades, lo que puede considerarse como una respuesta compensatoria que se

manifiesta debido a que el receptor GABA<sub>A</sub> ha permanecido ocupado por un tiempo prolongado (Gallager y Tallman, 1990).

Las estimulaciones repetitivas de las estructuras límbicas generan modificaciones persistentes en la responsividad sináptica en el hipocampo (Gibbs y cols, 1997). Existen cambios neuronales irre-versibles en el hipocampo epiléptico, que resultan de efectos combinados de factores neuronales intrínsecos alterados, algunos de ellos codificados por grupos específicos de genes y otros por cambios extrínsecos en el entorno de las células gliales; la adhesión de sustratos y células asociadas, son factores tróficos que juegan un papel determinante (Brailowsky y cols, 1997).

Ante estimulaciones repetidas se produce un rebrote en las fibras musgosas que se asocia con el desarrollo de nuevos contactos aberrantes, los cuales pueden estar relacionados con la formación de circuitos funcionales excitatorios (Mangan y Bertram, 1997).

Friedman y cols en 1994, observaron que en el estatus epiléptico inducido por kainato se altera la expresión genética del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de ratas adultas, ya que la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  del GABA<sub>A</sub> fue reducida, indicando un posible decremento en la transmisión inhibitoria, lo cual podría representar un cambio en el contenido del RNAm por neurona.

En el modelo de estatus epiléptico inducido por pilocarpina (Gibbs y cols, 1997), se observó mediante la técnica del *patch-clamp* que las neuronas del giro dentado disminuyen su eficacia máxima para activar las corrientes de GABA en las neuronas epilépticas del área CA1 respecto de las control. También encontraron distintas modificaciones asociadas a la epilepsia en la función GABAérgica hipocampal, la cual se puede dar por alteraciones estructurales discretas en el receptor postsináptico GABA<sub>A</sub>.

La propagación de la actividad epileptogénica, ha sido abordada en diversos estudios que describen su diferentes aspectos como son las propiedades intrínsecas de las células, la conectividad sináptica, así como las propiedades de comunicación celular (axones y terminales presinápticas).

Estos datos sugieren que el papel de los canales de Na<sup>+</sup> dendríticos en ráfaga es permitir que los potenciales de acción

somato/axonales se propagan dentro de las dendritas donde estos activan los canales dendríticos de  $Ca^{2+}$ . La activación de la cubierta dendrítica de voltaje de los canales  $Ca^{2+}$ , por una propagación de espigas de alta amplitud, provee una corriente entrante prolongada que es capaz de generar una postdespolarización y disparar múltiples potenciales de acción en el soma de las neuronas piramidales en CA1. Las compuertas de voltaje dendrítico de los canales iónicos, regulan el proceso y almacenamiento de la información entrante en las neuronas piramidales de CA1 mediante la modulación del modo de disparo de los potenciales de acción de una sola espiga a disparo en ráfaga (Magee y Carruth; 1999).

La propagación intra celular de las ondas de  $Ca^{2+}$  por la difusión del trifosfato de inositol ha demostrado ser un mecanismo general por el cual las células se comunican. Los potenciales de acción de  $Ca^{2+}$  de las monocapas de estas células pueden generar una despolarización local de la monocapa en tratamiento, o por una elevación en la concentración de  $K^+$  extracelular ésta acción electrónica propaga los potenciales Inter-celularmente a través de largas distancias de uno en uno o todos a la vez, a una velocidad aproximada de 6.1 mm/seg y puede ser detenido por bloqueadores de canales de calcio tipo L. El resultado de esta propagación es casi sincrónico, e incrementa temporalmente la concentración de calcio intracelular en un gran numero de células. (De Roos y cols., 1997).

La propagación de los potenciales de acción en la arborización terminal compleja esta dado por un circuito de estimulación, la conducción es común a partir de las ramas y de los botones espaciales regularmente, lo cual sugiere que la diversidad estructural de las arborizaciones terminales tiene un gran rango de información presináptica (Luscher y Shiner, 1990).

En el actual estudio se observa una posible privación de la inhibición; es decir, existe una despolarización que viaja a través de la vía fimbria fornix y se comunica con el hipocampo contralateral extendiéndose hasta el área homóloga contralateral.

#### Cambios histológicos en el hipocampo y corteza

En el análisis histológico cualitativo de la tinción de Nissl se observa una pérdida neuronal en la zona circunscrita al área de infusión, como consecuencia de la infusión del aminoácido,

tanto en hipocampo como en corteza motora, presentando las siguientes características:

Tanto en la GFAP como en la GFAP/HE se observa gliosis reactiva en la vecindad del sitio de infusión. Esto sugiere una posible alteración en la relación glía-neurona, a consecuencia del SAG. Los astrocitos son más numerosos en el sitio infundido. Estas observaciones indican que la proliferación astrocítica depende solo del tipo de daño causado por la infusión del aminoácido, lo que sugiere que aún con infusiones de menor tiempo y dosis menores se induce una alteración entre la glía y la neurona en la zona de instilación. Sin embargo en el hipocampo también se observa una reacción glial en la zona homóloga contralateral, lo cual puede explicarse por la vía fimbria-fornix, dada a partir de los axones de las neuronas de CA1 que conforman el alveus y posteriormente el fornix para conectarse al hipocampo contralateral.

#### **EPILEPSIA Y GFAP**

Los astrocitos son importantes en la función neuronal ya que existe un intercambio metabólico de estos con las células nerviosas, bien para capturar algunos metabolitos liberados por ellas o para proporcionarles algunas sustancias, incluso de naturaleza protéica. Mediante su asociación con la pared de los capilares, los astrocitos intervienen estructuralmente en la barrera hematoencefálica. Por otra parte estas células participan de manera muy activa en los procesos de reparación del tejido, después de una lesión traumática química proliferan, aumentan de tamaño y se vuelven más fibrosos, formando una gliosis (Yang y cols., 1997).

Se ha reportado la infiltración glial en focos epilépticos, ya que ha sido observado un aumento de células gliales así como su actividad enzimática (ATPasas Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y anhidrasa carbónica) durante las crisis convulsivas (Brailowsky, 1991 y 1997). Este incremento en la capacidad de la glia para regular la homeostásis iónica es un factor de control en la propagación y extinción de la actividad convulsiva. A la inversa, una disfunción de estos mecanismos gliales podría intervenir en el inicio y generalización de las descargas epilépticas, considerándose que el aumento en la marca para GFAP puede tomarse como una evidencia de la reacción astrocítica a cierta patología neuronal como el daño producido por crisis epilépticas (Brailowsky, 1991 y 1997; Schmidt-Kastner y cols., 1993; Torre y cols., 1993). En experimentos induciendo status

epiléptico por la administración de pilocarpina se demostró un aumento en la inmunoreactividad para GFAP, tanto en la zona de lesión como en las áreas aledañas (Schmidt-Kastner y cols., 1991), semejante a las cuantificadas en este estudio.

El trabajo realizado por Björn y colaboradores en 1997, muestra que la gliosis astrocítica está presente en la epilepsia del lóbulo temporal, en donde, el incremento del volumen de estas células afectan a la regulación de la "homeostasis" iónica del espacio extracelular. Además los astrocitos reactivos producen y liberan matriz molecular extracelular, la cual tiene una función potencial como determinante para la especificidad de la inervación de fibras y neosinaptogénesis. Mediante la inducción de crisis epilépticas por electroshock, en ratas (Steward, 1994), se cuantificó un aumento en la regulación en la expresión del RNAm para GFAP en el giro dentado del hipocampo.

La propia actividad neuronal anormal aumenta la expresión del RNAm y de la proteína a GFAP en el giro dentado del hipocampo (Torre y cols., 1993), es decir, que tras los cambios morfológicos se inducen cambios eléctricos. Este aumento en la producción de GFAP precede a la degeneración neuronal (Hansen y cols., 1991; Kelley y Steward, 1993).

El receptor GABA<sub>A</sub> es miembro de una super familia de receptores ionotrópicos, conformados por varias subunidades, en donde su combinación determina una farmacología particular en diversas regiones cerebrales (Olsen, 1990). Esta propiedad de modulación alostérica es relevante para su amplio uso en la clínica como sucede con las benzodiazepinas, los barbitúricos, los neuroesteroides y el etanol. Después de la administración crónica de todas estas drogas excepto los neuroesteroides se puede inducir una dependencia física y signos de abstinencia. Un mecanismo neuroquímico común que envuelve la función del GABA ha sido sugerido por esos signos de abstinencia (Cowen, 1982). La comprensión de la patofisiología del SAG puede permitirnos descifrar los mecanismos responsables de la adicción sedativa, ansiolítica e hipnótica, lo que representa un problema epidemiológico significativo en varios países. De hecho el SAG representa un factor clave común en todas esas adicciones.

## Epilepsia del lóbulo temporal y conducta

En la introducción se definió a la epilepsia, caracterizada por la repetición de crisis resultantes de la actividad excesiva de neuronas cerebrales originadas en áreas cerebrales concernientes a la producción y control de estas. Existen conductas de aparición súbita e incontrolable que pueden originarse por trastornos de la excitabilidad nerviosa de tipo epiléptico (Brailowsky, 1999).

La conducta de "Sacudidas de perro mojado" que observamos en el presente trabajo, también se han indicado en ratas dependientes de morfina, como efecto de la abstinencia a esta (Bristow y cols., 1997; Rasmussen y cols; 1990); y en donde la conducta se asocia a alteraciones en el metabolismo de neurotransmisores, regulación de receptores o funciones fisiológicas (Pinelli y Trivulsio, 1997). Jingyi y Leung en 1999, observaron sacudidas de perro mojado al estimular eléctricamente la región CA1 del hipocampo.

La clarificación de los mecanismos neurales que median la conducta post-ictal en animales puede ayudar a entender la conducta post-ictal en humanos inducida por la abstinencia de alcohol, barbitúricos y drogas ansiolíticas, generándose hiperexcitabilidad neuronal que se manifiesta conductualmente por tremor y contracciones involuntarias (Martín, 1987).

## VII. Conclusiones

1. Se confirma que la suspensión de la infusión de GABA en el hipocampo dorsal de la rata genera hiperexcitabilidad en el área infundida.
2. La actividad paroxística observada en los registros EEG obtenidos en hipocampo tienen diferencias en cuanto a patrones electro-encefalográficos, respecto a los observados a concentraciones mayores e iguales en corteza motora.
3. La actividad paroxística genera una despoblación neuronoglia observada con la tinción de GFAP/HE, en las áreas cercanas al sitio de infusión del aminoácido.
4. En este modelo de epilepsia focal, el hipocampo en el animal íntegro es más sensible que la corteza a la epileptogénesis.
5. El Síndrome de Abstinencia al GABA es un modelo que destaca el papel preponderante que tiene el sistema GABAérgico en la generación de la epilepsia, así como la importancia de los mecanismos inhibidores en los fenómenos paroxísticos.

## Glosario

**Agonistas.** Sustancias que producen una respuesta biológica similar a la producida por un transmisor.

**Antagonistas.** Sustancias que impiden la unión de un transmisor con su receptor. Se unen al receptor de tal modo que impiden su efecto biológico.

**Despolarización paroxística.** Cambio en el potencial de reposo de la célula, que se repite con cierta periodicidad.

**Efecto alostérico.** Modificación de una enzima o un receptor por un agente (químico o biológico) que actúa fuera del sitio activo. Este efecto produce cambios en la actividad enzimática o en la unión del receptor a su ligando.

**Electroencefalograma.** Registro de la actividad eléctrica del cerebro (EEG).

**Época.** Espacio de tiempo, seleccionado de acuerdo con la velocidad de registro del estudio poligráfico. Se emplea para calificar las fases de sueño.

**Espiga.** Potencial de acción que se registra en el electroencefalograma.

**Excitabilidad.** Posibilidades de producir potenciales de acción en una neurona.

**Foco epiléptico.** Conjunto de neuronas que descargan simultáneamente en forma paroxística.

**Foco epileptogénico.** Conglomerado de neuronas anormales e hiperactivas a las que se atribuyen descargas eléctricas conocidas como espigas.

**Hiperpolarización.** Desviación que sufre el potencial de reposo de la célula en el sentido de hacerse más electronegativa.

**Idiopática.** Dícese de lo que es de origen desconocido.

**In vitro.** Ambiente artificial que se construye para mantener viva una célula o conjunto de células y así facilitar su estudio. Dícese del experimento en el que se obtiene una muestra de tejido para estudiarla aisladamente.

**In vivo.** Dícese del experimento en el que se estudian una o varias zonas en un animal vivo. Llevar a cabo el estudio de la célula cuando ésta se encuentra en su medio natural.

**Iontoforesis.** Aplicación en el tejido de una sustancia que contenga carga eléctrica mediante el paso de corriente.

**Kda.** Kilo dalton

**Kindling.** Actividad convulsiva que crece y se activa en forma gradual. Estimulación eléctrica de baja intensidad, aplicada en forma repetida a intervalos apropiados y en diversas estructuras cerebrales. Provoca el desarrollo de crisis convulsivas generalizadas.

**Miclonía.** Contracción breve e involuntaria de uno o varios músculos.

**Modelo.** Estructura o mecanismo que se emplea como una analogía para interpretar un fenómeno natural. Los modelos científicos se utilizan para desarrollar nuevas teorías, modificar las existentes o para hacerlas más inteligibles.

**Modulación.** Modificación de un evento.

**Neuromoduladores.** Sustancias que modifican la acción de un neurotransmisor, pero que por sí solas no producen un efecto biológico.

**Neurotransmisores.** Sustancias que se liberan de las terminales sinápticas. Su interacción con un receptor postsináptico produce un efecto biológico.

**Paroxismo.** Onda o grupo de ondas que constituyen la representación EEG de una descarga epiléptica, que aparece y desaparece súbitamente y se caracteriza por una frecuencia, morfología o amplitud que la distingue de la actividad de base del EEG.

**Postdescarga.** Descarga neuronal epileptiforme que persiste después de la aplicación de un estímulo eléctrico. Se refiere a las descargas neuronales que tienen una duración mayor que la del estímulo aplicado.

**Postsinápsis.** Parte especializada de la membrana de las neuronas para recibir información; en la superficie externa se encuentran los receptores de los transmisores y el mecanismo de transducción produce un evento fisiológico determinado.

**Potencial postsináptico excitatorio.** Actividad excitadora que muestra la célula en respuesta a una señal presináptica.

**Potencial postsináptico inhibitorio.** Actividad inhibitoria que muestra la célula en respuesta a una señal presináptica.

**Presinápsis.** Sitio de almacenamiento y de liberación de un neurotransmisor.

**Receptor.** Conjunto de moléculas que reconocen a un transmisor, y la unión con éste origina un cambio ya sea en la permeabilidad de la membrana o en el metabolismo de la célula.

**Receptor.** Proteína membranal que reconoce específicamente a un ligando, así como a sus agonistas y antagonistas a compuestos relacionados estructuralmente.

**Regulación.** Modificación de la actividad de un sistema con base en el estado que se encuentre.

**Sinapsis.** Sitio de contacto entre dos neuronas, especializado en la transmisión de información.

**Sistémico.** Perteneciente o relativo a la circulación general de la sangre.

**Status epilepticus.** Condición caracterizada por una crisis epiléptica lo suficientemente prolongada o repetida para producir una condición epiléptica sostenida.

**Sueño de ondas lentas.** Se refiere a las fases primera y cuarta del sueño, las que se califican con base en la proporción de actividad lenta (delta) registrada del EEG durante un estudio poligráfico de sueño. La tercera fase está constituida, de 20 a 50 % de la época, por actividad delta. La cuarta fase (más del 50% de la actividad de la época) está integrada por frecuencias delta en el EEG.

**Sueño MOR.** También llamado sueño paradójico o de movimientos oculares rápidos. Se caracteriza por la aparición de periodos de actividad de bajo voltaje y rápidas frecuencias en el EEG, acompañadas por episodios de movimientos oculares rápidos y relajación muscular; además, se asocia a ensoñaciones y a un estado cerebral de actividad funcional.

**Transmisor.** Sustancia que interviene en la comunicación celular. Neurotransmisor, hormona o neuromodulador.

**Vesículas sinápticas.** Vesículas membranosas que se encuentran en las terminales sinápticas y que se postula son sitios de almacenamiento de los transmisores.

## VIII. REFERENCIAS

- Araneda, S., Silva-Barrat, C., Menini, C., y Naquet, R., 1994, High expression of noradrenaline, choline acetyltransferase and glial fibrillary acidic protein in the epileptic focus consecutive to GABA withdrawal. An immunocytochemical study, *Brain Research*, 655(1-2):135-146.
- Arias, C., Valero, H., y Tapia, R., 1992, Inhibition of brain glutamate decarboxylase is released to febrile seizures in rat pups, *J. Neurochem*, 58(1):369-373.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H. y Levesque, M.F., 1991, Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata, *Neurosci*, 42(2): 351-363
- Barnard, E.A., Darlison, M.G., y Seeburg, P., 1987, Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptor/channel superfamily, *Trends Neurosci*, 10(12):502-509.
- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., y Langer, S.Z., 1998, International union of pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*, 50(2):291-313.
- Barr, M.L., *El sistema nervioso humano*, 1975, Ed. Harla:237-242.
- Bateson, A.N., Lasham, A., y Darlison, M.G., 1991,  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel  $\beta$ -Subunit gene transcript, *J Neurochem*, 56(4):1437-1440.
- Bayer S.A., Forebrain and midbrain. Hippocampal region. En *The rat nervous System*, Paxinos G (Ed). Academic Press. 1985, Vol 1:335-352.
- Bayón, A., Possani, L.D., Tapia, M., Tapia, R., 1997, Kinetics of the brain glutamate decarboxylase. Interactions with glutamate, pyridoxal 5'-phosphate and glutamate-pyridoxal 5'-phosphate schiff base. *J. Neurochem*, 29(3):519-525.
- Benke, D., Mertens, S., Trzeciak, A., Gillissen, D., y Möhler, H., 1991, Identification and immunohistochemical mapping of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes containing the  $\delta$ -subunit in rat brain, *FEBS Lett*, 283(1):145-149.
- Bignami, A., y Dahl, D., Astrocytes. Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. R.G. Landes Company Austin. U.S.A. CA., 1994, 5-39; 84-89.
- Björn, S., Faissner, A., Beck, H., Behle, K., Wolf, H.K., Wiestler, O.D., y Blümcke, Y., 1997, Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horns sclerosis, *Glia*, 19:35-46.
- Borrmann, J., 1988, Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes, *TINS*, 11(3):112-116.
- Borrmann, J., y Feigenspan, A., 1995, GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Neurosci*, 18:515-519
- Brailowsky, S., Menini, Ch., Silva-Barrat, C., y Naquet, R., 1987, Epileptogenic  $\gamma$ -aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons, *Neurosci Lett*, 74(1):75-80
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., y Naquet, R., 1988, The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis, *Brain Res*, 422:175-179.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., y Naquet, R., 1989, Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental, *Salud Mental*, 12(1):53-62.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, Ch., y Naquet, R., 1990a, Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats, *Epilepsia*, 31(4):369-377.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Menini, Ch., Riche, D., y Naquet, R., Anticonvulsant effects of intracortical chronic infusion of GABA in generalized epilepsy. En Avoli (Ed), *Generalized epilepsy: neurobiological approaches*, Barkhauser, Boston, 1990b:126-136.
- Brailowsky, S., El Síndrome de Abstinencia al GABA: un modelo de epileptogénesis focal. En *Epilepsia Experimental*, Otero-Siliceo, E., Brailowsky, S. (Ed), México, 1991:11-14, 121-130.
- Brailowsky, S., Hirsch, E., y Marescaux, C., Elementos fisiopatológicos de los procesos epilépticos. En *Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*, Feria, A., Martínez, J., Rubio, F. (Ed), México, 1997:103-146.

- Brailowsky, S., *Epilepsia Enfermedad Sagrada del Cerebro*. Fondo de Cultura Económica, México, 1999.
- Bristow, L.J., Hogg, J.E., y Hutson, P.H., 1997, Competitive and glycine/NMDA receptor antagonists attenuate withdrawal-induced behaviours and increased hippocampal acetylcholine efflux in morphine-dependent rats. *Neuropharmacol.* 36(2):241-250.
- Brown, T.H., y Zador, A.M., *Hippocampus*, En *The synaptic organization of the brain*, (Ed) Shepherd, G. Oxford University Press, N.Y. 1990:346-388.
- Bu, D.F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J.K., Kaufman, D.L., Wagner-Mc Pherson, C.B., Evans, G.A., y Tobin, A.J., 1992, Two human glutamate decarboxylases, 65-KDa GAD and 67-KDa GAD are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(6):2115-2119.
- Bureau, M., y Olsen, R.W., 1990, Multiple distinct subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor protein show different ligand-binding affinities, *Mol Pharmacol.*, 37(4):497-502.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemani, C., y Brailowsky, S. Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 195:73-76.
- Calixto, E., López-Colomé, A.M., Casasola, C., Montiel, T., Bargas, J. Y Brailowsky, S. Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. Review in Press.
- Calvalheiro, E.A., Riche, D.A. y Le Gal La Salle, D., 1982, Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous seizures, *EEG Clin. Neurophysiol.* 53: 581-589.
- Chan-Palay, V., y Köhler, C., *Neurology and neurobiology. The hippocampus new vistas*, vol. 52, Alan R. Liss, inc, N.Y. 1989.
- Cohen, J.N., y Eichenbaum, H., *Anatomical data regarding the procedural declarative distinction, En Memory, amnesia and the hippocampal system*, Mit Press, England, 1993:93-108.
- Covarrubias, M., y Tapia., R., 1978, Calcium-dependent binding of brain glutamate decarboxylase to phospholipid vesicles. *Journal Neurochemical*, 31(5):1209-1214.
- Covarrubias, M., y Tapia., R., 1980, Brain glutamate decarboxylase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme. *J. Neurochem*, 34(6):1682-1688.
- Cowen P.J., y Nutt, D.J., 1982, Abstinence symptoms after withdrawal of tranquillising drugs: is there a common neurochemical mechanism?, *Lancet*. Aug 14;2(8294):360-2.
- Cutting, G.R., Lu, L., O'Hara, B.F., Kasch, L.M., Montrose-Rafizadeh, Ch., Donovan, D.M., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggano, W.B., Uhl, G.R., y Kazazian, H.H., 1991. Cloning of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)  $\rho 1$  cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(7):2673-2677.
- De Lorey, T.M., y Olsen, R.W., 1992,  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor structure and function, *J. Biol. Chem*, 267(24):16747-16750.
- De Mello, F.G., 1984, GABA-mediated control of glutamate decarboxylase (GAD) in cell aggregate culture of chick embryo retina, *Dev. Brain Res*, 14(1):7-13.
- De Mello, F.G., Hocco, J.N., Ventura, A.L.M., y Gardino, P.F., 1991, Glutamic acid decarboxylase of embryonic avian retina cells in culture: regulation by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), *Cellular Molecular Neurobiol*, 11(6):485-496.
- Denner., L.A., y Wu., J.Y., 1985, Two forms of brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate, *J. Neurochem*, 44(3):957-965.
- De Ross, A.D., Willems, P.H., Peters, P.H., Van Zoelens, E.J., Theuvsat, A.P., 1997, Synchronized calcium spiking resulting from spontaneous calcium action potentials in monolayers of NRK fibroblast. *Cell Calcium*. Sep, 22(3):195-207.
- Erlander., M.G., Tillakaratne, N.J.K., Feldblum, S., Patel, N., y Tobin, A.J., 1991, Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7(2):91-100.
- Feldblum, S., Erlander, M.G., y Tobin, A.J., 1993, Different distributions of GAD-65 and GAD-67 mRNA suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J. Neurosci. Res*, 34(6):689-706.

- Feria, V.A., Tapia, G., *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. Editores: Feria, A., Martínez, D., Rubio, F. Ed Trillas, México, 1986: 28-98.
- Feria, A., Castillo, S., Ortiz, G. Cambios neuromorfológicos asociados a las convulsiones; En *Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Editores: Feria, A., Martínez, D., Rubio, F. Ed. INNyN, México, 1997: 25-42.
- Fisher, R.S., *Clinical overview of epilepsy*, En *Neurotransmitters and epilepsy*. (Ed) Fisher, R.S., Coyle, J.T. U.S.A, 1991: 1-16.
- Fuchs, K., Adamiker, D., Sieghart, W., 1990, Identification of  $\alpha 2$ - and  $\alpha 3$ -subunits of the GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex purified from the brains of young rats, *FEBS Lett*, 261(1):52-54.
- Furshpan, E.J., y Potter, D.D., 1989, Seizure-like activity and cellular damage in rat hippocampal neurons in cell culture, *Neuron*, 3(2):199-207.
- Friedman, L.K., Pellegrini-Giampietro, D.E., Sperber, E.F., Bennett, M.V.L., Moshé, S.L., y Zukin, Suzanne., 1994, Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABA<sub>A</sub> receptor gene expression in adult rat hippocampus: An in situ hybridization study. *J. Neuroscience*, 14(5): 2697-2707.
- Fritschy, J., y Mohler, H., 1995, GABA<sub>A</sub>-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *The Journal Comparative Neurology*, 359(1):154-194.
- Fukuda, H., Brailowsky, S., Menini, Ch., Silva-Barrat, C., Riche, D., y Naquet, R., 1987, Anticonvulsant effects of intracortical, chronic infusion of GABA in Kindled rats: focal seizures upon withdrawal, *Exp. Neurol*, 98:120-129.
- Gallager, D.W., y Tallman, J.F., 1990, Relationship of GABA receptor heterogeneity to regional differences in drug response, *Neurochem Res*, 15(2):113-118.
- García-Ugalde, G., Galarzaga, E., Vargas, J., y Brailowsky, S., 1992, Hiperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal, *Neuroscience Letters*, 147(2):229-232.
- Gilbs, J.W., Shumate, M., y Coulter, D.A., 1997, Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptor function in dentate granule and CA1 Neurons. *J. Neurophysiol*, 77: 1924-1997.
- Grayson, R., Schoch, P., y Haefely, W, 1991, Benzodiazepine receptors: new vistas. *Seminars in the Neurosciences*, 3:191-203.
- Greif, K.F., Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J.K., y Tobin, A.J., 1991, Postnatal expression of glutamate decarboxylase in developing rat cerebellum, *Neurochemical Res*, 16(3):235-242.
- Greif, K.F., Tillakaratne, N.J.K., Erlander, M.G., Feldblum, S., y Tobin, A.J., 1992, Transient increase in expression of a glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during postnatal development of the rat striatum. *Dev Biol*, 152:1-7.
- Grossfeld, R.M., Yancey, S.W., y Baxter, C.F., 1984, Inhibitors of crayfish glutamic acid decarboxylase. *Neurochemical Res*, 9(7):947-963.
- Halonen, T., Pitkanen, A., Saano, V., y Riekkinen, P.J., 1991, Effects of vigabatrin ( $\gamma$ -vynil GABA) on neurotransmission-related amino acids and on GABA and benzodiazepine receptor binding in rats, *Epilepsia*, 32(2):242-249.
- Hansen, A., Jorgensen, O.S., Bolwing, T.G., y Barry, D.I., 1991, Hippocampal kindling in the rat in associated with time-dependent increases in the concentration of glial fibrillary acidic protein, *J. of Neurochemistry*, 57 (5):1716- 1720.
- Herb, A., Wisden, W., Lüddens, H., Puia, G., Vicini, S , y Seeburg, P.H., 1992, The third subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor family, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(4):1433-1437.
- Houser, C.R., y Esclapez, M., 1996, Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures, *Epilepsy Research*, 26(1):207-218.
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981, The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem Cytochem* 29:577-580.

COPIES TO BE  
 MADE  
 FOR THE  
 ARCHIVE

- Jingyi, M., y Leung, L.S., 1999, Medial septum the increase in post-ictal behaviors and hippocampal gamma waves after an electrically induced seizure. *Brain Research*, 833:51-57.
- Johnston, G.A.R., 1996, GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels?. *Trends Pharmacol Sci*, 17: 319-323.
- Kandel, E.R., y Schwartz, J.H., *Hypothalamus, Limbic System, and Cerebral Cortex: Homeostasis and Arousal*. Ed. Principles of neural science. Segunda Edición. Ed. Elsevier. 1985, U.S.A.: 609-625
- Kapur, J , y Coulter, D.A., 1995, Experimental status epilepticus alters  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor function in CA1 pyramidal neurons, *Annals Neurology*, 38:893-900.
- Karlson, A.E., Hagopian, W.A., Grubin, C.E., Dube, S., Distèche, C.M., Adler, D.A., Barmeyer, K., Mathews, S., Grant, F.J., Foster, D., y Lernmark, A., 1991, Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8337-8341.
- Kaufman, D.L., Houser, C.R., y Tobin, A.J., 1991, Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem*, 56(2):720-723.
- Kelley, M.S., y Steward, O., 1993. The role of neural activity in upregulating GFAP mRNA levels after electrolytic lesions of the entorhinal cortex. I. *J. of Developing Neuroscience*, 11:105-115.
- Kendall, D.A., Fox, D.A., y Enna, S.J., 1981, Effect of  $\gamma$ -vinyl GABA on bicuculline-induced seizures, *Neuropharmacology*, 20:351-355.
- Khrestchatskiy, M., MacLennan, A.J., Chiang, M.Y., Xu, W., Jackson, M.B., Becna, N., Sternini, C., Olsen, R.W., y Tobin, A.J., 1989, A novel  $\alpha$  subunit in rat brain GABA<sub>A</sub> receptors, *Neuron*, 3(6):745-753.
- Knoflach, F., Backus, K.H., Galler, T., Malherbe, P., Pflümid, P., Möhler, H., y Trube, G., 1992, Pharmacological and electrophysiological properties of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors comprising the  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  and  $\gamma 2$  subunits, *Eur J Neurosci*, 4(1):1-9.
- Kofuji, P., Wang, J.B., Moss, S.J., Haganur, R.L., y Burt, D.R., 1991, Generation of two forms of the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor  $\gamma 2$ -subunit in mice by alternative splicing, *J. Neurochem*, 56(2):713-715.
- Le Gal La Salle, G., Bralowski, S., Menini, Ch., y Naquet, R., 1988, Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures, *Exp. Neurol*, 101:411-417.
- Leite , J.P., Babb, T.L., Pretorius, J.K., Kuhlman, P.A., Yeoman, K.M., Mathern, G.W., 1996, Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats, *Epilepsy research*, 26:219-231.
- Lolaït, S.J., O'Carroll, A.M., Kusano, K., y Mahan, L.C., 1989, Pharmacological characterization and region-specific expression in brain of the  $\beta 2$ - and  $\beta 3$ -subunits of the rat GABA<sub>A</sub> receptor, *FEBS Lett*, 258(1):17-21.
- Löschner, W., Hösnack, D., y Szamer, M., 1989, Use of inhibitors of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) turnover in various brain regions of rats: a reevaluation of aminooxyacetic acid, *J. Neurochem*, 53(6):1737-1750.
- Lüscher, H.R., Shiner, J.S., 1990, Simulation of action potential propagation in complex terminal arborizations. *Biophys. J. Dec*, 58(6):1389-99.
- Lüddens, H., Pritchett, D.B., Köhler, M., Killisch, Y., Keinänen, K., Monyer, H , Sprengel, R., y Seeburg, P.H., 1990, Cerebellar GABA<sub>A</sub> receptor selective for a behavioral alcohol antagonist, *Nature*, 346(6285):648-651.
- Lüddens, H., y Wisden, W., 1991, Function and pharmacology of multiple GABA<sub>A</sub> receptor subunits, *Trends Pharmacol Sci*, 12(2):49-51.
- Lloyd, K.G., Bossi, L., Morselli, P.L , Munari, C., Rougier, M., y Loiseau, P., Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy, *In Advances in neurology*. (Ed) Delgado-Escueta, A V., Ward, A.A., Woodbury, D.M., y Porter, R.J., Raven Press, 1986:1033-1044.
- Magee, J.C., y Carruth, M., 1999, Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol Oct*, 82(4):1895-901.

- Manyam, N.V.B., Katz, L., Hare, T.A., Gerber, J.C., y Grossman, M.H., 1960, Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders Arch Neurol, 37:352-355
- Mangan, P.S. y Bertram, E.H., 1997, Shortened-duration GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic potentials underlie enhanced CA1 excitability in a chronic model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 80(4): 1101-1111.
- Marsh, L., Morrel, M.J., Shear, P.K., Sullivan, E.V., Freeman, H., Marie, A., Lim, K.O., y Pfefferbaum, A., 1997, Cortical and hippocampal volume deficits in temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 38(5): 576-587.
- Martin, D.L., Martin, S.B., Wu, S.J., y Espina, N., 1991, Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): The apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. J. Neurosci, 11(9):2725-2731.
- Martin, D.L. y Rimvall, K., 1993, Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis in the brain. J. Neurochem, 60(2):395-407.
- Massieu, L., Rivera, A., y Tapia, R., 1994, Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate- $\gamma$ -glutamyl hydrazone in the developing rat, Neurochemical Research, 19(2):183-187.
- Matern, G.W., Babb, T.L., Liete, J.P., Pretorius, J.K., Yeoman, K.M., y Kuhlman, P.A., 1996, The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, Epilepsy Research, 26(1):151-161.
- Matsumoto, R.R., 1989, GABA receptors: are cellular differences reflected in function, Brain Res. Rev., 14(3):203-225.
- Meldrum, B.S., 1991, Excitatory amino acid transmitters in epilepsy, Epilepsia, 32(2):1-3.
- Menini, C., Mraovitch, S., Calando, Y., De La Sayette, V., Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., y Seylaz, J., 1991, Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat, Neuroscience, 41(43):607-615.
- Mohler, H., Malherbe, P., Draguhn, A., y Richards, J.G., 1990, GABA<sub>A</sub> receptors: Structural requirements and sites of gene expression in mammalian brain, Neurochem Res, 15(2):199-207.
- Montiel, T., Almeida, D., Arango, I., Calixto, E., Casasola, C., y Brailowsky, S., 2000, Longlasting Effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat. Neural plasticity., 7(1-2): 1-8.
- Neal, M.J., y Shah, M.A., 1990, Development of tolerance to the effects of vigabatrin ( $\gamma$ -vinyl-GABA) on GABA release from rat cerebral cortex, spinal cord and retina, Br. J. Pharmacol., 100:324-328.
- Niquet, J., Gilliam, A., Ben-Ari, Y., y Represa, A., 1996, Reactive glial cells express a vitronectin-like protein in the hippocampus of epileptic rats, Glia, 16(4):359-367.
- Olsen, R.W., y Tobin, A.J., 1990, Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors, FASEB J, 4(5):1469-1480.
- Olsen, R.W., Bureau, M.H., Endo, S., y Smith, G., 1991, The GABA<sub>A</sub> receptor family in the mammalian brain, Neurochem Res, 16(3):317-325.
- Pasantes, H., Sánchez, J., y Tapia, R. Neurobiología celular, F.C.E., México, 1991:173-180
- Paxinos, G., Watson, Ch., The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, 1986, U.S.A.
- Perkins, K.L., y Wong, R.K.S., 1996, Ionic basis of the post-synaptic the polarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. J. Neurophysiol, 76: 3886-3899.
- Pirelli, A., y Travulzio, S., 1997, Quantitative evaluation of opioid withdrawal signs in rats repeatedly treated with morphine and injected with naloxone, in the absence or presence of the antiabstinence agent clonidine, J. Pharmacol. and toxicol. Methods, 38: 117-131.
- Popa-Wagner, A., Fischer, B., Schmoll, H., Platt, D., y Kessler, C., 1997, Increased expression of microtubule-associated protein 1B in the hippocampus, subiculum, and perforant path of rats treated with a high dose of pentilinetetrazole, Experimental Neurology, 148(1):73-82.

- Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Shiver, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, ... , y Seeburg, P.H., 1989, Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology, *Nature*, 338(6216):582-585.
- Pritchett, D.B., y Seeburg, P.H., 1990,  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor  $\alpha 5$ -subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology, *J. Neurochem*, 54(5):1802-1804.
- Puia, G., Santi, M.R., Vicini, S., Pritchett, D.B., Seeburg, P.H., y Costa, E., 1989, Differences in the negative allosteric modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors elicited by 4'-chlorodiazepam and by a  $\beta$ carboline-3-carboxylate ester: A study with natural and reconstituted receptors, *Proc Natl Acad Sci USA*, :7275-7279.
- Rasmussen, K., Beitner, J.D.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K., y Nestler, E.J., 1990, Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates, *J. Neurosci*, Jul 10(7):2308-17.
- Ribak, C.E., Hunt, C., Bakay, R.A.E., y Oertel, W.H., 1986, A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci, *Brain Res*, 363(1):78-80.
- Rimvall, K., y Martin, D.L., 1992, Increased intracellular  $\gamma$ -aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex. *J. Neurochem*. 58(1):158-166.
- Rimvall, K., y Martin, D.L., 1994, The level of GAD67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal  $\gamma$ -aminobutyric acid levels, *J. Neurochem*, 62(4):1375-1381
- Rolls, E.T., Functions of neural networks in the hippocampus and of back projections in the cerebral cortex in memory. En *Brain organization and memory: cells, systems, and circuits*, (Ed) McCaughy, J.L., Weinberger, N.M., y Lynch, G., Oxford University Press, N.Y., 1990:184-210
- Ruano, D., Cano, J., Machado, A., y Victorica, J., 1991, Pharmacologic characterization of GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepine receptor in rat hippocampus during aging, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(3):902-907.
- Rubio, F., Aspectos generales y clasificación de la epilepsia, En *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. (3d) Feria, A., Martínez, D. y Rubio, F., México, 1997:1-24.
- Rubio, F., Generalidades y clasificación de la epilepsia, En *Epilepsia, un enfoque multidisciplinario*. (Ed) Feria, A., Martínez, D. y Rubio, F., México, 1989:19-27.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., Tapia, R., 1994, Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid, *Neurochem*, 24(4):363-368.
- Schmidt-Kastner, R., Helm, C., y Sontag, K.H., 1991, Damage of substantia nigra pars reticulata during pilocarpine-induced status epilepticus in the rat: immunohistochemical study of neurons, astrocytes and serum-protein extravasation, *Experimental Brain Research*, 86(1):125-140.
- Schmidt-Kastner, R., Waetsch, K., Weigel, H., y Eysel, U.T., 1993, Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction in rat visual system, *Int. J. of Developing Neuroscience*, 11:157-174.
- Schwartzkroin, P.A; *The treatment of epilepsy: Principles and practice*, Ed. Wyllie, E; 1993, pp: 83-99.
- Sharma, J.K., y Dakshinamurti, K., 1992, Seizure activity in pyridoxine-deficient adult rats, *Epilepsia*, 33(2):235-247.
- Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, Ch., y Naquet, R., 1989, Tolerance to GABA<sub>A</sub> agonist may explain bursting properties of neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome, *Brain Res*, 498(2):289-298.
- Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, Ch., y Naquet, R., 1991, *In vivo* and *in vitro* studies of the epileptic focus induced by the interruption of a cortical GABA infusion, *Exp. Brain Res*, 26:107-110.
- Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, Ch., Champagnat, J., y Naquet, R., 1992, Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat, *Journal of Neurophysiology*, 67(3):715-727.
- Silva-Barrat, C., y Champagnat, J., 1995, A potassium current controls burst termination in rat neocortical neurons after GABA withdrawal, *Neuroscience Letters*, 189(2): 105-108.

- Silva-Compte, C., Velluti, J., y Menini, Ch., 1982, Characteristics and origin of frontal paroxysmal responses induced by light stimulation in the Papio papio under allylglycine. *Electroencefalogr. Clin. Neurophysiol.*, 53:479-490.
- Sigel, B., Baur, R., Trube, G., Mähler, H., y Malherbe, P., 1990, The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function, *Neuron*, 5(5):703-711.
- Solis, H., y Arauz, J., Modelos experimentales de epilepsia., En *Epilepsia un enfoque multidisciplinario.* (Ed) Feria, A., Martínez, D., y Rubio, F. México, 1989:74-97.
- Solis, H., Bravo M.J., Galindo-Morales, J.A., Modificación de la inhibición recurrente por la estimulación eléctrica iterativa o por la aplicación local de fármacos convulsiantes al hipocampo. En: *Epilepsia experimental.* (Ed) Enrique Otero-Silíceo. México, 1991:211-223.
- Stelzer, A., Kay, A.R., y Wong, R.K.S., 1988, GABA<sub>A</sub>-receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors, *Science*, 241:339-341.
- Stephenson, F.A., 1988, Understanding the GABA<sub>A</sub> receptor: a chemically gated ion channel, *Biochem J.*, 249:21-32.
- Stephenson, F.A., Duggan, M.J., y Casalotti, S.O., 1989, Identification of the  $\alpha 3$ -subunit in the GABA<sub>A</sub> receptor purified from bovine brain, *FEBS Lett*, 243(2):358-362.
- Steward, O., 1994, Electroconvulsive seizures upregulate astroglial gene expression selectively in the dentate gyrus. *Brain Res Mol. Brain Res. Sep*; 25 (3-4):217-24.
- Sutula, T., 1991, Reactive changes in epilepsy: cell death and axon sprouting induced by Kandler. *Epilepsy Research*, 10: 62-70.
- Sykes, C., Prestwich, S., y Horton, R., 1984, Chronic administration of the GABA-transaminase inhibitor ethanolemme-0-sulphate leads to up-regulation of GABA binding sites. *Bioche. Pharmacol.*, 33(3):387-393.
- Tapia, R., y Sandoval, M.E., 1971, Study on the inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-oxime-0-acetic acid. *J. Neurochem*, 18(11):2051-2059.
- Tapia, R., Biochemical pharmacology of GABA in SNC, En *Handbook of psychopharmacology*, (Ed) Iversen, L.L., Iversen, S.D., y Snyder, S.H. Plenum Press, N.Y. 1975:1-58.
- Tapia, R., Regulation of glutamate decarboxylase activity. En *Glutamate, Glutamate and GABA in the Central Nervous System*, Alan, R. Liss, Inc. N.Y.1983:113-128.
- Tapia, R., Alteraciones neuroquímicas asociadas a las epilepsias, En *Epilepsia experimental*, (Ed) Otero-Silíceo, E., 1991:37-45.
- Torre, E.R., Lothman, E., y Steward, O., 1993, Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures, *Brain Research*, 631(2):256-264.
- Vezzani, A., Schwarzer, C., Lothman, E.W., Williamson, J y Sperk, G., 1996, Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures, *Epilepsy Research*, 26(1):267-279.
- Wasterlain, C G , Shirasaka, Y , Mazarati, A , Spigelman, I., 1996, Chronic epilepsy with damage restricted to the hippocampus: possible mechanisms, *Epilepsy Research*, 26(1):255-265.
- Whiting, P., McKernan, R.M., Iversen, LL., 1990, Another mechanisms for creating diversity in  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of  $\gamma 2$  subunit, one of which contains a protein kinase C phosphorylation site, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(24):9965-9970.
- Wilson, C.L., Maidment, N.T., Shomer, M.H., Behnke, E.J. , Ackerson, L., Fried, Y., y Engel, J., 1996, Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of hippocampal epilepsy, *Epilepsy Research*, 26(1):245-254.
- Wilson-Shaw, D., Robinson, M., Gambarana, C , Siegel, R.E., y Sikela, J.M., 1991, A novel  $\gamma$ -subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor identified using the polymerase chain reaction, *FEBS Lett*, 284(2):211-215.
- Wisden, W., Herb, A., Wieland, H., Kelnanen, X., Luddens, H., y Seeburg, P.H., 1991, Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 4$  subunit, *FEBS Lett*, 289(2):227-230

Wu, C., y Leung, S., 1997, Partial hippocampal kindling decreases efficacy of presynaptic GABA<sub>A</sub> autoreceptors in CA1, *The Journal of Neuroscience*, 17(23):9261-9269.

Wu, V.W., y Schwartz, J.P., 1998, Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives, *J of Neurosci-Research*, 51(6):675-681.

Yang, H., Lieska, N., Kriho, V., Wu, C., y Pappas, G.D., 1997, A Subpopulation of reactive astrocytes at the immediate site of cerebral cortical injury, *Experimental Neurology*, 146(1):199-205.

Ymer, S., Draguhn, A., Köhler, M., Schofield, P.R., y Seeburg, P.H., 1989a, Sequence and expression of a novel GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunit, *FEBS Lett*, 258(1):119-122.

Ymer, S., Schofield, P.R., Draguhn, A., Werner, P., Köhler, M., y Seeburg, P.H., 1989b, GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$ -subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs, *EMBO J*, 8(6):1665-1670

Zarranz, J., *Epilepsias*, En: *Neurología*, Editorial Doyma-Mosby, España, 1994.295-325.