

C306.2
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**ESTUDIO TOPOGRAFICO DEL SINDROME
DE ABSTINENCIA AL GABA (SAG)**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
MARIA DE LA PAZ VITAL BECERRA

279075

MEXICO, D. F.

MAYO DE 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue dirigida por el Dr. Simón Brailowsky Klipsten del departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular y por la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia del departamento de Biofísica de Instituto de Fisiología Celular.

**Este trabajo fue apoyado por beca del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia
CONACyT**

Al Güerito, mejor conocido como, Dr. Simón Brailowsky Klipsten por enseñarme que no hay que esperar lo que me quiera dar la vida y lamentarme si no me da lo que quiero, y que es mejor tomarlo cuando esta ahí o luchar por conseguirlo.

A mis padres:

Adalberto Vital y María de la Paz Becerra

A mis hermanos:

Daniel

Raquel

Esteban

Rosa María

Francisco

Adalberto

Gerardo

Diego

A mis sobrinos y sobrinas

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, especialmente:

Al Dr. Simón Brailowsky Klipsten que aún estando de viaje me sigue guiando para que termine esta tesis.

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por vigilar celosamente que se cumpla lo indicado por el güerito.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por ser complice de Marcia y el güerito y ayudarme a que no equivocara el camino.

A la Dra. Ana María López Colomé por recordarme con una sonrisa, que lo que se empieza se acaba.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por sus sugerencias a este trabajo.

A los miembros del jurado por la lectura crítica de este manuscrito.

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoyta

Dra. Ana María López Colomé

Dra. Clorinda Arias Alvarez

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

A Tere Montiel por estar al pie del cañón siempre y no rajarse.

A todos mis compañeros y amigos del 207-ote:

(en orden de aparición en la memoria).

Angélica Zepeda (Mary Morena)

Geraldine Niño

Oscar Galicia

Cesar Casasola

Eduardo Calixto

Luz Palacios

Esperanza Melendez

A mis amigos de computo:

Juan Manuel Barbosa Castillo

Rodrigo Montúfar Chaveznava

A mis amigos y compañeros del 205-sur, ellos ya saben quienes son!

ABREVIATURAS

ATP.- Adenosintrifosfato

BO.- Bulbo olfatorio

CaM KII.- Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II

CTCG.- Crisis parcial que progresa a crisis tónico clónica generalizada

EEG.- Electroencefalograma

FP.- Fosfato de piridoxal

GABA-T.- Transaminasa del GABA

GABA.- Ácido γ -amino butírico

GABA_A.- Receptor GABA_A

GABA_B.- Receptor GABA_B

GAD.- Glutamato descarboxilasa

GEPR.- Ratas con predisposición genética a la epilepsia generalizada

IMR.- Resonancia magnética nuclear

NMDA.- N-metil de aspartato.

PET.- Tomografía de emisión de positrones

PKA.- Proteína cinasa A

PKC.- Proteína cinasa C

PKG.- Proteína cinasa

PTP.- Potenciación post tetánica

SAG.- Síndrome de abstinencia al GABA

SNC.- Sistema nervioso central

SPECT.- Tomografía computarizada por emisión de un solo fotón

SSA.- Semialdehído succínico

SSADH.- Deshidrogenasa del semialdehído succínico

ÍNDICE

CONTENIDO	página
ABREVIATURAS	
RESUMEN.....	1
• INTRODUCCIÓN.....	2
1.- La epilepsia: definición, clasificaciones, etiología, fármacos.....	2
2.- Modelos animales de las epilepsias:	8
3.- Neurotransmisión GABAérgica.....	9
3.1- Receptores:.....	12
3.1.1 <u>Receptor GABA_A</u>	12
a) estructura y regulación.....	14
b) estructura de las subunidades.....	16
c) distribución.....	18
d) fosforilación.....	21
e) modificación de las subunidades.....	22
3.1.2- <u>Receptor GABA_B</u>	23
3.2- GABA y epilepsia.....	24
4.- Estructuras cerebrales: corteza, bulbo olfatorio, cerebelo, amígdala e hipocampo.....	24
5.- El síndrome de abstinencia al GABA (SAG).....	31
5.1.- Introducción al SAG.....	31
5.2.- Patrones EEG del SAG.....	32
5.3.- Latencia y duración del SAG.....	33
5.4.- Alteraciones histológicas, metabólicas, electro-clínicas y farmacológicas que se presentan durante el SAG.....	34
5.5.- El SAG y el receptor GABA _A	38
•• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
••• HIPÓTESIS.....	39
•••• OBJETIVOS.....	39

█	MÉTODO.....	40
█ •	RESULTADOS.....	43
█ ••	DISCUSIÓN.....	59
█ •••	CONCLUSIONES.....	66
█ ••••	REFERENCIAS.....	68

ESTUDIO TOPOGRÁFICO DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA AL GABA (SAG).

RESUMEN

El síndrome de abstinencia al GABA (SAG) se caracteriza por signos electroclínicos de epilepsia como consecuencia de la interrupción de ácido γ -aminobutírico (GABA). El SAG se observó inicialmente en monos fotosensibles y posteriormente en ratas y en monos normales, en estructuras corticales y límbicas, donde se demostró que la interrupción de la infusión intracortical (7 días) de GABA a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a un flujo de 1 $\mu\text{l}/\text{h}$, se asocia a la presencia de descargas paroxísticas originadas en el área infundida. Actualmente se ha podido reproducir este status epiléptico con infusiones semiagudas (2 horas) de 50 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GABA a un flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{h}$, en estructuras corticales, teniendo una incidencia del SAG del 100%.

El objetivo de este trabajo es determinar la susceptibilidad regional de diversas estructuras cerebrales a desarrollar un SAG.

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de 230-270 g. al momento de la cirugía. Se implantaron cánulas-electrodos de acero inoxidable de 0.6 mm de diámetro externo, electrodos bipolares en las estructuras de interés, dos electrodos epidurales en corteza occipital y un electrodo de referencia en el seno frontal. Después de 7 días de recuperación se hizo la infusión de GABA (50 o 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3 $\mu\text{l}/\text{h}$ 2h) tomando registro EEG antes y después de la administración del fármaco, hasta la desaparición del foco epiléptico. En bulbo olfatorio y en cerebelo no observamos ningún cambio en la actividad electroencefalográfica, ni durante ni después de la infusión de GABA; sólo en amígdala y en hipocampo CA3 se observó el SAG. Nuestros resultados indican que no todas las estructuras cerebrales son susceptibles de desarrollar SAG.

• INTRODUCCIÓN

1.- La epilepsia

La epilepsia es una de las enfermedades más antiguas conocidas. Se caracteriza por una tendencia a presentar crisis recurrentes, las cuales pueden llevar a pérdida de la conciencia, desórdenes del movimiento y sensación (visión, oído y gusto), de la función autónoma, del estado de ánimo y de la función mental (World Health Organization, 1997).

La palabra epilepsia se deriva del griego *επιλαμβάνειν* (*epilambanein*), que significa tener crisis, tener un ataque. Esta terminología se deriva de la creencia de que todas las enfermedades se producen por un ataque de los dioses o un espíritu malo, por tal se considero a las crisis epilépticas como un ejemplo vivo de enfermedad sagrada o posesión demoniaca (Dreifuss, 1997).

En el contexto mesoamericano se le considero también como una enfermedad sagrada, para la cual se describieron diferentes tratamientos dependiendo del momento en que se presente la crisis:

“Cuando es reciente el mal sagrado sirven las piedrecillas que se hallan en el buche del halcón, de los pajarillos *huactli* y del gallo; la raíz de *quetzalatzónyatl*, cuerno de venado, incienso blanquecino, incienso blanco, cabello de muerto, carne quemada de topo encerrado en una olla. Todo bien molido en agua caliente. El que tiene este mal debe beber, hasta vomitar, la anterior mixtura. Y puede ser útil, antes de que la beba, tomar el jugo de un arbusto que se llama *tlatlacótic* y cuya raíz ha de ser molida.

Observar el tiempo en que la epilepsia ha de venir, porque entonces, al aparecer la señal, el epiléptico póngase en pie y púncensele los cartilagos y los costados. Untando una mixtura hecha de hojas de *quetzalatzóntl* y *tetzilin*, hierba *acocoxihuitl*, molidos en agua. Debe comer también cerebro cocido de comadreja y de zorra.

Se le deben dar sahumeros con buen olor de nido de ratones quemados en las brasas y de incienso blanquecino y de plumas del ave llamada *cozcacuahitli*.” (López Austin 1994, Códice Badiano).

Actualmente se sabe que las crisis epilépticas se producen por una descarga eléctrica excesiva, súbita y usualmente breve, en las neuronas (células del cerebro). Estas descargas eléctricas pueden ocurrir en diferentes partes del cerebro por tanto las

manifestaciones clínicas de estas crisis dependen del sitio y de la función del área cerebral afectada (World Health Organization, 1997).

La epilepsia es un síntoma de disfunción cerebral, de carácter recurrente, que se caracteriza por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas (Brailowsky et al., 1989). Las crisis epilépticas pueden presentarse como una complicación de un proceso infeccioso, accidentes traumáticos, de la presencia de tumores, enfermedades metabólicas, toxicidad por fármacos o síndromes hereditarios.

No existen límites sociales, geográficos o raciales para la incidencia de la epilepsia, ocurre en ambos sexos y a cualquier edad. Más del 5% de la población mundial ha padecido al menos una crisis epiléptica en su vida. Sin embargo, el diagnóstico de epilepsia se da cuando se han padecido crisis repetidas. La prevalencia mundial de epilepsia en 1997 (crisis repetidas o con necesidad de tratamiento) fue de 7 por cada 1000 habitantes. Esto es, 40 millones de personas en el mundo padecen epilepsia (World Health Organization, 1997). En cuanto a la incidencia, esta es mayor en países en vías de desarrollo con una tasa de crecimiento anual de 100 por cada 100 000 habitantes, en tanto que en países desarrollados es de 50 por cada 100 000 habitantes (World Health Organization, 1997).

Clasificaciones de la epilepsia

La clasificación de la epilepsia se puede basar distintas características de la enfermedad como: la etiología, la patología, la edad de inicio, las crisis clínicas, los hallazgos en el electroencefalograma (EEG) o el pronóstico.

Las crisis epilépticas pueden manifestarse desde breves lapsos de pérdida de la atención o espasmos musculares hasta convulsiones prolongadas. Las crisis pueden variar en su frecuencia, de menos de una por año hasta varias por día. Las crisis se pueden clasificar también de acuerdo al sitio del cerebro en el que se generan (véase tabla 1).

La epilepsia parcial: Las crisis parciales se generan de un foco de hiperactividad neuronal a partir del cual la descarga anormal se propaga hacia estructuras distantes. En términos temporo-espaciales, podemos dividir a estas crisis al menos tres en etapas principales: a) inicio, b) propagación y amplificación y c) final. Cada una de estas fases incluyen también estados transitorios interrelacionados (Brailowsky et al., 1997).

Una de las manifestaciones electroencefalográficas más características de un foco epileptógeno activo lo constituye la llamada espiga, o potencial transitorio de duración inferior a 70 msec y considerado como producto de la adición temporal y espacial de eventos sinápticos resultantes de la activación sincrónica de numerosas sinapsis de la misma neurona o grupos de neuronas (Matsumoto et al., 1969).

Las espigas epileptiformes interictales son la manifestación electroencefalográfica de la epilepsia focal (Hughes, 1989) y un signo de hiperactividad neuronal. A nivel unitario, registros intracelulares muestran la característica reacción epileptiforme neuronal, la llamada despolarización paroxística gigante, que es una despolarización lenta, de gran amplitud, asociada con un tren de potenciales de alta frecuencia (véase fig. 1).

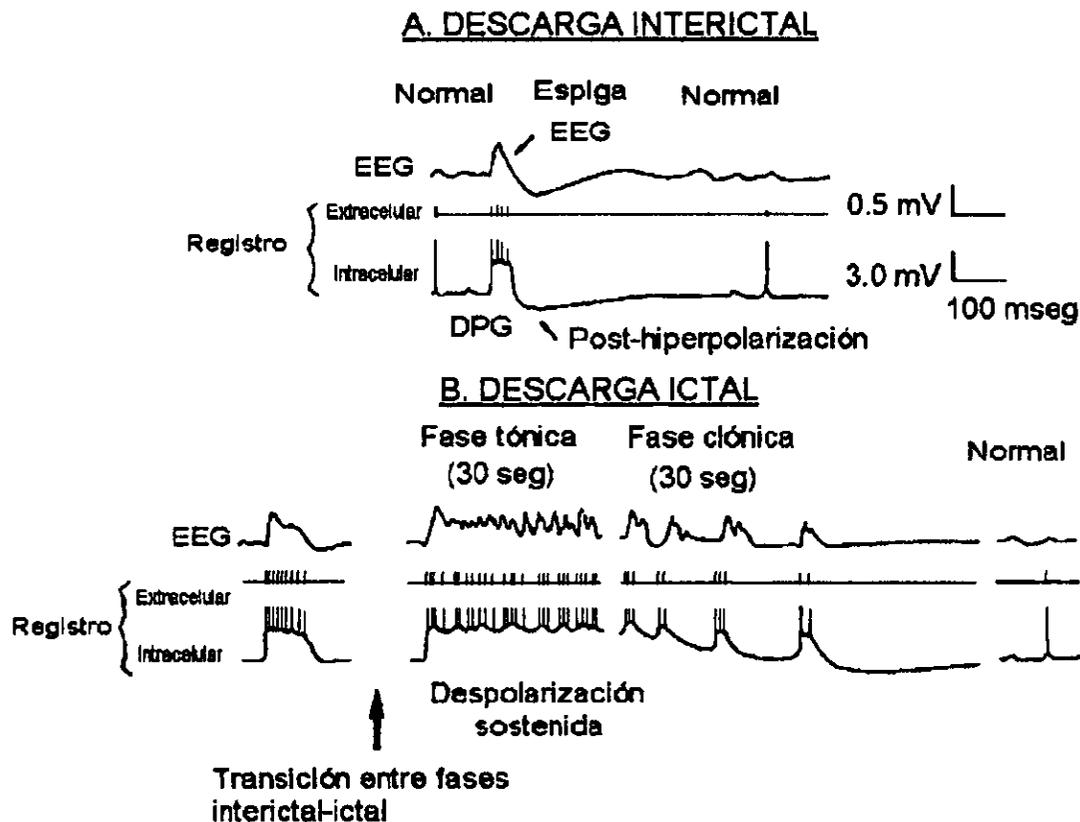


FIG. 1. Esquema de la expresión electrográfica de la descarga interictal **A**) y de la descarga ictal **B**) a nivel del EEG (trazo superior), de un registro extracelular y de un registro intracelular. En **A** se nota la correlación entre la espiga EEG, el aumento en la actividad unitaria y la despolarización paroxística gigante, la cual se sigue de una hiperpolarización. En **B**, se ilustra una crisis tónico-clónica. En el extremo derecho se incluye un esquema de la actividad normal. (Tomada de Brailowsky et al., 1997).

TABLA 1. Clasificación de las epilepsias

I.- Epilepsia parcial, focal o local.

A) epilepsia parcial simple (sin pérdida de conciencia)

- 1- síntomas motores (posturas)
- 2- síntomas somatosensoriales o somatoespaciales (alucinaciones simples, por ejemplo parestesias, fosfenos).
- 3- síntomas autónomos (algesias, palidez, transpiración, ruborización, piloerección y dilatación de la pupila).
- 4- síntomas psicológicos (problemas en las funciones cerebrales superiores),
 - a- disfasia (dificultad en la fonación y en el lenguaje)
 - b- dismnesia (alteraciones en la memoria)
 - c- cognitivos (estados de sueño, problemas para orientarse en el tiempo).
 - d- afectivos (miedo, enojo, etc.,).
 - e- ilusiones
 - f- alucinaciones (musicales, escénicas)

B) epilepsia parcial compleja

1. Con pérdida de conciencia al inicio.
 - a- Presenta síntomas similares a los de una epilepsia parcial simple pero seguida de pérdida de conciencia.
 - b- Sin respuestas autónomas.
2. Inicio parcial simple seguido de pérdida de conciencia
 - a- Solo con pérdida de conciencia
 - b- Con respuestas autónomas.

C) Crisis parcial que progresa a crisis tónico clónica generalizada (CTCG)

- 1- Crisis parcial simple seguida de CTCG
- 2- Crisis parcial compleja seguida de CTCG
- 3- Crisis parcial simple seguida de crisis parcial compleja, seguida de CTCG.

II. Epilepsia Generalizada (convulsiva o no convulsiva).

A) Crisis tipo ausencia

- 1- Ausencia típica
 - a- pérdida de la conciencia
 - b- componentes clónicos moderados
 - c- componentes atónicos
 - d- componentes tónicos
 - e- automatismos
 - f- respuestas autónomas
- 2- Ausencia atípica
 - a- cambios en el tono más pronunciados que en una ausencia típica
 - b- instalación o interrupción no abrupta.

B) Crisis mioclónicas (mioclonos con espasmos musculares)

- C) Crisis clónicas
- D) Crisis tónicas
- E) Crisis tónico-clónicas
- F) Crisis atónicas (estáticas).

III. Epilepsias no clasificadas

En este apartado se incluyen todas las crisis que no se pueden clasificar en las categorías anteriores, se incluyen crisis neonatales, movimiento rítmico de los ojos, movimientos masticatorios y vértigo.

IV. Adicionalmente

1. Ataques furtivos inesperados y sin ninguna provocación aparente.
2. Ataques cíclicos a intervalos más o menos regulares (ejemplo, relacionados con el ciclo menstrual o con los ciclos sueño-vigilia).
3. Ataques provocados por:
 - a- factores no sensoriales (fatiga, alcohol, emoción, etc.).
 - b- factores sensoriales.

Modificada de Dreifuss, 1997.

Las espigas interictales son la marca electroencefalográfica de la epilepsia focal (Hughes, 1989) y un signo típico de la hiperactividad neuronal

En **epilepsia generalizada** las crisis surgen bilateral y simétricamente, estas siempre involucran pérdida de conciencia, observándose convulsiones típicas denominadas “gran mal”, así como crisis de ausencia nombradas de “petit mal” (actualmente estos términos ya no se utilizan).

A partir de la década pasada es posible estudiar directamente la estructura y función de cerebro humano vivo, con la imagen por resonancia magnética (IMR) es posible ver la mayoría de las anomalías en las estructuras cerebrales responsables de las crisis epilépticas. El uso de la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT) pueden ayudar a estudiar una región epiléptica al ver la disfunción localizada en el flujo sanguíneo, el metabolismo y procesos químicos durante y después de la crisis epiléptica (World Health Organization, 1997).

Estas herramientas son muy importantes en el diagnóstico oportuno y adecuado de las epilepsias, puesto que en el 75% de los casos recién diagnosticados y tratados con drogas antiépiléticas se obtiene un control completo de las crisis por varios años y después de dos o siete años de tratamiento exitoso el medicamento se puede suspender

en cerca del 70% de los casos sin observar recaídas (World Health Organization, 1997). Además es importante tener un diagnóstico adecuado ya que ciertos fármacos indicados en las ausencias, como la etosuximida, son ineficaces o incluso agravantes en otras formas de epilepsia (epilepsia generalizada o epilepsia parcial), mientras que fármacos específicos para el tratamiento de crisis focales y convulsivas (carbamazepina, fenitoina) agravan las ausencias (Brailowsky et al., 1997).

Los barbitúricos y las benzodiazepinas potencian la acción del ácido γ aminobutírico (GABA), modulando la actividad de su receptor específico. La mayoría de los agonistas del receptor GABA_A son anticonvulsivos potenciales en los modelos de crisis generalizadas convulsivas (véase tabla 2). A la inversa, los antagonistas del GABA facilitan la actividad convulsiva. Los fármacos que aumentan la concentración endógena de GABA, ya sea inhibiendo su degradación o inhibiendo su recaptura, son anticonvulsivantes, mientras que las drogas que inhiben su síntesis pueden provocar crisis convulsivas (Brailowsky et al., 1997).

TABLA 2. Fármacos antiepilépticos

<p>Epilepsia parcial Hidantoinas-(fenitoina) Iminostilbenes (carbapazepina) Ácidos grasos (ácido valpróico) Barbitúricos (fenobarbital) Barbitúricos (primidona) Benzodizepinas</p>	<p>Epilepsia generalizada Hidantoinas-(fenitoina) Iminostilbenes (carbapazepina) Ácidos grasos (ácido valproico) Barbitúricos (fenobarbital) Barbitúricos (primidona) Benzodizepinas</p>
<p>Epilepsia generalizada tónico clónica Hidantoinas-(fenitoina) Iminostilbenes (carbapazepina) Ácidos grasos (ácido valproico) Barbitúricos (fenobarbital) Barbitúricos (primidona) Benzodizepinas</p>	<p>Epilepsia tipo ausencia Succinamida (etosuximida) Benzodiazepinas</p>

Fármacos antiepilépticos más comunes en el tratamiento de cada tipo de epilepsia. Entre paréntesis se tienen los agentes secundarios.

2.- Modelos animales de Epilepsias

Existen por lo menos tres razones que justifican la utilización de modelos animales de epilepsia en el laboratorio: a) investigar los mecanismos básicos de la epilepsia, b) probar potenciales drogas antiepilépticas, y c) esclarecer los mecanismos fundamentales de la integración neuronal normal y la conducta.

Las condiciones de los modelos animales casi nunca reproducen completamente la epilepsia humana, sin embargo, esto no niega su importancia (véase tabla 3), ya que estos pueden ser útiles al estudiar los diferentes tipos de epilepsia.

Dentro de los modelos animales de epilepsia encontramos:

TABLA 3. Modelos experimentales de epilepsia

A. Equivalentes epilépticos

1. Parcial

Disparo de neuronas in vitro (Mg^{++} bajo, NMDA)

2. Generalizada

Tipo convulsiva: Potenciación post tetánica (PTP)

Tipo ausencia: Estimulación repetitiva de médula espinal de gato.

B. Modelos de epilepsia inducida agudamente (epilepsia reactiva).

1. Parcial

Estimulación eléctrica

Convulsiones tóxicas con bloqueo de la inhibición (penicilina, bicuculina, picrotoxina, pentilene-tetrazol).

Convulsiones tóxicas que aumentan la excitación (carbacol, ácido kaínico).

2. Generalizada

a). Tipo convulsiva

Crisis máxima con electrochoque

Crisis máxima con drogas convulsivas sistemáticas

(pentilene-tetrazol, alilglicina, bicuculina, ácido kaínico,

barbitúricos, ouabaina, anticolinesterasas, tiosemicarbazidos).

Crisis con flurotil.

b). Tipo ausencia

Estimulación eléctrica subcortical

Pentilene-tetrazol sistemático

Penicilina generalizada en felinos

Opioides administración intracerebroventricular

Gama hidroxibutirato sistemático

Crisis por abstinencia de CO_2

Hipertermia en animales inmaduros

C. Modelos inducidos crónicamente (desordenes secundarios)

1. Parcial

- Lesiones por congelamiento
- Rebanada cortical parcialmente aislada
- Metales (aluminio, cobalto, ácido tungsteno, cloruro férrico)
- Ácido kaínico
- Estimulación eléctrica focal: Kindling
- Síndrome de abstinencia al GABA (SAG)
- Toxina tetánica
- Anticuerpos gangliosidos anti-GM1

2. Generalizada

- Lesiones epileptogénicas múltiples bilaterales
- Lesiones subcorticales

D. Modelos crónicos determinados genéticamente (desordenes primarios)

- Mandriles Papio papio
- Ratones audiogénicos
- Ratas con predisposición genética a la epilepsia generalizada (GEPR)
- Gerbil con predisposición a crisis
- Otros modelos de ratones mutantes (tambaleantes , bamboleantes)
- Perros sabueso con crisis epilépticas
- Pollos con crisis epilépticas
- Ratas Strasbourg

(Adaptada de Engel, 1992).

Se tienen además que en algunos de estos modelos de epilepsia se trabaja con ciertas regiones cerebrales o estructuras que responden de forma diferencial, según el modelo.

3.- Neurotransmisión GABAérgica

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más común en el SNC de los mamíferos, mientras que la glicina, también inhibitora, es neurotransmisor de una pequeña población de neuronas en SNC y médula espinal. Estudios autoradiográficos han mostrado que aproximadamente una de cada tres terminales nerviosas en el S.N.C. se marcan después de ser expuestas a GABA marcado y se presume que son GABAérgicas por naturaleza. (Iversen e Iversen, 1981).

En la mayoría de las regiones del SNC (corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y médula espinal) se ha encontrado GABA en interneuronas inhibitoras locales de axón

Hipertermia en animales inmaduros

C. Modelos inducidos crónicamente (desordenes secundarios)

1. Parcial

Lesiones por congelamiento

Rebanada cortical parcialmente aislada

Metales (aluminio, cobalto, ácido tungsteno, cloruro férrico)

Ácido kaínico

Estimulación eléctrica focal: Kindling

Síndrome de abstinencia al GABA (SAG)

Toxina tetánica

Anticuerpos gangliosidos anti-GM1

2. Generalizada

Lesiones epileptogénicas múltiples bilaterales

Lesiones subcorticales

D. Modelos crónicos determinados genéticamente (desordenes primarios)

Mandriles Papio papio

Ratones audiogénicos

Ratas con predisposición genética a la epilepsia generalizada (GEPR)

Gerbil con predisposición a crisis

Otros modelos de ratones mutantes (tambaleantes , bamboleantes)

Perros sabueso con crisis epilépticas

Pollos con crisis epilépticas

Ratas Strasbourg

(Adaptada de Engel, 1992).

Se tienen además que en algunos de estos modelos de epilepsia se trabaja con ciertas regiones cerebrales o estructuras que responden de forma diferencial, según el modelo.

3.- Neurotransmisión GABAérgica

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más común en el SNC de los mamíferos, mientras que la glicina, también inhibitora, es neurotransmisor de una pequeña población de neuronas en SNC y médula espinal. Estudios autoradiográficos han mostrado que aproximadamente una de cada tres terminales nerviosas en el S.N.C. se marcan después de ser expuestas a GABA marcado y se presume que son GABAérgicas por naturaleza. (Iversen e Iversen, 1981).

En la mayoría de las regiones del SNC (corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y médula espinal) se ha encontrado GABA en interneuronas inhibitoras locales de axón

corto. Existen solo dos vías neuronales que contienen GABA que involucra proyecciones de axón largo de una región del cerebro a otra: las células de Purkinje de cerebelo y sus proyecciones al núcleo cerebelar y vestibular, y un sistema de neuronas cuyos cuerpos celulares están en cuerpo estriado con axones que proyectan a sustancia negra (Iversen e Iversen, 1981).

El GABA en el cerebro adulto, se sintetiza a partir de la de la descarboxilasa de ácido glutámico (L-glutamato-1-carboxilasa, GAD), la cual remueve el grupo α -carboxilo del glutamato para producir GABA y CO_2 : La GAD requiere fosfato de piridoxal (FP) como cofactor y su reacción es irreversible bajo condiciones fisiológicas.

Existen al menos dos isoformas de la enzima, la GAD_{67} y la GAD_{65} , cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 65%, son derivadas de dos genes no alélicos (Bu et al., 1992); las isoformas de la GAD difieren en antigenicidad, localización subcelular, expresión regional e interacción con el fosfato de piridoxal, la GAD_{65} es más sensible a la presencia del cofactor exógeno que la GAD_{67} (Bu et al., 1992; Kaufman et al., 1991).

La transaminación del GABA se cataliza por la acción de una transaminasa, que utiliza al α -cetoglutarato (este último también está en el ciclo de Krebs), como sustrato, originando como productos el ácido glutámico y el semialdehído succínico. La transaminasa del GABA (GABA-T) también utiliza al FP como cofactor; pero a diferencia de la GAD, la apoenzima se encuentra firmemente unida y saturada por el cofactor. El semialdehído succínico (SSA) formado como consecuencia de la acción de la transaminasa del GABA se oxida bajo el efecto de la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSADH), lo cual da origen al ácido succínico; esta vía metabólica constituye un corto circuito en el ciclo de Krebs (véase figura 2), (DeLorey y Olsen, 1994).

Como ya se menciona en las sinapsis inhibitorias GABAérgicas, el GABA es sintetizado por la descarboxilación del glutamato catalizado por la GAD. Esta enzima puede estar soluble en el citoplasma de la terminal y alimentar una poza de GABA, el GABA se libera mediante el mecanismo dependiente de Ca^{++} . Sin embargo, otra población de la GAD puede unirse a la membrana presináptica, unión que depende de la

presencia de cationes como el Ca^{2+} o el K^+ , de tal modo que la liberación de GABA ocurre de manera acoplada a su síntesis. El GABA liberado como producto de cualquiera de estos dos mecanismos puede ser capturado por la terminal o por las células gliales, mediante un transporte activo que depende de Na^+ y de Cl^- , y es después metabolizado mediante una reacción de transaminación con α -cetoglutarato catalizada por la GABA-T. En esta reacción se forman SSA y glutamato, el GABA en la glía puede utilizarse para formar glutamina, precursora a su vez de glutamato en la terminal (véase figura 2). (Tapia, 1991).

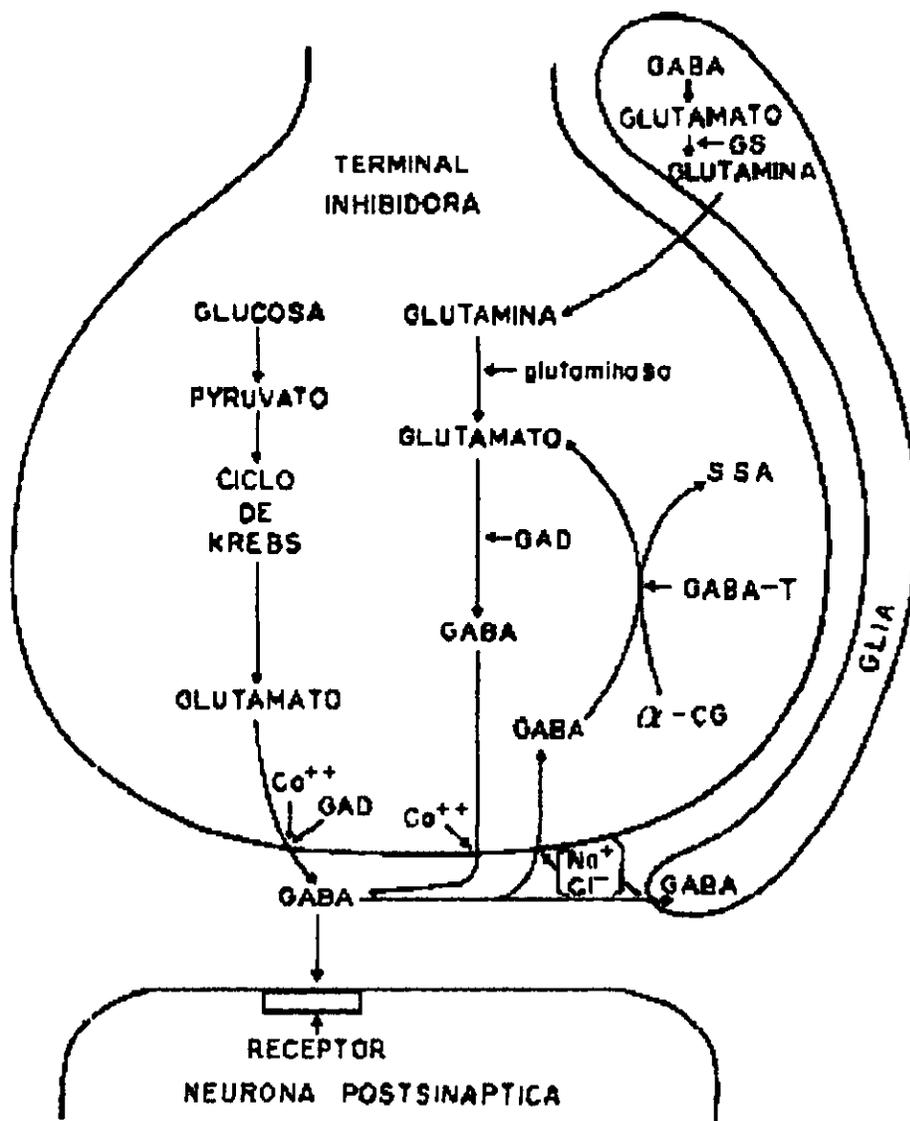


FIG. 2. Esquema neuroquímico del funcionamiento de las sinapsis GABAérgicas. Tomado de Tapia, 1991.

3.1. Receptores

Existen dos clases principales de receptores para el GABA: los receptores GABA_A los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores asociados a canal y los receptores GABA_B los cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Existe un tercer tipo de receptor llamado receptor GABA_C pero debido a su amplio parecido al receptor GABA_A se le ha considerado también como una variante de este receptor, además de presentar una localización restringida a la retina (McKernan y Whiting, 1996). Se sabe que el GABA ejerce su acción principal a través del receptor GABA_A (Iversen e Iversen, 1981).

3.1.1. Receptores GABA_A

El receptor GABA_A, es de naturaleza ionotrópica, es decir esta íntimamente asociado a un canal iónico, de tipo aniónico que permite el paso de Cl⁻. Cuando se abre el canal, entra cloro y la neurona se hiperpolariza. Las drogas que funcionan como antagonistas del receptor GABA_A son potentes agentes convulsivantes, tal es el caso de la picrotoxina (Fritschy y Möheler, 1995).

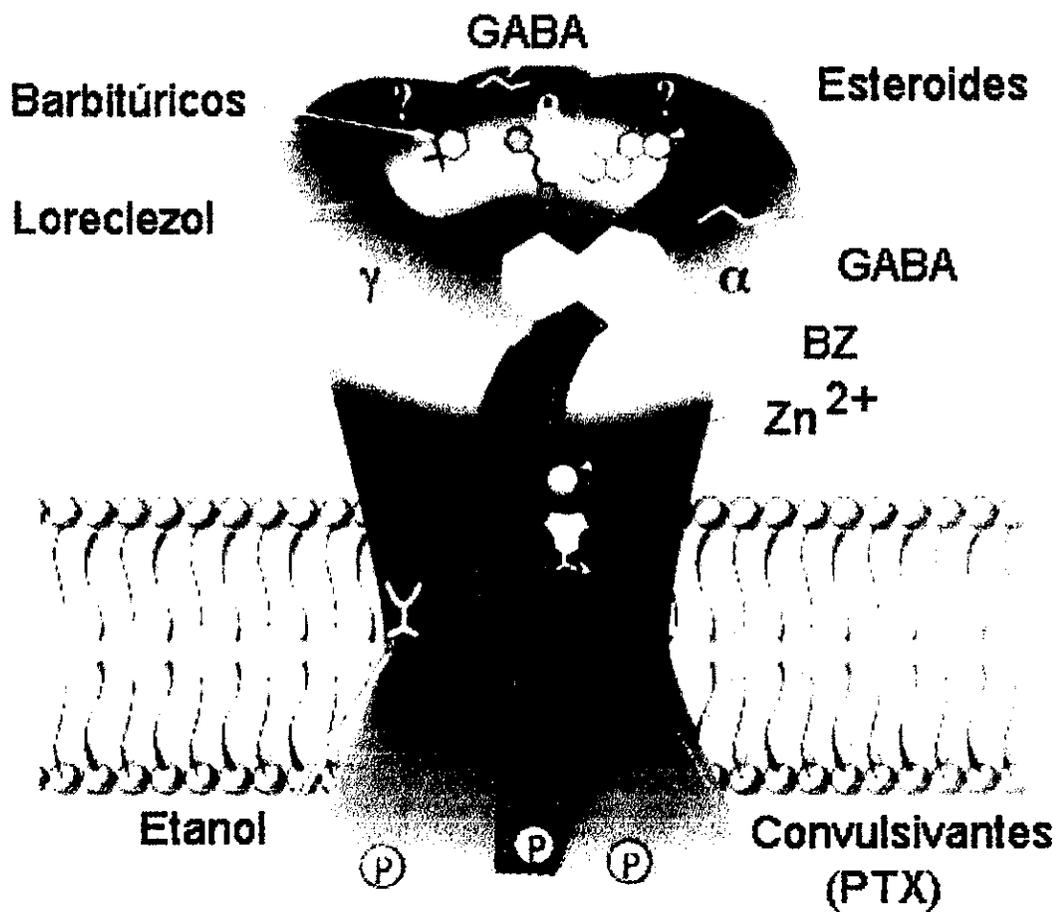


FIG. 3. Representación esquemática del receptor de GABA_A. La estructura se representa con las subunidades α y γ yuxtapuestas para formar el sitio de unión a benzodiazepinas. La subunidad β tiene se encuentra entre dos subunidades de identidad desconocida. Hasta el momento el arreglo de las 5 subunidades alrededor del poro se desconoce. Donde existe evidencia se indico los sitios de unión a GABA y a sus sitios moduladores en su respectiva subunidad. Tomada de McKernan y Whiting 1996.

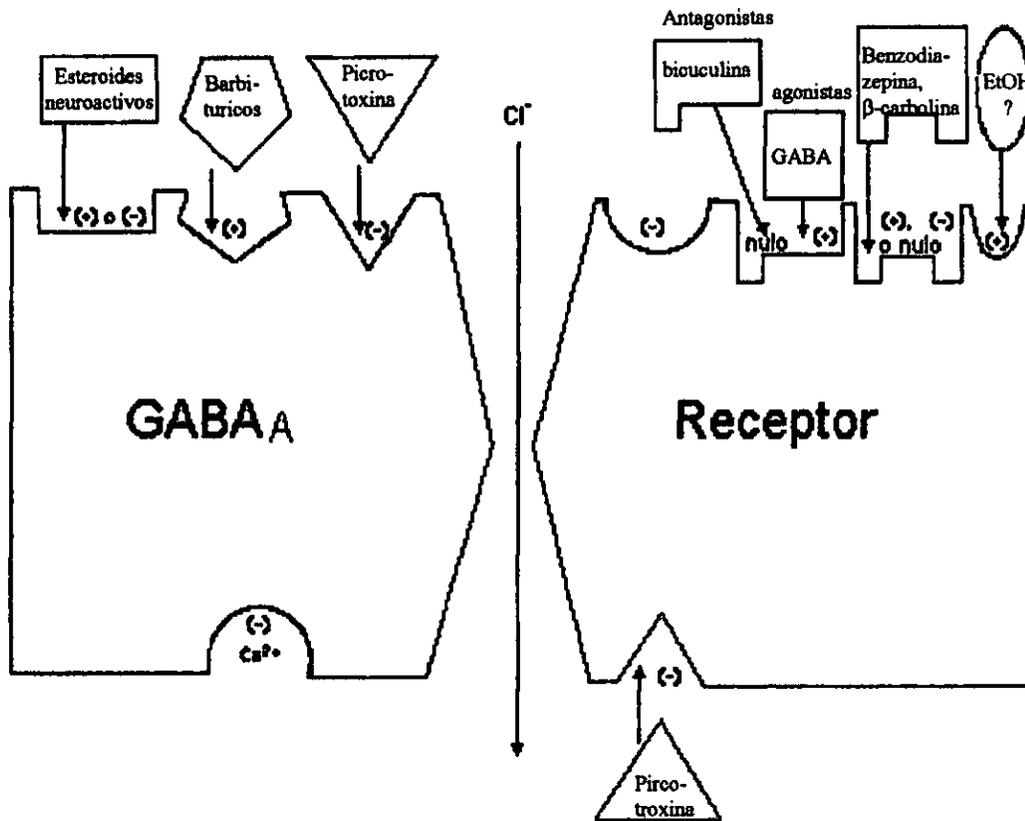


FIG. 4. Modelo de los sitios de unión a GABA.

a) Estructura y regulación del receptor GABA_A

La estructura del receptor GABA_A es pentamérica (véase fig. 3 y 4), El pentámetro se forma de la combinación diferentes subunidades, estas subunidades forman una familia basada en la similitud de sus secuencias (30-40%) de homología. Hasta el momento se conocen 6 clases de subunidades (α , β , γ , δ , ϵ y σ), con por lo menos 17 isoformas codificadas por diferentes genes (véase fig. 5), pero que guardan cierta homología (70-80%) en su secuencia de aminoácidos, con la subunidad que las nombra. Es decir, se conocen 6 diferentes isoformas de la subunidad α ; 3 isoformas de la subunidad β , se tienen 3 isoformas de la subunidad γ ; 3 isoformas de la subunidad σ , una de la subunidad ϵ y una de la subunidad δ (Macdonald y Olsen, 1994, Hevers y Lüddens, 1998).

La organización de las diferentes subunidades, que forman el receptor GABA_A determina las propiedades fisiológicas y el perfil farmacológico del receptor; es decir, si

el receptor esta compuesto sólo de las subunidades α y β se forma el canal de Cl^- , y la respuesta al GABA de este receptor es antagonizada por picrotoxina. En presencia de pentobarbital la respuesta al GABA se potencia, sin embargo, no es sensible a benzodiazepinas. Para tener la farmacología completa del receptor GABA_A , es necesaria, la presencia de una subunidad γ , además de las subunidades α y β , es así que el receptor tendrá completos sus sitios de unión a diferentes agonista y antagonistas (véase tabla 4) (McDonald et al., 1992). El loreclezol es un compuesto desarrollado para el tratamiento de la epilepsia, su componente anticonvulsivo modula la función del receptor GABA_A facilitando su respuesta inhibitoria vía un sitio modulador específico en la subunidad β (Ashton et al., 1992; Wingrove et al., 1994).

TABLA 4. Agonistas y antagonistas del receptor GABA_A

Agonistas selectivos	Muscimol, GABA
Agonistas competitivos	Bicuculina
Antagonistas no competitivos	Picrotoxina, PTZ
Bloqueador del canal	Penicilina
Agonistas del receptor a Benzodiazepinas	Diazepam, Clonazepam
Agonistas inversos del receptor	DMCM, β CCM
Agonista inverso del receptor a Benzodiazepinas	Flumazenil
Receptor a Barbitúricos	Pentobarbital, Fenobarbital
Receptor a esteroide anestésico	Alfaxalona

β CCM: β -carbolina-metil- β -carbolina-3-carboxilate. DMCM: metil-6,7-dimetoxi-4-etil-carbolina.

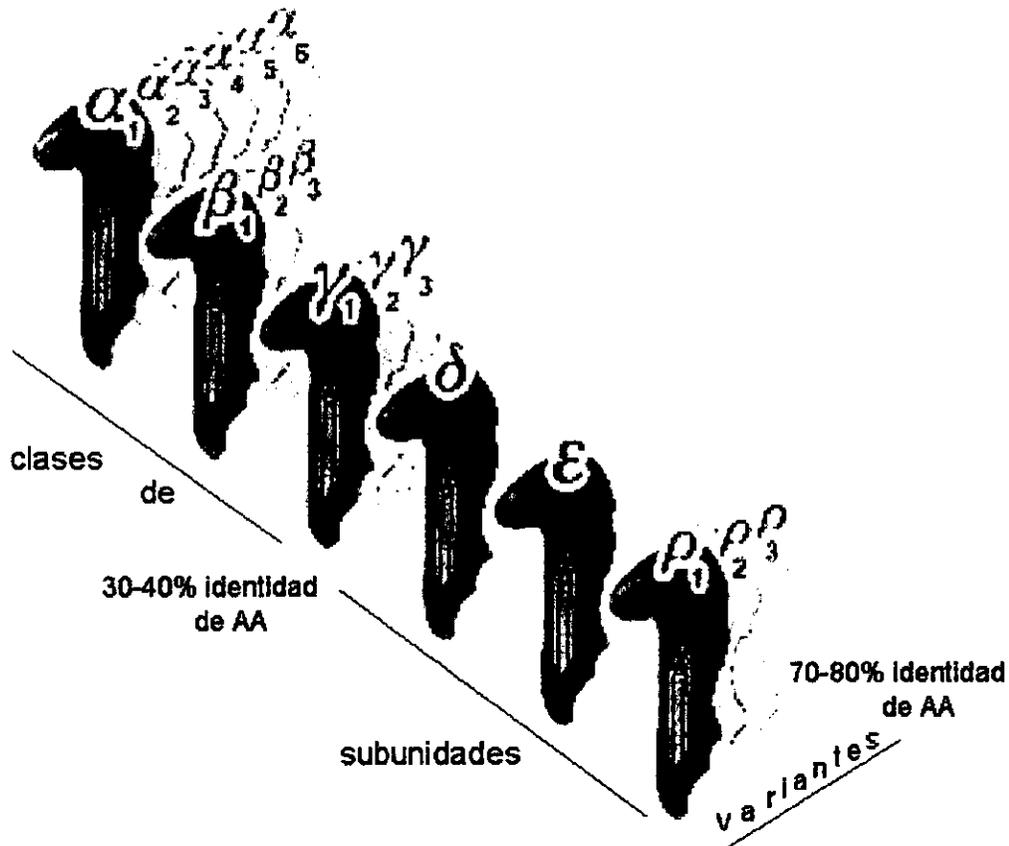


FIG. 5. Clasificación de las de subunidades del receptor GABA_A basada en la secuencia de identidad del 30 al 40% entre aminoácidos. Cada subunidad tiene una o seis variantes que comparten del 70 al 80% de identidad. La subunidad ϵ recientemente descrita al parecer ensambla con las subunidades α y β , sin embargo, no hay mucha información al respecto (Tomada de Hevers y Lüddens., 1998).

b) Estructura general de las subunidades del receptor GABA_A

Como se puede ver en la figura 6 cada una de las subunidades del receptor GABA_A presentan:

- a) una cadena peptídica larga, con el amino terminal y el carboxilo terminal extracelular;
- b) 4 dominios transmembranales nombrados (M1-M4);
- c) una asa peptídica larga intracelular, localizada entre M3 y M4; que representa más del 20% de la masa total de una subunidad típica del receptor GABA_A
- d) dos residuos de cisteína conservados, separados por 13 residuos, en esta asa larga;
- e) un sitio de fosforilación consenso en la asa citoplásmica larga;
- f) un sitio consenso para N-glucosilación en la región amino terminal (Whiting et al., 1995).

La subunidad γ_2 presenta una diversidad adicional, expresada como γ_{2S} (corto) y γ_{2L} (largo). γ_{2L} es idéntica a γ_{2S} a excepción de la adición de un octapéptido, en la asa intracelular larga, el cual tiene una secuencia de aminoácidos consenso para la fosforilación de PKC.

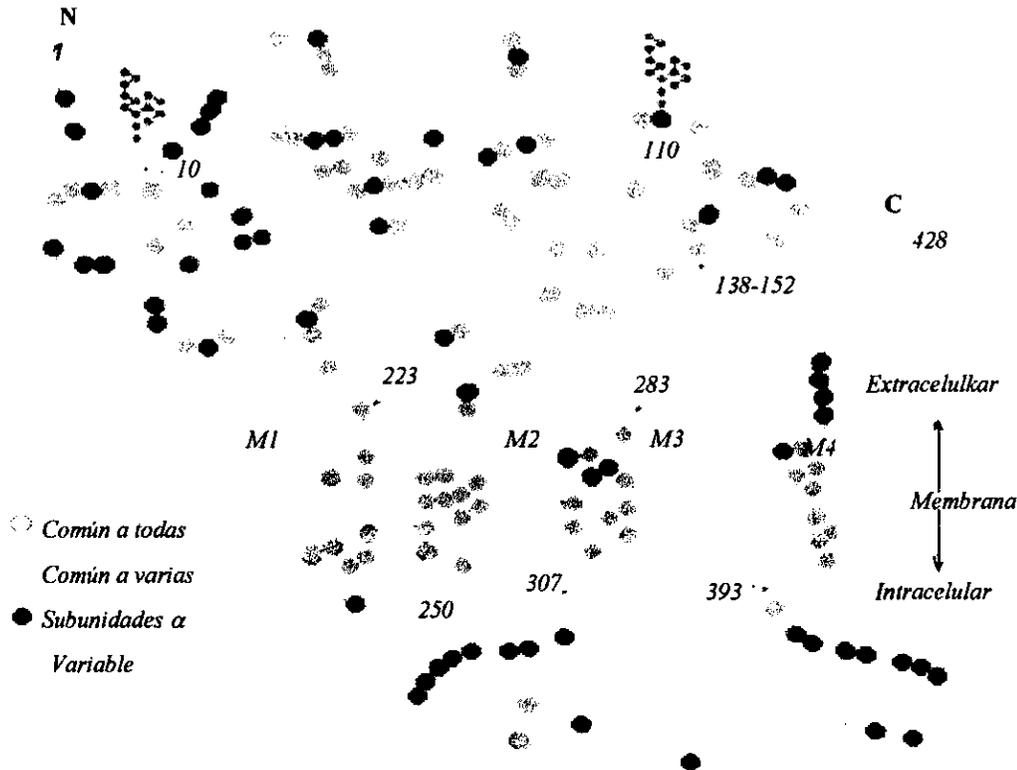


FIG. 6. Secuencia genérica de la proteína de la subunidad α_1 del receptor $GABA_A$ y su estructura topológica. La terminal amino (NH_2) representa el residuo 1; las secuencias 10 y 100 representan posibles sitios en glicosilación por asparagina; en los residuos 138 y 152 se representa un puente de cisteína conservado en todas las proteínas de las subunidades del receptor. La terminal $COOH$ localizada en el residuo 428, se encuentra al igual que la terminal amino en la región extracelular. Los aminoácidos localizados en todos los genes se representan por los puntos blancos, aquellos encontrados en dos o más tipos se representan en azul, los idénticos a todas subunidades α se encuentran en negro y los aminoácidos variables en todas subunidades están en rojo. El mayor grado de variabilidad en la familia genética se localiza en el asa citoplásmica localizada entre M3 y M4. Tomada de MacDonal y Olsen 1994.

Las diferentes subunidades del receptor $GABA_A$ tienen en común la característica de poder ser glucosiladas en los residuos de asparaginas que se encuentran orientados hacia sus extremos amino terminal (NH_2), extracelular. Este contiene 4 regiones transmembranales y 4 regiones hidrofóbicas que cruzan la membrana, que se han denominado como dominios M1, M2, M3, y M4. El dominio M2 participa en la

formación del revestimiento del canal de Cl^- . En cada subunidad se han localizado dos asas que están orientados hacia el citoplasma.

Fritschy y Möhler (1995) reportan que para que un receptor GABA_A sea completamente funcional se requiere de la coexpresión de alguna de las isoformas de las subunidades α , β y γ .

Como se puede ver, los receptores GABA_A son altamente heterogéneos. Su heterogeneidad se debe principalmente a la existencia de tantas combinaciones de subunidades, que como se ha visto presentan una distribución diferencial en tipos celulares y en regiones cerebrales; estas características se asocian a respuestas diferenciales ante ligandos tales como agonistas, antagonistas; agonistas inversos a benzodiazepinas, esteroides, barbitúricos, etanol y bloqueadores del canal de Cl^- . La diferente combinación de subunidades también lleva a una diversidad en las propiedades del canal de Cl^- (tales como subconductancia y diferentes tiempos de apertura), así como la interacción alostérica entre subunidades y la eficacia en la transducción de la señal entre la unión al ligando y la apertura del canal de Cl^- .

c) Distribución de las subunidades del receptor GABA_A

Estudios de inmunoreactividad revelan una extraordinaria heterogeneidad en la distribución de las subunidades del receptor GABA_A como se ve en los cambios bien marcados en la inmunoreactividad entre una bien definida citoarquitectura y otra; en las pronunciadas diferencias en la distribución celular de las subunidades entre varios tipos de neuronas (véase tablas 5 y 6), esto es, neuronas funcional y farmacológicamente diferentes se caracterizan por un repertorio de subunidades del receptor GABA_A (Fritschy y Möhler, 1995).

TABLA 5. Muestra la combinación de receptores GABA_A encontrada en cada estructura cerebral por inmunocitoquímica.

Población neuronal	Subunidades localizadas
Cerebelo -células de Purkinje -células granulares -células de Golgi tipo II	$\alpha 1/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 1/\beta 2,3/\gamma 2/\delta$ $\alpha 2/\alpha 3/\gamma 2$
Corteza cerebral interneuronas	$\alpha 1/\beta 2,3/\gamma 2/\delta$
Bulbo olfatorio -células de axón corto -células periglomerulares -células mitrales y empenachadas -células granulares	$\alpha 1/\alpha 2/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 2/\alpha 5/\delta$ $\alpha 1/\alpha 3/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 2/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 3/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 5/\beta 2,3/\gamma 2$
Hipocampo -células piramidales -interneuronas	$\alpha 2/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 5/\beta 2,3/\gamma 2$ $\alpha 1/\beta 2,3/\gamma 2/\delta$
Amígdala núcleo amigdalino central núcleo basolateral/basomedial	$\alpha 2/\alpha 3/\beta 2,3/\gamma 2/$ $\alpha 2/\alpha 3/\beta 2,3/\gamma 2/$

Por inmunocitoquímica, (adaptada de Fritschy y Möhler, 1995).

Sin embargo, se sabe poco acerca de la composición completa de las subunidades del receptor GABA_A nativo expresado en las diferentes regiones cerebrales y los diferentes tipos celulares ya que los estudios de las combinaciones de subunidades del receptor GABA_A se realizan principalmente en sistemas heterólogos como son: óocitos de *xenopus laevis* y cultivos celulares de mamíferos e insectos.

Los resultados de estudios de hibridación *in situ* confirman la heterogeneidad del receptor ya que la expresión de los RNAm de las subunidades varía en cada región cerebral y en cada tipo celular. Algunas regiones expresan gran cantidad de RNAm de subunidades como es el caso de las células granulares del giro dentado, el cual expresa toda la variedad de RNAm de subunidades del receptor GABA_A a excepción de la subunidad $\alpha 6$. Sin embargo, la expresión de los RNAm de las subunidades no garantiza

su transcripción a péptido ni tampoco su ensamble en un receptor GABA_A maduro. Otra limitación de estos estudios es que revelan, por ejemplo que, las células granulares de cerebelo expresan $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\gamma 2$, y δ , pero no se puede saber la localización exacta de estas subunidades en cada célula granular, es decir si todas las células expresan todas las subunidades o si esta distribución varía en cada célula granular (De Blas, 1996).

Tabla 6. Muestra los RNAm del receptor GABA_A detectados en diferentes estructuras cerebrales:

Tipo celular	RNAm
Cerebelo células estrelladas/encanasta células de Purkinje células granulares	$\alpha 1$, ($\alpha 3$), $\beta 2$, $\gamma 2$ $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ $\alpha 1$, ($\alpha 4$), $\alpha 6$, ($\beta 1$), $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$, ($\gamma 3$), δ
Bulbo Olfatorio células mitrales células empenachadas células de axón corto células granulares internas células periglomerulares	$\alpha 1$, ($\alpha 3$), $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ $\alpha 1$, ($\alpha 2$, $\alpha 3$), $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ $\alpha 1$, $\beta 2$ $\alpha 2$, ($\alpha 3$), $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 3$, δ , ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$), $\beta 2$, $\beta 3$, ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, δ)
Corteza cerebral capas I-II capa IV capas V-VI	$\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, ($\alpha 5$), ($\beta 1$), $\beta 2$, $\beta 3$, ($\gamma 1$), $\gamma 2$, $\gamma 3$, δ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, ($\alpha 5$), ($\beta 1$), $\beta 2$, $\beta 3$, ($\gamma 1$), $\gamma 2$, $\gamma 3$, (δ) $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, ($\gamma 1$), $\gamma 2$, $\gamma 3$, (δ)
Hipocampo CA1 células piramidales CA3 células piramidales Giro Dentado células granulares	$\alpha 1$, $\alpha 2$, ($\alpha 3$), $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, ($\gamma 3$, δ) $\alpha 1$, $\alpha 2$, ($\alpha 3$), $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, ($\gamma 3$, δ) $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, ($\gamma 3$), δ
Amígdala núcleo amígdalino central núcleo amígdalino medial núcleo amígdalino lateral	($\alpha 1$), $\alpha 2$, ($\alpha 3$), ($\alpha 4$), $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, ($\gamma 3$) ($\alpha 1$), $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, ($\alpha 5$), $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, ($\gamma 1$), $\gamma 2$, ($\gamma 3$)

Las subunidades entre paréntesis presentaron menor marca.

Adaptada de Laurie et al., 1992; Wisden et al. 1992).

La subunidad ϵ descrita recientemente parece encontrarse coensamblada con las subunidades α y β sin embargo, aún no se tiene suficiente información de su exacta localización (Hevers y Lüddens, 1998).

Experimentos recientes utilizando la reacción en cadena de la polimerasa conocida generalmente como PCR y mediciones electrofisiológicas indican que diferentes combinaciones de subunidades pueden localizarse en una sola célula formando diferentes receptores GABA_A.

De Blas (1996) estudió las diferentes combinaciones de subunidades de receptor GABA_A nativo cerebelar, encontrando que muchas de estas combinaciones nativas no pueden ser reproducidas *in vitro*.

d) Fosforilación del receptor GABA_A

El asa principal que conecta a los dominios M3, y M4 de todas las subunidades contiene algunos residuos de serinas que pueden ser fosforilados por cinasas de proteínas (Las cinasas se pueden clasificar de acuerdo al aminoácido al cual estas enzimas unen covalentemente el grupo fosfato: se conocen las cinasas de proteínas de serina, treonina o tirosina). La mayoría de las fosforilaciones de proteínas ocurre en residuos de serina (más del 95%), una pequeña cantidad sobre residuos de treonina (3 al 4%) y muy poca (menos del 1%) en residuos de tirosina (Nestler y Greengard, 1994).

La fosforilación neurotransmisores es un mecanismo común en la regulación de la función receptores. En esta reacción las cinasas de proteínas catalizan la transferencia de una molécula de fosfato del ATP a residuos de serina, treonina o tirosina de un receptor; esta transferencia puede modificar la carga y/o conformación del receptor y regular su función. La fosforilación de un receptor es reversible por la actividad de proteínas fosfatasa, puede ocurrir rápidamente o puede resultar en un cambio prolongado en la función del receptor. Esta modificación podría jugar un papel importante en los cambios a corto y largo plazo en la transmisión sináptica (Raymon et al., 1993).

Al igual que las otras familias de receptores asociados a canal, la función del receptor GABA_A puede ser modulada por reacciones de fosforilación. Un análisis de las secuencias de las subunidades del receptor revela que en la asa peptídica intracelular larga se localizan sitios consenso para la fosforilación de proteína cinasa A (PKA), en las siguientes subunidades: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, y $\gamma 3$. Por otra parte la proteína cinasa C (PKC) tiene sitios consenso en todas las subunidades, así mismo para tirosina

cinasa existen sitios susceptibles a fosforilación en las subunidades: $\gamma 1$, $\gamma 2$, y $\gamma 3$ de células humanas (Stelzer et al., 1988).

Todas las subunidades γ tienen sitios consenso de fosforilación de cinasas de tirosina (véase tabla 7). Un péptido sintético que contiene la secuencia de $\gamma 2L$ Ser343 puede ser fosforilado por la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaM KII), así como por la PKC (Machu et al., 1996).

TABLA 7. Sitios consenso conservado para la fosforilación del receptor GABA_A.

Subunidad	Secuencia consenso	Cinasa
$\beta 1$	405 RRRAS _S QLK 412	PKA, CaM KII, PKG, PKC
$\beta 2$	406 RRRAS _S QLK 413	PKA, CaM KII, PKG, PKC
$\beta 3$	405 RRRSS _S QLK 312	PKA, CaM KII, PKG, PKC
$\gamma 1$	369 EDDYGYQC 377	PDGF receptor
$\gamma 2L/\gamma 2S$	324 RKP _S SKDKD 341	PKA, PKC, CaM KII
$\gamma 2L/\gamma 2S$	345 IRPR _S SATI 351	PKA, CaM KII, PKG
$\gamma 2L/\gamma 2S$	362 DEEYGYCE 369	PDGF receptor
$\gamma 2L$	348 LLRMF _S SFK 345	PKA, PKC, CaM KII
$\gamma 3$	330 RKPTIRKK 338	PKA, PKC, PKG, CaM KII
$\alpha 6$	KKRIS _S SLT	PKA, PKG, CaM KII

Sitios de fosforilación consenso conservado en el dominio intracelular de receptores GABA_A en murinos, ratas, bovinos y humanos. Los sitios de fosforilación serina, treonina o tirosina supuestos están subrayados (Leidenheimer, 1996).

e) Cambios en la expresión del receptor GABA_A

La expresión de las subunidades del receptor GABA_A se puede modificar de forma selectiva y este puede ser un importante mecanismo que participe en ciertas afecciones neurológicas. Después de 6 y 12 horas de la administración de ácido kaínico se presenta en hipocampo un decremento del 25-50% en la expresión del RNAm de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y δ , y un incremento (50%) en la expresión de RNAm de las subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ (Tsunashima et al., 1997).

Sin embargo, las modificaciones en la expresión de los RNAm no es irreversible, ya que después de 7 y 30 días de la administración de ácido kaínico los RNAm de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ recobraron sus valores control, mientras que las demás subunidades que permanecieron modificadas (Tsunashima et al., 1997).

Estos datos sugieren un cambio rápido en la expresión de los RNAm que codifican para diferentes subunidades del receptor GABA_A en ciertas áreas del hipocampo seguido por un aumento permanente en los mensajeros que codifican para diversas subunidades del receptor, indicando un cambio en la inhibición GABAérgica de larga duración

Por otra parte se ha observado que después del tratamiento crónico con diazepam (3 semanas), se presenta una modificación en la expresión de los RNAm de las subunidades del receptor GABA_A al igual que con ácido kaínico, siendo esta modificación diferencial en cada estructura del SNC. Estos cambios indican que el receptor presenta una respuesta adaptativa a la exposición crónica a diazepam y que estos cambios son reversibles ya que 48 horas después del tratamiento con diazepam los niveles de los RNAm recuperan sus valores control (Wu et al., 1994).

En otro estudio (Impagnatiello et al., 1996) se administró diazepam en forma oral por 14 días, después de los cuales se encontró que la corteza motora es la estructura que presenta más cambios observándose en la expresión del RNAm de la subunidad $\alpha 1$ del 42% y de las subunidades $\gamma 2S$ y $\gamma 2L$ del 42% y 20% respectivamente, mientras que la subunidad $\alpha 5$ presenta un aumento del 30%. En hipocampo solo la subunidad $\alpha 1$ presentó una reducción del 20%, mientras que estructuras como estriado, bulbo olfatorio, cerebelo o corteza somatosensorial no presentaron cambios significativos, y en las estructuras que cambio la expresión de los RNAm estos retornaron a sus valores control después de 72 horas.

Efectos similares se pueden ver en estudios de inmunoreactividad en hipocampo, después de 2 y 7 días de la inyección de ácido kaínico se encontró un decremento en la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y $\gamma 4$ del receptor GABA_A en CA1 mientras que CA3 mostró un incremento en la expresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y δ (Schwarzer et al., 1997).

3.1.2. Receptores GABA_B

El receptor GABA_B pertenece a la superfamilia receptores acoplados a proteínas G, los receptores GABA_B activan al menos 4 diferentes mecanismos: inhibición de la

adenilato ciclasa, estimulación de la fosfolipasa A (la cual potencia la formación de AMPc por otros sistemas receptores, por la vía del ácido araquidónico), incrementa la conductancia de la membrana a K⁺ (activación de un canal de K⁺) e inhibición de la conductancia de los canales de Ca²⁺ voltaje dependiente de membrana. Todas estas respuestas están mediadas a través del acoplamiento de las proteínas G sensibles a toxina pertusis (Feldman et al., 1997).

3.2. GABA y epilepsia.

Desde el punto de vista de la transmisión sináptica, la epilepsia ha sido considerada tanto como un trastorno de la inhibición (por deficiencia), como de la excitación (por exceso); sin embargo, la complejidad de la epilepsia incluye ambos sistemas. En el ámbito de los neurotransmisores inhibidores, GABA, tiene un papel primordial en el fenómeno paroxístico; la disminución de este aminoácido a nivel de los receptores o de su síntesis se halla asociada a la presencia de focos epileptogénicos o convulsiones.

4.- Estructuras cerebrales relacionadas con la epilepsia: corteza, bulbo olfatorio, cerebelo, amígdala e hipocampo.

Corteza cerebral:

La corteza cerebral en mamíferos es la estructura más grande del cerebro, es conocida también como neocorteza que indica es la estructura más reciente en la escala evolutiva, esta formada por seis capas celulares que se pueden apreciar en todos los mamíferos. La capa I no tiene células piramidales o estrelladas y en general casi no contiene neuronas. La capa IV es la única que tiene células estrelladas y estas constituyen el 75% de las neuronas totales en esta capa. En las capas restantes las células piramidales constituyen el 70-80% de la población. Las neuronas lisas (smooth) se distribuyen proporcionalmente de la capa II a la VI y constituyen el 20% de las células (Gabbott y Somogyi, 1986).

En las diferentes capas de la neocorteza el receptor GABA_A (sitios de unión a muscimol H³) presenta un patrón de distribución muy similar a encontrado en los sitios

adenilato ciclasa, estimulación de la fosfolipasa A (la cual potencia la formación de AMPc por otros sistemas receptores, por la vía del ácido araquidónico), incrementa la conductancia de la membrana a K⁺ (activación de un canal de K⁺) e inhibición de la conductancia de los canales de Ca²⁺ voltaje dependiente de membrana. Todas estas respuestas están mediadas a través del acoplamiento de las proteínas G sensibles a toxina pertusis (Feldman et al., 1997).

3.2. GABA y epilepsia.

Desde el punto de vista de la transmisión sináptica, la epilepsia ha sido considerada tanto como un trastorno de la inhibición (por deficiencia), como de la excitación (por exceso); sin embargo, la complejidad de la epilepsia incluye ambos sistemas. En el ámbito de los neurotransmisores inhibidores, GABA, tiene un papel primordial en el fenómeno paroxístico; la disminución de este aminoácido a nivel de los receptores o de su síntesis se halla asociada a la presencia de focos epileptogénicos o convulsiones.

4.- Estructuras cerebrales relacionadas con la epilepsia: corteza, bulbo olfatorio, cerebelo, amígdala e hipocampo.

Corteza cerebral:

La corteza cerebral en mamíferos es la estructura más grande del cerebro, es conocida también como neocorteza que indica es la estructura más reciente en la escala evolutiva, esta formada por seis capas celulares que se pueden apreciar en todos los mamíferos. La capa I no tiene células piramidales o estrelladas y en general casi no contiene neuronas. La capa IV es la única que tiene células estrelladas y estas constituyen el 75% de las neuronas totales en esta capa. En las capas restantes las células piramidales constituyen el 70-80% de la población. Las neuronas lisas (smooth) se distribuyen proporcionalmente de la capa II a la VI y constituyen el 20% de las células (Gabbott y Somogyi, 1986).

En las diferentes capas de la neocorteza el receptor GABA_A (sitios de unión a muscimol H³) presenta un patrón de distribución muy similar a encontrado en los sitios

de unión a L-glutamato, esto es presentan mayor densidad en las capas II y III. La co-distribución de los receptores GABA_A y los sitios de unión a L-glutamato es un rasgo constante encontrado tanto en cerebros humanos como cerebros de rata y esta co-distribución podría reflejar un requerimiento funcional básico de las estructuras distribuidas de forma similar permitiendo así la excitación y la inhibición neuronal (Zilles y Wree, 1995).

Bulbo Olfatorio:

En la ontogenia de las modalidades sensoriales el sistema olfatorio es uno de los primeros en aparecer antes que el visual o el auditivo.

La información de las moléculas odoríferas la traducen las neuronas olfatorias receptoras (ORN), estas neuronas de primer orden se localizan en el epitelio olfatorio dentro de la cavidad nasal. Los axones de las ORN se extienden al nervio olfatorio para terminar sinápticamente en el bulbo olfatorio (BO). El BO tiene dos neuronas de salida, las células mitrales y las células empenachadas, las cuales llevan la información olfatoria a estructuras olfatorias de alto orden y a otros sistemas cerebrales; en estas sinapsis el principal neurotransmisor liberado es el GABA. El relevo de la nariz a las células mitrales y empenachadas esta fuertemente regulado por circuiteria intrabulbar local y por entradas del BO que vienen de otras partes del cerebro. Estructuras olfatorias de alto orden envían sus blancos a las células mitrales y empenachadas, entre estas estructuras se encuentran: el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, la corteza entorrinal y algunos núcleos amigdalinos (Shipley et al., 1995).

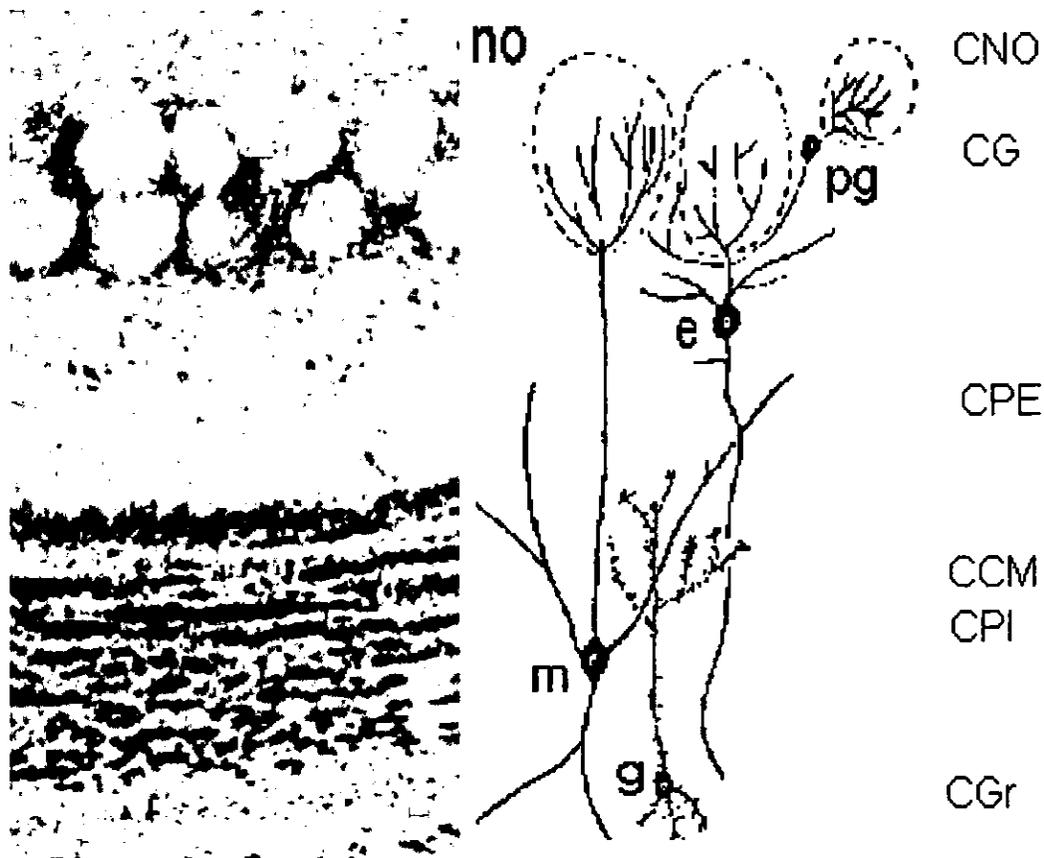


FIG: 7. Corte histológico del bulbo olfatorio principal de rata y esquema de la distribución celular en las diferentes capas celulares, correspondientes al corte histológico. CNO, capa de los nervios olfatorios; CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CCM, capa de las células mitrales; CPI, capa plexiforme interna; CGr, capa granulosa. no, nervio olfatorio; pg, célula periglomerular; e, célula empenachada; m, célula mitral y g, célula granulosa.

El BO es una extensión del cerebro anterior recibe todas las entradas de las neuronas sensoriales olfatorias y envía sus eferencias directamente a la corteza olfatoria. El bulbo tiene estructuras laminares distintas, conteniendo diferentes tipos celulares. Los axones del BO se agrupan en racimos, llegan a regiones del neuropilo llamadas glomérulos y así entran a la superficie del bulbo. La formación de glomérulos olfatorios es uno de los más claros ejemplos en el cerebro del agrupamiento de elementos neuronales y sinapsis (Shepherd y Greer, 1990).

Un rasgo notable de las neuronas sensoriales del BO es que continuamente se están reemplazando por nuevas células en el epitelio durante toda la vida adulta. La especificidad de las conexiones sinápticas en los glomérulos se llevan a cabo a pesar del constante remodelamiento debido al intercambio de terminales sensoriales. Este es uno

de los pocos ejemplos de la génesis de neuronas que forman conexiones sinápticas en el sistema nervioso central en mamíferos adultos, sin embargo, las bases moleculares de esta propiedad permanecen desconocidas (Shepherd y Greer, 1990).

Además BO es una estructura en la que se puede inducir epilepsia por medio de una microinyección de ácido kaínico (Araki et al., 1995), es una de las estructuras que responden más rápido en el modelo de kindling, y en ambos modelos la epilepsia producida es muy similar a la que se genera en hipocampo y amígdala.

Se sabe que las células periglomerulares y granulares, así como sus dendritas contienen la GAD, enzima que sintetiza GABA. (Ribak et al., 1977). Además en las sinapsis dendrodendríticas de las células granulares, mitrales y empenachadas el neurotransmisor liberado es el GABA (Shepherd y Greer, 1990).

El BO esta conectado con las estructuras límbicas. El BO proyecta a la corteza piriforme, la amígdala, el núcleo olfatorio anterior, hipocampo y a la corteza entorrinal. Estas estructuras componen la red compleja del sistema límbico (Araki et al., 1995).

Amígdala:

El término amígdala se origina de la palabra griega almendra, debido a la su forma oval. El complejo amigdalino ocupa un lugar importante en el Sistema Nervioso Central debido a su participación en la modulación de las funciones endocrinas, mecanismos efectores viscerales y patrones complejos de conducta integral tales como, defensa, ingestión, agresión, reproducción y aprendizaje.

Tradicionalmente la amígdala se ha dividido en los grupos corticomedia y basolateral. Sin embargo, con base en la citoquímica y la conectividad la amígdala se ha dividido en amígdala olfatoria, grupo amigdalino medial, grupo amigdalino basolateral y grupo amigdalino central (De Olmos et al., 1985).

La amígdala olfatoria se caracteriza por tener entradas directas del bulbo olfatorio y conexiones recíprocas con otras áreas que reciben entradas olfatorias. Además de aferentes del bulbo olfatorio principal, todos los núcleos de la amígdala olfatoria reciben aferentes de la corteza piriforme, corteza entorrinal, locus coeruleus y núcleo del rafe.

Todos los núcleos del grupo amigdalino medial tienen los mayores eferentes, con proyecciones hacia diversos blancos extra-hipotalámicos, tálamo medio-dorsal, núcleo peripeduncular y a blancos en la formación reticular y tegmental (De Olmos et al., 1985).

El complejo amigdalino basolateral se distingue por tener un gran número de conexiones recíprocas con la corteza así como con las eferentes del estriado. Todos los núcleos de este grupo amigdalino reciben aferentes de la corteza piriforme, corteza insular, y corteza prefrontal. Mientras que solo el núcleo basolateral tiene proyecciones que regresan a la corteza piriforme, todos los núcleos del grupo amigdalino basolateral tienen proyecciones que regresan a la corteza insular agranular y a la corteza prefrontal. Todos los núcleos del grupo amigdalino basolateral proyectan a la corteza entorrinal (De Olmos et al., 1985).

El grupo amigdalino central está compuesto principalmente del núcleo amigdalino central, su extensión con la sustancia innominata sublenticular y la división lateral de núcleo de la base de la estría terminal. El grupo amigdalino central recibe una gran variedad de aferentes corticales que nos son recíprocas (De Olmos et al., 1985).

La amígdala y los sitios más relacionados con esta, responden más rápido y de forma más efectiva al kindling que otras estructuras (Goddard et al., 1969).

Hipocampo:

Su nombre se origina del griego (*hippo*=caballo, *Kampus*=monstruo marino) por su parecido al caballito de mar. El hipocampo es una estructura cilíndrica cuyo eje longitudinal forma un semicírculo alrededor del tálamo. El hipocampo puede dividirse en cuatro regiones llamadas CA1, CA2, CA3 y CA4 (su nombre deriva del Latín *Cornu Ammon* o cuerno de Ammon). Por su parte Cajal lo divide en región superior y región inferior. El giro dentado, el subiculum y la corteza entorrinal integran la formación hipocámpal o región hipocámpal. CA1 y CA3 constituyen la mayoría del hipocampo, CA2 es una región pequeña y no se encuentra en algunas especies por lo que es ignorada. El área entre el giro dentado y el estrato granuloso de CA3 se llama la región hilar, polimórfica o hilus (Brown y Zador, 1990).

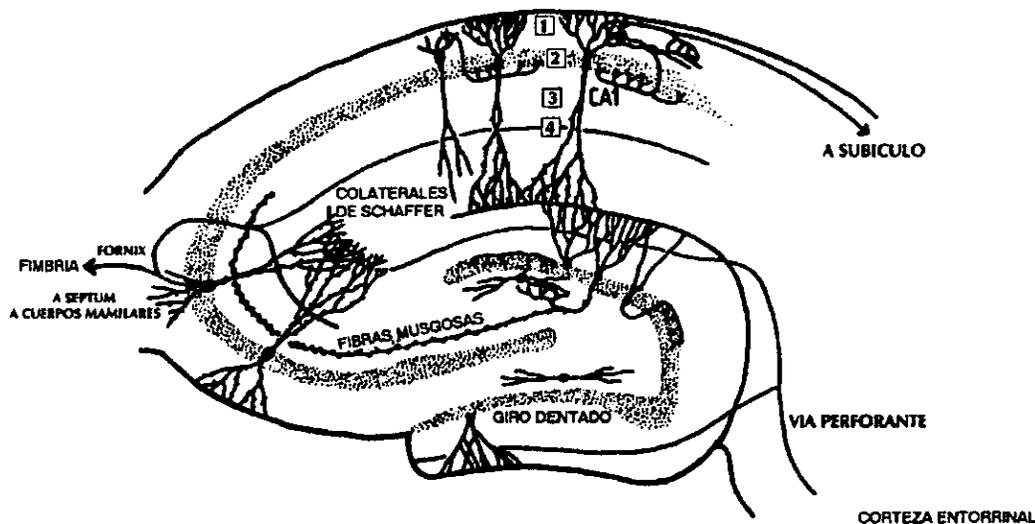


FIG: 8. Esquema de la distribución celular en el hipocampo. Los números indican las diferentes capas celulares.

Algunas de las principales vías del hipocampo son: la vía perforante, originada en la corteza entorrinal; las fibras musgosas que conectan a las células granulares del giro dentado con las células piramidales de CA3; las colaterales de Shaffer, donde los axones de las células piramidales de CA3 hacen sinapsis con las células piramidales de CA1; las conexiones comisurales. Las conexiones excitatorias recurrentes entre las células piramidales de CA3 y de CA1; Circuito inhibitorio, las células inhibitorias excitadas por células piramidales colaterales locales o por fibras aferentes o ambas (Traub y Miles, 1991), (Véase fig. 8).

El GABA es el principal neurotransmisor liberado por interneuronas inhibitorias en el soma y dendritas de las células piramidales y granulares. La acción del GABA depende de la clase de receptor postsináptico con el que interactúe (Janigro y Shwartzkroin, 1988).

El hipocampo se asocia comúnmente a la epilepsia del lóbulo temporal, es además en esta estructura y en la amígdala donde se ha estudiado ampliamente el kindling.

Cerebelo:

El cerebelo es una región distinta del cerebro, su nombre deriva del diminutivo de la palabra *cerebrum*. Para los primeros anatomistas el cerebelo era otro cerebro pequeño.

El cerebelo ha tenido una enorme elaboración a través de la evolución, más que cualquier otra región del S.N.C. incluido el cerebro. El cerebelo ha conservado su estructura neuronal inicial casi invariable a través de la evolución en vertebrados, esto es lo que cambio fue su tamaño no sus interacciones (Llinás y Walton, 1990).

La corteza cerebelar esta constituida de 4 tipos neuronales principalmente: células granulares, células de Purkinje y dos tipos de interneuronas inhibitoras, las células de Golgi y las células estrelladas/células de canasta. La corteza recibe tres aferentes cerebelares adicionales: las fibras musgosas, las fibras trepadoras, que son excitadoras; y las aferentes colinérgicas y monoaminérgicas difusamente organizadas (Voogd y Glickeitein, 1998).

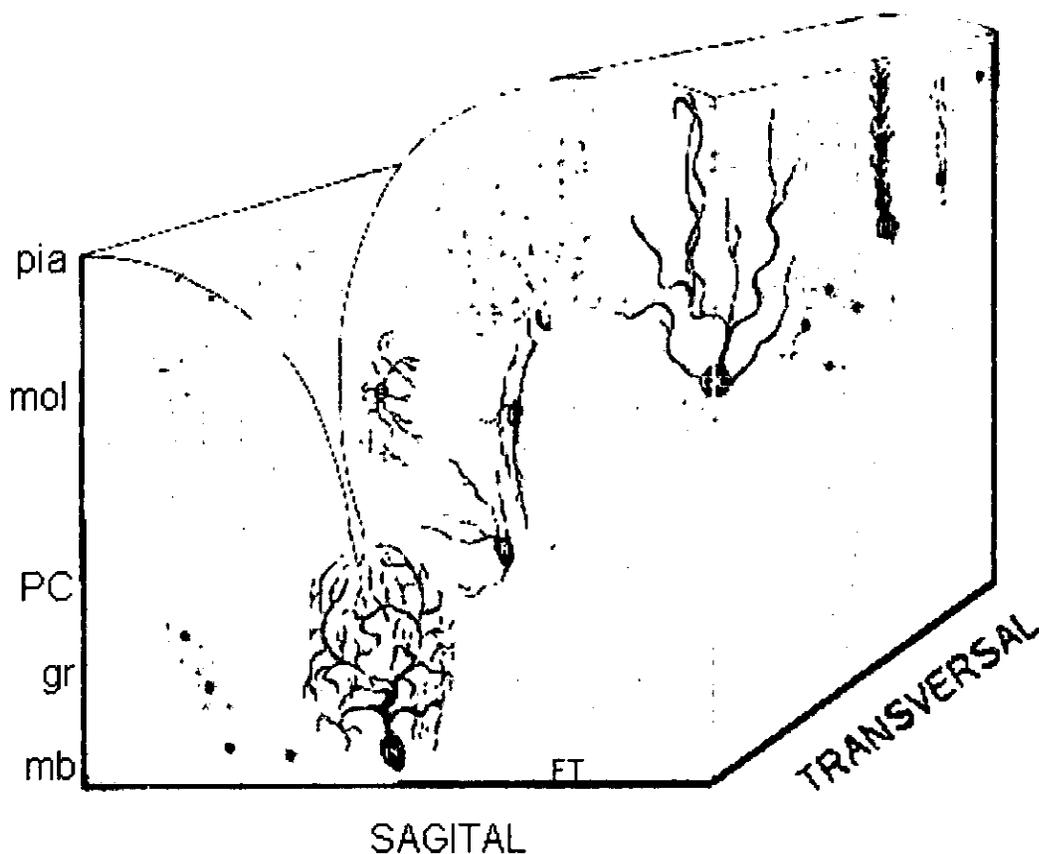


FIG: 9. Esquema de la distribución celular en cerebelo, muestra dos vistas: un corte transversal y un sagital. mol: capa molecular, PC: capa de las células de Purkinje; gr: células gromerulares: Ft: fibras trepadoras.

Las células granulares son pequeñas, estas neuronas glutamatergicas son las más numerosas en cerebelo y el cerebro en total. Las células de Purkinje son grandes

neuronas GABAérgicas, las cuales son la única salida de la corteza cerebelar, sus axones mielinizados hacen contacto con neuronas del núcleo cerebelar y ciertos núcleos del cerebro anterior. Las células de Golgi permiten la comunicación retrógrada (feed-backward) inhibición a las células granulares (Véase fig. 9). La colocación de GABA y glicina y las diferencias en su localización, morfología y sus características neuroquímicas distingue las células de Golgi de las células estrelladas/células de canasta, las cuales son únicamente interneuronas GABAérgicas localizadas en la capa molecular, por lo que esta capa permite la inhibición de las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998).

5.- El síndrome de abstinencia al GABA (SAG)

5.1. Introducción al SAG

El síndrome de abstinencia al GABA (SAG), es un modelo de actividad epiléptica focal el cual se caracteriza por signos electroclínicos de epilepsia como consecuencia de la suspensión de la infusión intracerebral de GABA en animales que han recibido el aminoácido de forma crónica. Este fenómeno se observó inicialmente en mandriles *papio papio* que son genéticamente fotosensibles y posteriormente en ratas epilépticas, donde se mostró que la interrupción de la infusión intracortical crónica (7 días) de GABA, se asocia a un estado de hiperexcitabilidad cerebral caracterizado por la presencia de descargas paroxísticas originadas en el área infundida. (Brailowsky et al., 1987; 1988; 1991; Fukuda et al., 1987).

Se ha podido inducir el SAG, después de infusiones unilaterales de GABA, a nivel de la corteza cerebral en ratas *in vivo* (Brailowsky 1987; 1988; 1991), e hipocampo *in vitro* (García Ugalde et al, 1992). También se ha podido producir SAG en estructuras del sistema límbico (amígdala e hipocampo). Sin embargo, el SAG que se produjo en estas estructuras (infusiones de GABA de 100µg/µl con un flujo de µl/h) no duró más de 10 horas, además la actividad paroxística se limitó al área de infusión sin propagarse contralateralmente o a otras estructuras(Le Gal La Salle et al., 1988).

neuronas GABAérgicas, las cuales son la única salida de la corteza cerebelar, sus axones mielinizados hacen contacto con neuronas del núcleo cerebelar y ciertos núcleos del cerebro anterior. Las células de Golgi permiten la comunicación retrógrada (feed-backward) inhibición a las células granulares (Véase fig. 9). La colocación de GABA y glicina y las diferencias en su localización, morfología y sus características neuroquímicas distingue las células de Golgi de las células estrelladas/células de canasta, las cuales son únicamente interneuronas GABAérgicas localizadas en la capa molecular, por lo que esta capa permite la inhibición de las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998).

5.- El síndrome de abstinencia al GABA (SAG)

5.1. Introducción al SAG

El síndrome de abstinencia al GABA (SAG), es un modelo de actividad epiléptica focal el cual se caracteriza por signos electroclínicos de epilepsia como consecuencia de la suspensión de la infusión intracerebral de GABA en animales que han recibido el aminoácido de forma crónica. Este fenómeno se observó inicialmente en mandriles *papio papio* que son genéticamente fotosensibles y posteriormente en ratas epilépticas, donde se mostró que la interrupción de la infusión intracortical crónica (7 días) de GABA, se asocia a un estado de hiperexcitabilidad cerebral caracterizado por la presencia de descargas paroxísticas originadas en el área infundida. (Brailowsky et al., 1987; 1988; 1991; Fukuda et al., 1987).

Se ha podido inducir el SAG, después de infusiones unilaterales de GABA, a nivel de la corteza cerebral en ratas *in vivo* (Brailowsky 1987; 1988; 1991), e hipocampo *in vitro* (García Ugalde et al, 1992). También se ha podido producir SAG en estructuras del sistema límbico (amígdala e hipocampo). Sin embargo, el SAG que se produjo en estas estructuras (infusiones de GABA de 100µg/µl con un flujo de µl/h) no duró más de 10 horas, además la actividad paroxística se limitó al área de infusión sin propagarse contralateralmente o a otras estructuras(Le Gal La Salle et al., 1988).

5.2. Patrones EEG del SAG

Durante el SAG, se observan tres tipos de patrones electroencefalográficos (véase fig. 6): el patrón I, constituido por actividades en forma de espiga onda única, de 200 a 700 μV de amplitud. El patrón tipo II, conformado por elementos en forma de espigas onda seguidos de poliespigas de alta frecuencia. El patrón III formado por trenes de espigas que se propagan a las áreas homólogas del hemisferio contralateral. En la mayoría de los casos, el SAG se inicia con el patrón I, el cual predomina también a partir del segundo día y hasta el final de las descargas paroxísticas. Los patrones II y III se observan en general entre la primera y la cuarta hora de iniciado el SAG y son raros después de 12 horas (Véase fig. 10). El final del SAG, que puede durar varios días, se anuncia por la desaparición de la actividad eléctrica anormal durante la vigilia y el sueño de movimientos oculares rápidos, y su presencia se cuantifica solamente durante el sueño de ondas lentas (Brailowsky, 1991; 1992).

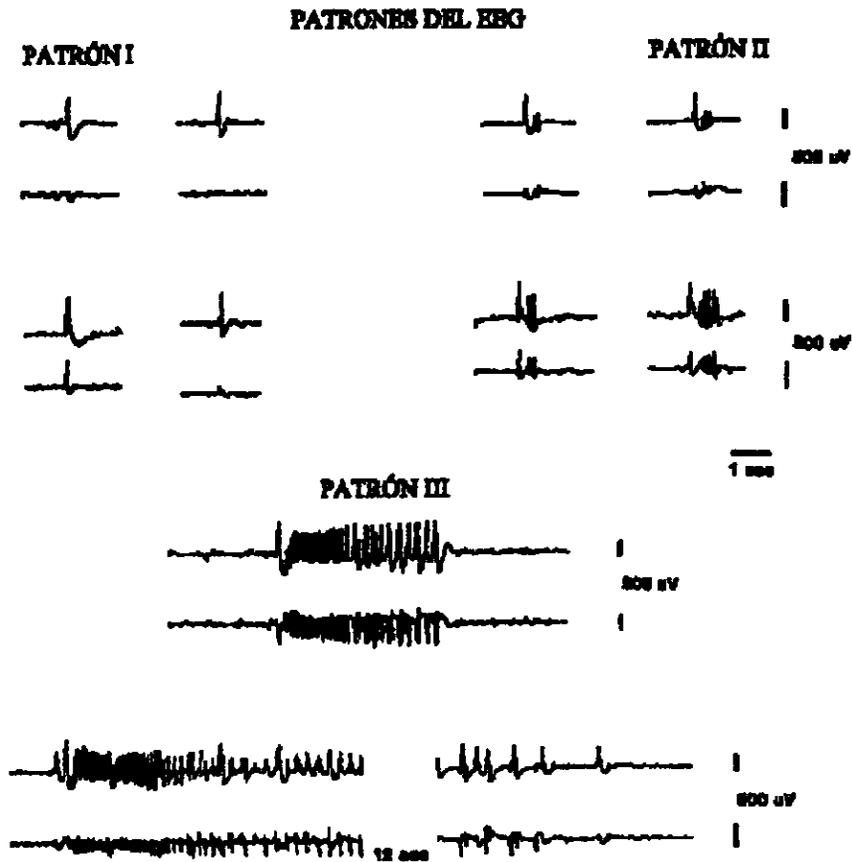


FIG. 10. Patrones electroencefalográficos (EEG) del SAG en corteza somatomotora de rata. En cada trazo superior se tiene el registro de la corteza izquierda y cada trazo inferior el registro de la corteza derecha. El GABA se infundio en la corteza izquierda. El registro EEG inferior se acorto 12 segundos. Tomado de Brailowsky et al., 1990.

5.3 Latencia y duración del SAG.

En diversos estudios se ha comprobado la aparición del SAG, después de infusiones unilaterales de GABA, a nivel de la corteza cerebral y del sistema límbico en rata. El SAG límbico, tanto a nivel del hipocampo como de la amígdala, es menos duradero que el cortical. En ambas estructuras éste nunca persiste por más de 12 horas (con infusiones de GABA de varios días y a concentraciones de 100µg/µl), sin embargo, el sistema límbico muestra una susceptibilidad extrema a los efectos de la estimulación eléctrica (Kindling), (Goddard et al., 1969). Estos hallazgos muestran que la susceptibilidad a la epileptogénesis varía de acuerdo a la estructura cerebral así como al estímulo desencadenante, es decir al modelo de epilepsia; (Brailowsky, 1991).

Por otra parte la latencia y duración del SAG, muestran una relación inversa al tiempo de infusión de GABA en corteza cerebral, por ejemplo con infusiones cortas (6 horas) se producen SAGs de mayor duración y latencias mayores. En animales que recibieron GABA por 6, 12 y 24 horas las descargas epilépticas duraron de entre 90 y 170 horas, mientras que las latencias para la aparición del SAG fueron de entre 50 y 60 minutos en promedio. Sin embargo, las ratas tratadas con GABA por más de un día (3, 5, 7 y 14 días) mostraron latencias de 10 y 25 minutos y las descargas epilépticas no duraron más de 80 horas (Brailowsky et al., 1988; 1991). (Véase fig. 11).

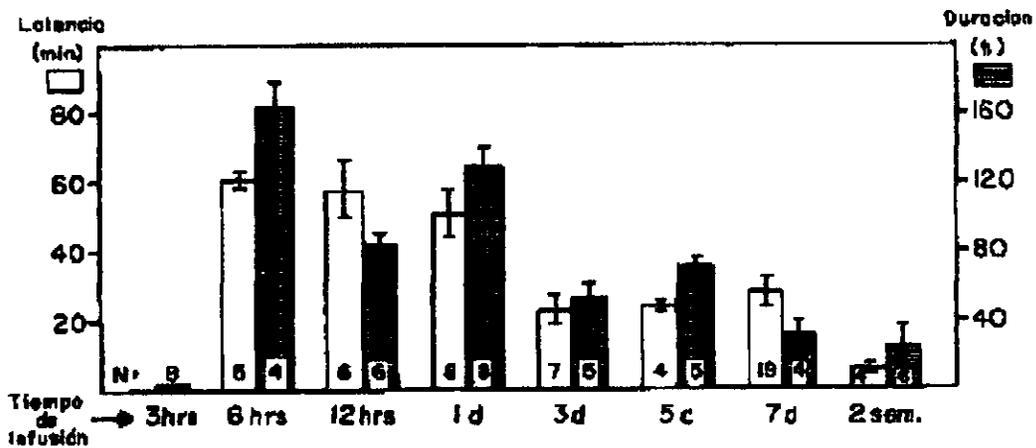


FIG. 11. Relación entre el tiempo de infusión intracortical de GABA (indicado en las abscisas) y la latencia (eje de la izquierda) y la duración (eje de la derecha) del SAG. Cada barra indica la media error estándar y el número de animales. Tomado de Brailowsky, 1991.

5.4. Alteraciones histológicas, metabólicas, electro-clínicas y farmacológicas que se presentan durante el SAG.

Histológicas

El análisis histológico del SAG muestra cambios locales, tanto a nivel del sitio de infusión como en aquellas estructuras que reciben proyecciones de la zona cortical infundida. A nivel local se encontró una despoblación neuro-glial en las áreas más próximas a la cánula de infusión. En las zonas más lejanas se aprecia una zona de gliosis (solo en casos de actividad paroxística duradera), visible con la tinción de Nissl (violeta

de cresilo) y más claramente con la inmunocitoquímica (anticuerpos anti-GFAP) (Brailowsky, 1991).

Se presenta además pérdidas de tejido a nivel de las áreas en las que se implantó las cánulas-electrodo de infusión. Hasta la fecha no se ha encontrado una correlación entre el tamaño de la lesión y la latencia o duración del SAG; además se sabe que no todas las lesiones cerebrales pueden inducir un fenómeno epiléptico; infusiones de taurina o glicina producen los mismos efectos histológicos a nivel del sitio de infusión, sin embargo, no se presentan síntomas de abstinencia (Brailowsky, 1991).

Metabólicas

En el modelo del SAG con infusiones crónicas (5 días), se han observado cambios en el metabolismo energético a través de la utilización de 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva dicha técnica permite observar la acumulación de glucosa en el sitio de mayor actividad metabólica; en estos experimentos se presenta un aumento de 2 a 3 veces en un área de 1-1.5 mm de diámetro que abarca todas las capas corticales en el sitio de infusión de GABA. También se observa un aumento de 3 a 5 veces en algunos núcleos tálamicos ipsilaterales de proyección de la corteza motora (núcleos posterior oralis, ventro-lateral, central-lateral ventro-lateral y reticular). Sin embargo, algunos autores señalan que los cambios observados a nivel tálamico pueden ser secundarios a la actividad epileptogénica (Menini et al., 1991)

Electrofisiológicas

Estudios electrofisiológicos ex-vivo (en rebanadas de corteza cerebral de ratas con SAG) reportan que la estimulación eléctrica de la sustancia blanca situada en el mismo plano columnar del sitio de registro indujo, en todas las células analizadas, despolarizaciones paroxísticas acompañadas de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas actividades son las llamadas deflexiones despolarizantes paroxísticas (PDS) consideradas como una característica de células epilépticas. Sin embargo, si la intensidad de estimulación eléctrica era menor, se obtenían potenciales post-sinápticos excitadores (PPSE) de gran amplitud (Silva-Barrat et al., 1989; 1992).

En estas rebanadas se encontró una población de neuronas que presentaban, además de los PDS inducidos sinápticamente, trenes de potenciales de acción de alta

frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente. Estas células con capacidades intrínsecas para la generación de PDS se diferenciaron de aquellas células en las que los PDS sólo se pueden producirse por estimulación sináptica en que: a) presentan potenciales dependientes del voltaje (PPSE que aumentan por la hiperpolarización y disminuyen por despolarización), b) presentan PDS calcio-dependientes (la sustitución del calcio del medio por cobalto produjo la desaparición de los trenes de potenciales de acción de alta frecuencia inducidos por corriente para dar paso a potenciales únicos) y c) tienen una mayor tolerancia a los efectos hiperpolarizantes de la isoguvacina (agonista del receptor GABA_A) aplicada al baño en el que se mantuvo a las rebanas.

La tolerancia que se encuentra en las células que estuvieron expuestas crónicamente al GABA puede deberse a una desensibilización de los receptores producida por la exposición prolongada al aminoácido, aunque no se sabe si la desensibilización se debe a una disminución en el número de receptores o en su afinidad por el GABA, o por un aumento en los mecanismos de recaptura. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el calcio pueda afectar de forma directa al receptor o a través del estado de fosforilación del propio receptor GABA_A (Silva-Barrat et al., 1989; 1992). Trabajos recientes de este grupo (Silva-Barrat y Champagnat, 1995), en rebanadas de corteza, han demostrado que las ráfagas que se presentan durante el SAG son generalmente potenciales de meseta dependientes de Ca²⁺ que son finalizados por una corriente de K⁺ altamente sensible al tetraetilamonio (TEA). Los autores proponen que la conductancia de K⁺ dependiente de Ca²⁺(gK⁺ [Ca²⁺]) participa en la génesis de las ráfagas dependientes de Ca²⁺ durante el SAG.

Neuroquímicas

Experimentos en los en los que se midieron los niveles totales de GABA y la actividad de la enzima responsable de la síntesis del GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD) revelan que los niveles de GABA aumentan de 3-6 veces después de la infusión del GABA y antes de la presencia de las descargas del fenómeno epiléptico. Durante las descargas epilépticas, los niveles de GABA regresan gradualmente a los valores normales, mientras que la actividad de la GAD, con períodos de infusión de 2, 6, y 24

horas disminuyó progresivamente: 28, 37 y 48%, respectivamente. Esta disminución se observó en la corteza infundida y no en la contralateral. La actividad de la GAD permanece disminuida durante el fenómeno epiléptico y regresa a niveles del control una vez desaparecida la actividad paroxística del SAG (Salazar et al., 1994).

Otro dato que apoya la disminución de la GAD en el SAG es que la actividad de la GAD es similar en presencia o en ausencia del cofactor fosfato de piridoxal (PLP). Esto sugiere que la disminución en la actividad de la GAD observada después de la infusión del GABA en la corteza motora, se debe a una disminución en la síntesis de la enzima, ya que la concentración de GABA intracelular es un factor de regulación de la síntesis de la GAD *in vitro* (Rimvall y Martin, 1992). Estos autores demostraron que el aumento de GABA intracelular por la administración prolongada (más de 5 horas) de γ -vinil-GABA un inhibidor de la transaminasa de GABA o por agregar GABA al medio de cultivo, se produce un decremento en la actividad de la GAD del 60-70%. Asimismo, la correlación temporal entre el regreso de los niveles de GABA a los valores normales, la persistencia de la actividad de la GAD disminuida y la presencia de las crisis electroencefalográficas, sugiere la disminución en la síntesis de GABA como un factor que participe en el síndrome epiléptico (Salazar et al., 1994).

Farmacológicas

El SAG es un síndrome de carencia o abstinencia semejante al que se observa después de suspender bruscamente la administración prolongada de sustancias como los barbitúricos, las benzodiazepinas o el alcohol, todas estas sustancias se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica.

Estudios preliminares demuestran que en sus fases iniciales el SAG es extraordinariamente resistente a los anticonvulsivos de uso clínico común como son: fenitoina, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbazapina y el diazepam, incluso esta benzodiazepina y el pentobarbital a dosis anestésicas y estando el animal completamente sedado no afectan la frecuencia de descarga del foco de descarga cortical. Así el SAG es un modelo de epilepsia intratable en sus fases iniciales en el que se pueden ensayar nuevos fármacos anticonvulsivos (Salazar, et al., 1994). Sin embargo, en el segundo día del SAG se tienen efectos anticonvulsivos con la administración de antagonistas del

receptor NMDA (ketamina, APH y MK-801) o benzodiazepinas como clonazepam. La hidroxietilpropionamida (HEPP) disminuye transitoriamente la frecuencia de descarga del foco epiléptico sólo en la primera hora después de la latencia del SAG (Tapia, et al, 1979); por otro lado, la reinfusión local de GABA inhibe el síndrome epiléptico. (Brailowsky et al., 1990).

5.5. El SAG y el receptor GABA_A

Se sabe que el SAG es un fenómeno asociado al receptor GABA_A. Silva-Barrat y colaboradores (1989) describen que la tolerancia o inhibición de los receptores GABA_A, tiene un papel predominante en el SAG.

Más adelante (Brailowsky y Montiel, 1991) reportaron que la isoguvacina, agonista del receptor GABA_A, induce un fenómeno similar al SAG, este proceso epileptogénico es comparable tanto en latencia, duración y morfología. Sin embargo, los efectos conductuales y electroencefalográficos después de la infusión intracortical de isoguvacina son más pronunciadas que aquellos producidos por el GABA.

Se comprobó además que no hay intervención del receptor GABA_B en la fisiopatología del SAG. Tanto el faclofen como el CGP-35348 antagonistas del receptor GABA_B no muestran ningún efecto conductual ni electroencefalográfico en el SAG. Además la microinyección intracortical de baclofen, agonista específico del receptor GABA_B induce por sí mismo un proceso epiléptico que puede ser inhibido por faclofen y CGP 35348 (Brailowsky et al, 1995).

Otra evidencia señala que la participación del receptor GABA_A está dada por la modulación positiva de la alopregnanolona neuroesteroide que favorece la acción del receptor GABA_A, potenciando el SAG, disminuyendo la latencia y aumentando la duración de la actividad paroxística (Calixto et al., 1995).

● ● PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las características electroencefalográficas y conductuales de ciertos tipos de epilepsia dependen de las estructuras implicadas en su generación. Resulta entonces, de gran interés observar si existe alguna diferencia estructural en la susceptibilidad de diversas regiones del cerebro de desarrollar un SAG.

● ● ● HIPÓTESIS

La susceptibilidad para desarrollar SAG varía dependiendo de la estructura cerebral, probablemente debido a diferencias en la distribución de neuronas GABAérgicas.

● ● ● ● OBJETIVOS

1. Evaluar la susceptibilidad para desarrollar SAG en las siguientes estructuras cerebrales: bulbo olfatorio, cerebelo, amígdala e hipocampo (CA3)
2. En caso de que se presente el SAG en las estructuras señaladas determinar la latencia y duración.
3. En caso de que se presente el SAG observar la respuesta conductual.

MÉTODO

Sujetos:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar UNAM de 230-280 g. al momento de la cirugía, se mantuvieron en forma individual en cajas de acrílico, con alimento y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz/oscuridad 12/12.

Cirugía:

Bajo anestesia de halotano/carbogéno (95% O², 5% CO²), inicialmente con una concentración de %5, que se redujo gradualmente y se mantuvo durante la cirugía al 2%; se implantaron cánulas-electrodos de acero inoxidable de 0.6 mm de diámetro externo, además de electrodos bipolares en las estructuras de interés, dos electrodos epidurales en corteza occipital y un electrodo de referencia en el seno frontal, se fijó el complejo de registro al cráneo con acrílico dental. La implantación se realizó siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1996): para **bulbo olfatorio** a partir de bregma: anteroposterior (AP) +7.5, lateral (L) -1.5, ventral (V) +3; para **amígdala** (núcleo amígdalino central): AP -2.8, L 4.5, V -8; para **hipocampo** (CA3): AP-3, L 4.5, V -8; para **cerebelo**, partiendo de lambda: AP -3, L -2.5, V -2.6. Al término de la cirugía se aplicó penicilina benzatínica (dosis profiláctica).

TABLA 8. Grupos de trabajo

GRUPOS EXPERIMENTALES

GRUPOS CONTROL

Bulbo olfatorio: GABA 50µl/µl	Bulbo olfatorio: vehículo
Cerebelo: GABA 50µl/µl	Cerebelo: vehículo
Amígdala: GABA 10µl/µl	Amígdala: vehículo
Hipocampo (CA3): GABA 10µl/µl	Hipocampo (CA3): vehículo

Procedimiento:

Después de 7 días de recuperación postoperatoria se realizó una fase de habituación, la cual consistió en una sesión de 20 minutos dentro de la cámara de registro. 24 horas después se tomó un registro EEG control durante media hora en un

Polígrafo Grass (Mod 79), posteriormente se inicio la infusión de GABA (Véase tabla 8), 100mM, 6µl en total (50 o 10 µg/µl, 3µl/h durante 2 horas), o vehículo del GABA (salina al 0.9%), ambas soluciones fueron teñidas con azul verdadero (para detectar el área que se infundió), se procedió a infundir por medio de una bomba peristáltica (Syringe infusion pump 22, Harvars Apparatus) al término de la infusión se continuó el registro EEG durante 120 minutos, en los casos en que se presentó el SAG (actividad EEG paroxística), el registro se mantuvo hasta por 2 horas más a partir de la aparición del SAG, y en los días siguientes el registro EEG se llevó a cabo durante 30 minutos cada día hasta la desaparición del foco epiléptico. Se analizó la evolución electrofisiológica y los patrones EEG predominantes.

Sacrificio:

Después de 10 días de haber concluido las manifestaciones electrofisiológicas del SAG se procedió al sacrificio de los animales, por sobredosis de anestesia intraperitoneal (Pentobarbital sódico 200 mg/Kg.). El tejido cerebral se preparó para su análisis histológico y se extrajo previa perfusión intracardiaca de solución salina 0.9% (100 ml /100 gr de peso corporal), seguida de paraformaldehído, al 4% (en buffer fosfato de sodio 0.1M), y se mantuvo por 48 horas en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfato de sodio 0.1 M, posteriormente se mantuvo en sacarosa (disuelto en buffer de fosfatos de sodio 0.1 M, PH 7.2) durante 24 horas al 20% y por 48 horas en sacarosa al 30%.

Histología e Inmunocitoquímica:

Finalmente fueron seccionados en un criostato (Jung Frigocut 2800 E) en rebanadas de 30 micras a las cuales se les realizó tinción de Nissl; para teñir el retículo endoplásmico que se encuentra dentro del soma permitiendo así diferenciar cuerpos neurales y determinar la extensión de la lesión, a continuación se montaron los tejidos en laminillas de vidrio gelatinizadas las cuales fueron, posteriormente, analizadas al microscopio.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

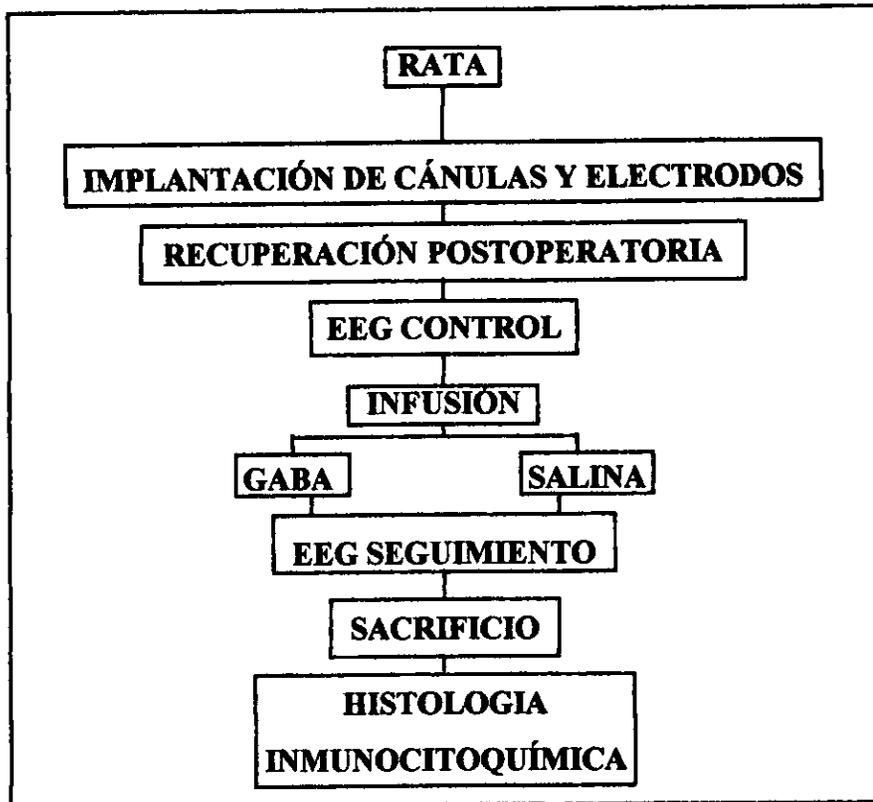


FIG: 12. Procedimiento experimental.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza (prueba t para muestras no relacionadas) que permitió determinar si había diferencias entre las latencias y duraciones de los grupos que presentaron SAG.

● Resultados

1.- Registro electroencefalografico del SAG.

■ La infusión de GABA, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. durante dos horas tanto en cerebelo como en bulbo olfatorio, no indujo ningún cambio conductual o electroencefalográfico (Véase figuras 13 y 14).

TABLA 9. Relación de ratas que presentaron SAG.

ESTRUCTURA	INFUSIÓN GABA	% ocurrencia de SAG	INFUSIÓN SALINA 0.9 %
BULBO OLFATORIO	9 RATAS	0%	5 RATAS
CEREBELO	6 RATAS	0%	6 RATAS
AMÍGDALA	9 RATAS	100%	4 RATAS
HIPOCAMPO	8 RATAS	100%	3 RATAS

Sin embargo, la infusión de GABA, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a un flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{h}$, durante dos horas en hipocampo (CA3), induce la aparición de un SAG en el 100% de las ratas infundidas (véase fig. 15) presentando latencias de aparición entre 9 y 18 minutos (véase fig. 17), la duración del SAG varió entre 8 y 34 días (véase tabla I y II). En todas estas ratas se observó, salivación, sacudidas de perro mojado y mioclonus en la mandíbula (características de crisis límbicas) y crisis tónico-clónicas generalizadas durante el primer día del SAG siendo rara el segundo día del SAG.

CEREBELO

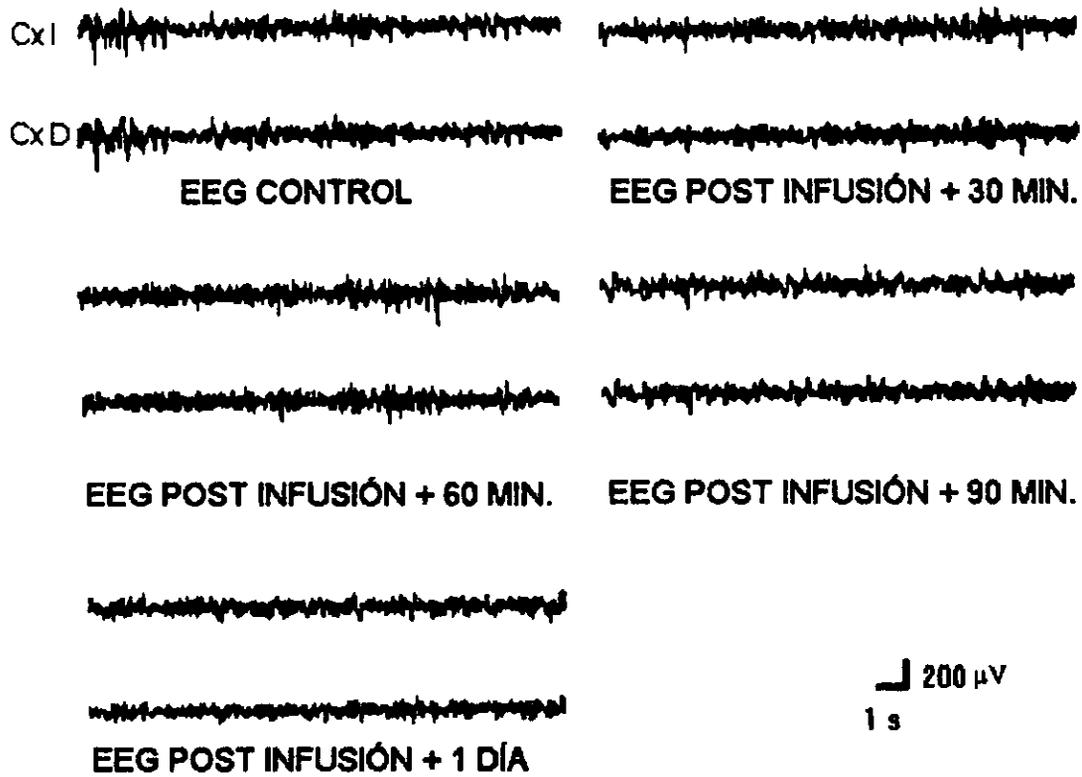


FIG: 13. Muestra un registro EEG representativo en cerebelo antes (registro control) y en diferentes tiempos después de la interrupción de la infusión de GABA. En el trazo superior se registro corteza cerebelar izquierda y en el trazo inferior corteza cerebelar derecha.

BULBO OLFATORIO

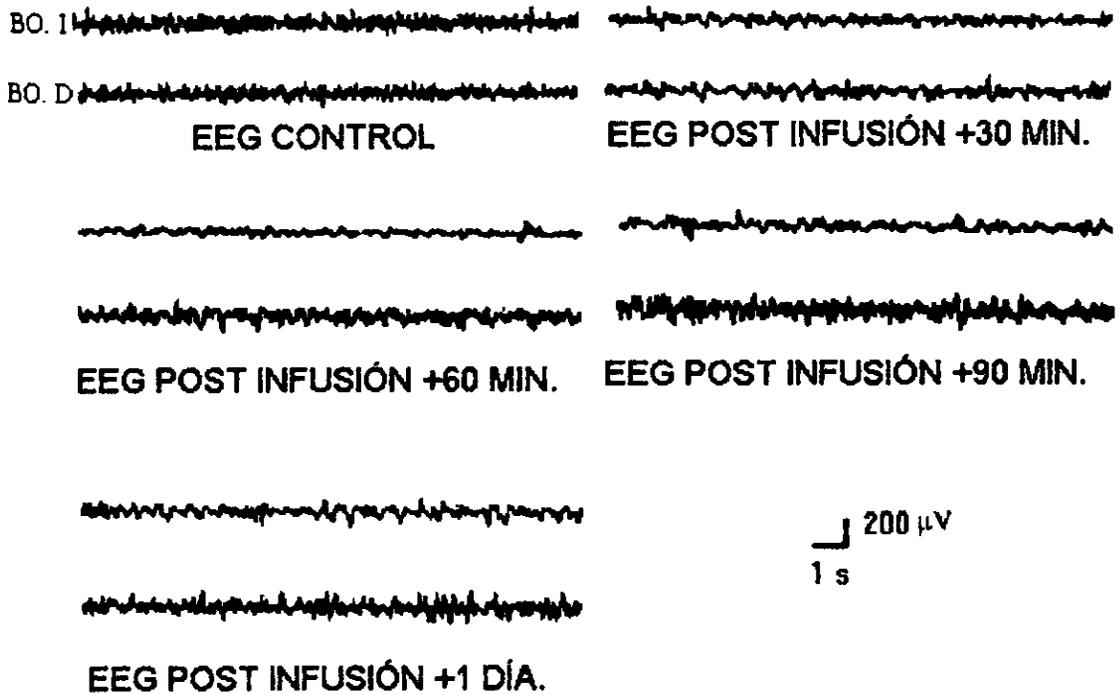


FIG: 14. Muestra el registro EEG en bulbo olfatorio antes y después de la interrupción de la infusión de GABA. En el trazo superior se registro bulbo olfatorio principal izquierdo y en el trazo inferior bulbo olfatorio principal derecho.

Tanto los animales infundidos con GABA en cerebelo como los animales infundidos con GABA en bulbo olfatorio no presentan ningún cambio electroencefalográfico como lo muestran las dos figuras anteriores.

HIPOCAMPO

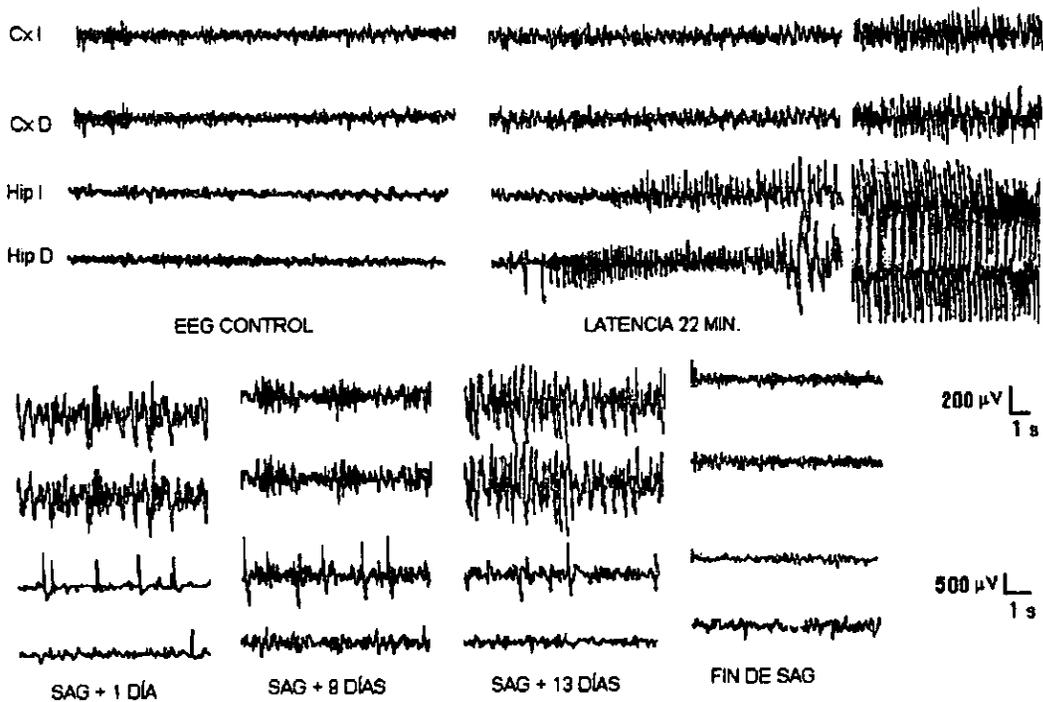


FIG: 16. Muestra un registro EEG representativo de hipocampo (CA3) antes y después de la interrupción de la infusión de GABA en hipocampo izquierdo. Se registra además en corteza cerebral izquierda, (Cx I), corteza cerebral derecha (Cx D), hipocampo izquierdo (Hipo I) e hipocampo derecho (Hipo D) donde se puede ver la propagación de la respuesta. El inicio del SAG (latencia) fue al minuto 22 después de la interrupción de GABA con una crisis límbica de 167 segundos de duración, aquí se presenta fragmentada, el fin del SAG fue el día 14 post infusión.

En cuanto al registro EEG las ocho ratas presentaron patrón tipo I, así como un patrón similar a crisis límbica, (véase fig. 15), además de propagación de la actividad paroxística a corteza cerebral y a hipocampo contralateral; sin embargo no presentaron patrón tipo II que si se encuentra en corteza somatomotora y es la estructura en donde principalmente se ha estudiado al SAG.

En el grupo de **amígdala** infusión de GABA, 10 µg/µl. se indujo el SAG en el 100% de las ratas infundidas presentando latencias que van de 9 a 22 minutos y con una duración del SAG de 3 a 11 días (vese tabla I y II); todas las ratas presentaron salivación, sacudidas de perro mojado y mioclonus en la mandíbula (características de crisis límbicas) durante el primer día del SAG, pero a diferencia de las ratas infundidas en hipocampo ninguna de estas presento crisis tónico-clónicas generalizadas.

En el registro EEG las 9 ratas presentaron patrón tipo I, patrón similar a crisis límbicas, además de propagación de la actividad paroxística a corteza cerebral y a la amígdala contralateral (véase fig. 16).

El SAG, tanto en amígdala como en hipocampo se caracterizó por presentar salivaciones, sacudidas de perro mojado y mioclonus en la mandíbula, asociadas a las crisis límbica, además de que la actividad paroxística no se limitó al área de infusión sino que se propagó contralateralmente así como a corteza frontal

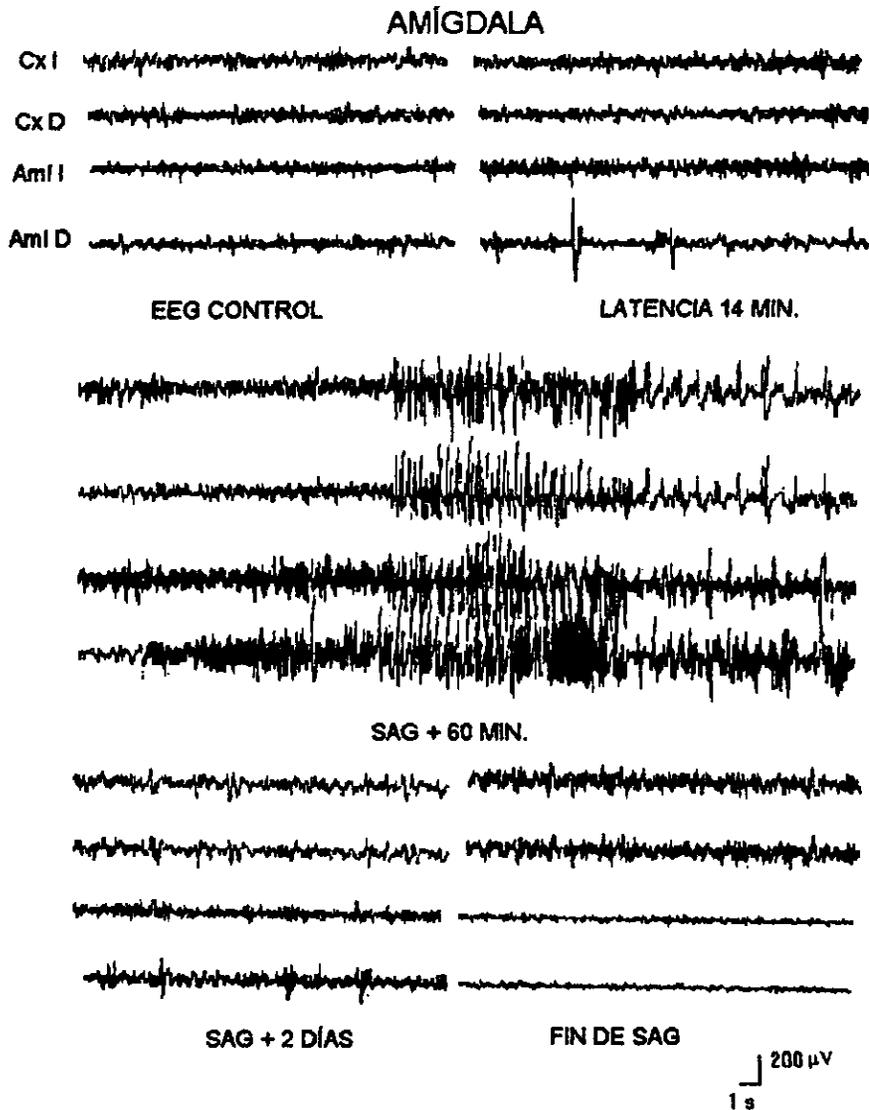


FIG: 16. Muestra un registro representativo de EEG en amígdala antes y después de la interrupción de la infusión de GABA en amígdala derecha (Ami D) Se registra además en corteza cerebral izquierda (Cx I), corteza cerebral derecha (Cx D), y amígdala izquierda (Ami I). El inicio del SAG fue al minuto 14, al minuto 60 post interrupción de la infusión se tiene una crisis límbica, el fin del SAG es 3 post infusión.

2.- Latencia y duración.

La latencia de aparición del SAG en amígdala y en hipocampo es muy similar ($\cong 14$ min.) a diferencia de la corteza somatomotora, la cual es mucho mayor comparada con amígdala ($P = 0.0089$), y comparada con hipocampo ($P = 0.017$), lo cual nos indica que tanto amígdala como hipocampo son más reactivas al modelo del SAG.

En cuanto a la duración del SAG vemos que tanto amígdala como corteza somatomotora se comportan de forma muy similar, no así el hipocampo comparado con ambas estructuras ($P = 0.0168$ y $P = 0.0037$ respectivamente), que duro en promedio 17 días. (Véase fig. 17 y tabla II).

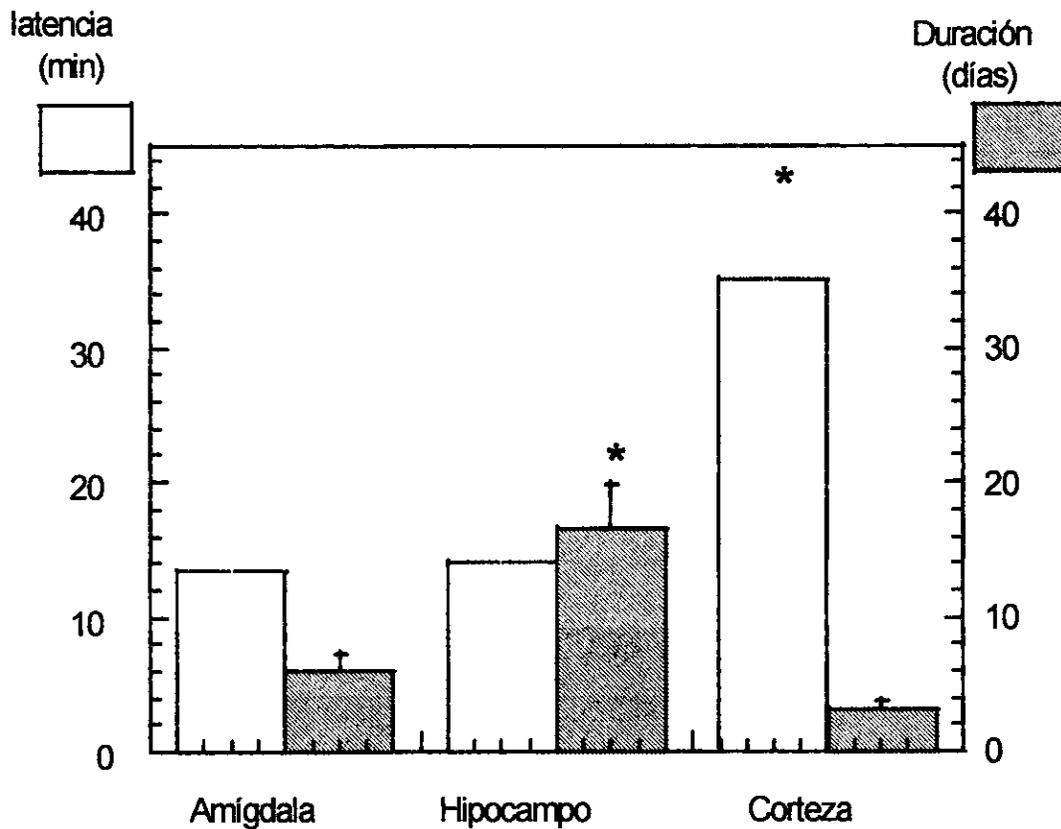


FIG: 17. Relación entre la estructura cerebral que presenta SAG y la latencia (eje de la izquierda, indicada en minutos y la duración (eje de la derecha, indicada en días). Cada barra indica la media error y estándar. La latencia en corteza comparada con hipocampo tiene una $*p = 0.0089$ y comparada con amígdala $*p = 0.017$; en cuanto a la duración del SAG el hipocampo comparando con corteza se tiene una $*p = 0.0037$ y comparándolo con amígdala $*p = 0.0168$).

TABLA 10. Latencia y duración del SAG.

ESTRUCTURA	LATENCIA	DURACIÓN
	min.	días
Corteza	35.2 ± 5.03	3.1 ± 0.61
Hipocampo	14 ± 1.22	16.62 ± 3.25
Amígdala	13.44 ± 2	6 ± 1.14

Con estos resultados podemos concluir que la amígdala y el hipocampo son más sensibles que la corteza somatomotora a la epileptogénesis por SAG.

La corteza somatomotora es la estructura cerebral donde más se ha estudiado el SAG y donde se han caracterizado 3 patrones EEG, (patrón tipo I, II y III), asociados al SAG, sin embargo, el patrón tipo II y el patrón tipo III no se presentan en el SAG de hipocampo o de amígdala. En estas dos estructuras límbicas el EEG del SAG se caracterizó por presentar patrón tipo I y patrón crisis límbica. El patrón tipo I se presenta durante todo el SAG, sin embargo, el patrón crisis límbica se presenta solamente el primer día del SAG y es raro en el segundo día.

El patrón I tanto en hipocampo como en amígdala es muy similar y no presenta diferencias significativas en la frecuencia de espigas por minuto durante las primeras tres horas de aparición del SAG (véase fig. 18).

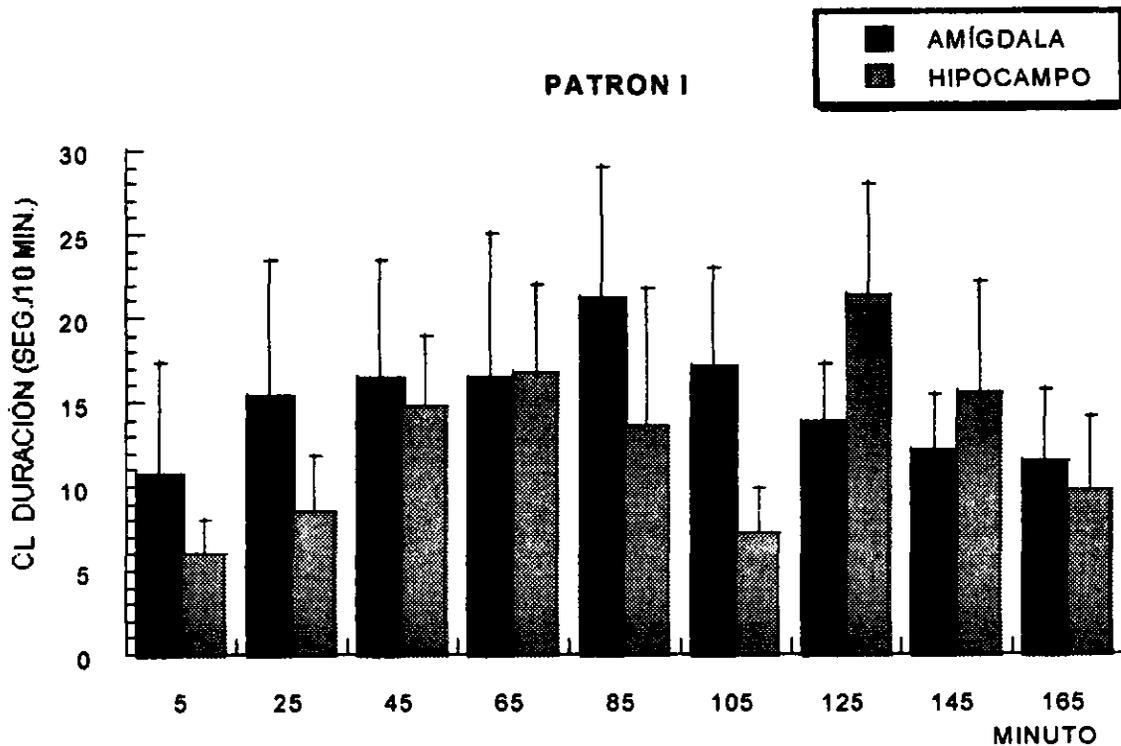


FIG: 18. Muestra la distribución del patrón I desde la latencia del SAG hasta el minuto 165 después de la aparición del SAG en amígdala e hipocampo.

Un patrón similar a crisis límbica se presenta de forma similar tanto en amígdala como en hipocampo, esta crisis límbica va acompañada de sacudidas de perro mojado, salivaciones, mioclonus de la mandíbula, así como crisis tónico-clónico generalizada. Sin embargo, en el minuto 90 después de iniciado el SAG el hipocampo presenta mayor hiperexcitabilidad comparado con la amígdala siendo esta diferencia significativa.

Estas crisis límbicas presentan una actividad periódica, donde cada periodo dura entre 40 y 50 minutos cada uno y la mayor excitabilidad se presenta a los 25 minutos aproximadamente de cada periodo (véase fig. 15, 16 y 19).

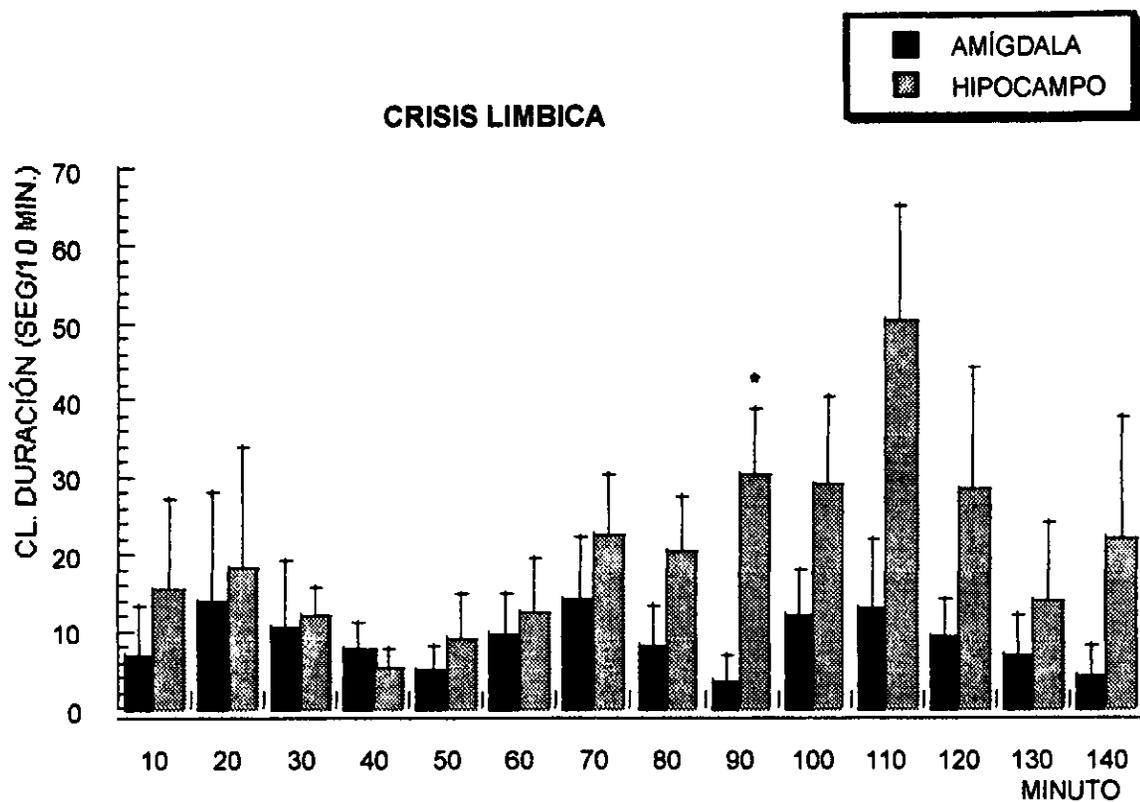


FIG: 19. Muestra el tiempo total de actividad de crisis límbica por cada 10 minutos, durante 140 minutos desde el inicio del SAG. En el minuto 90 hipocampo es más activo comparado con la amígdala con una diferencia significativa de $p = 0.0308$.

Tanto en amígdala como en hipocampo se presentaron sacudidas de perro mojado asociadas a la actividad paroxística, sin mostrar diferencias significativas en la frecuencia de eventos por estructura (véase fig. 20).

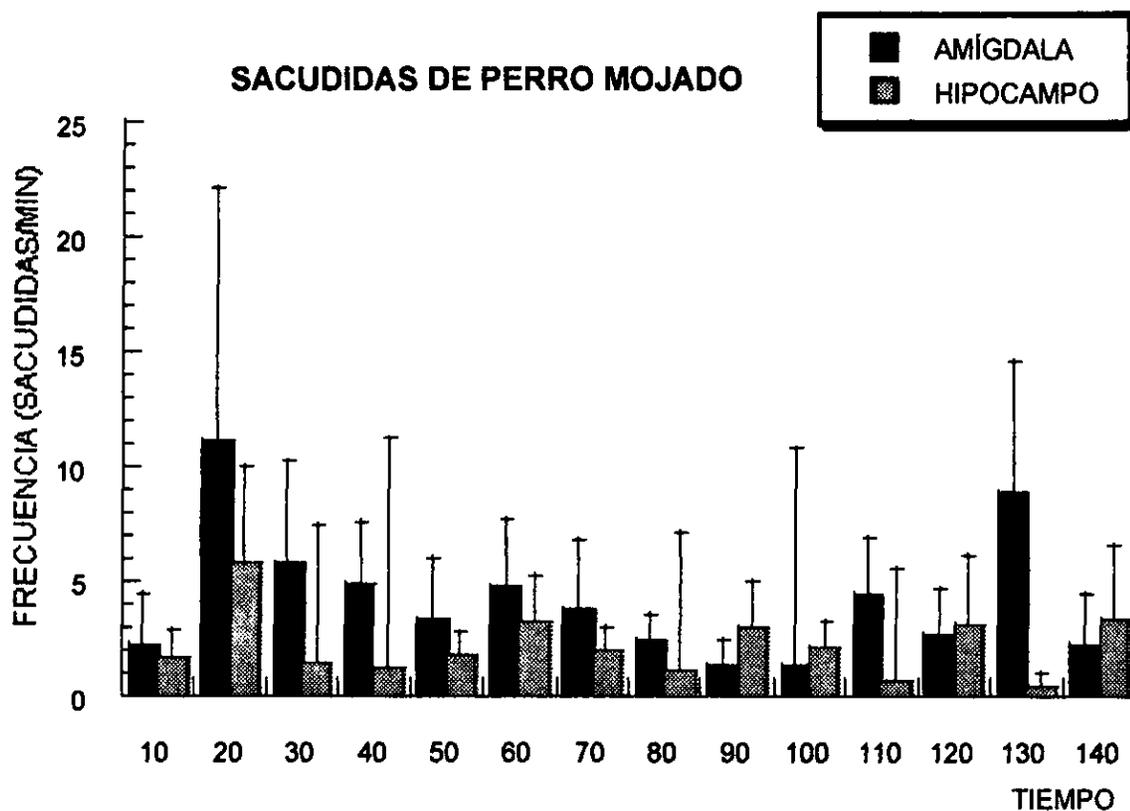


FIG: 20. Muestra la frecuencia de sacudidas de perro mojado en dos estructuras subcorticales durante el SAG, no encontrando diferencias significativas.

Grupos control:

Grupo control de hipocampo: tres ratas se infundieron con el vehículo del GABA (salina 0.9%), a igual flujo y tiempo, no observándose cambios conductuales ni electroencefalográficos.

Grupo control amígdala: en cuatro ratas se infundió salina 0.9% con semejante flujo y tiempo, no teniéndose cambios en el EEG, sin embargo al poner la cánula de infusión dos de las ratas presentaron sacudidas de perro mojado por 3 minutos aproximadamente, sin encontrarse más cambios durante la infusión, ni un día después de la interrupción de la infusión.

3.- Tinción de Nissl

El análisis histológico de los tejidos del cerebro de los animales tratados en este estudio con tinción de Nissl (violeta de cresilo), determinó la zona de lesión.

Se encontró en el contorno del área infundida con GABA un mayor daño neuronal que en los cerebros de animales tratados con vehículo. El sitio de infusión

muestra tejido necrótico y hemorrágico debido a la penetración de la cánula (Véase figuras 21-26)



FIG: 21. Histología con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de GABA en la amígdala (barra de calibración igual a 1.5 cm).

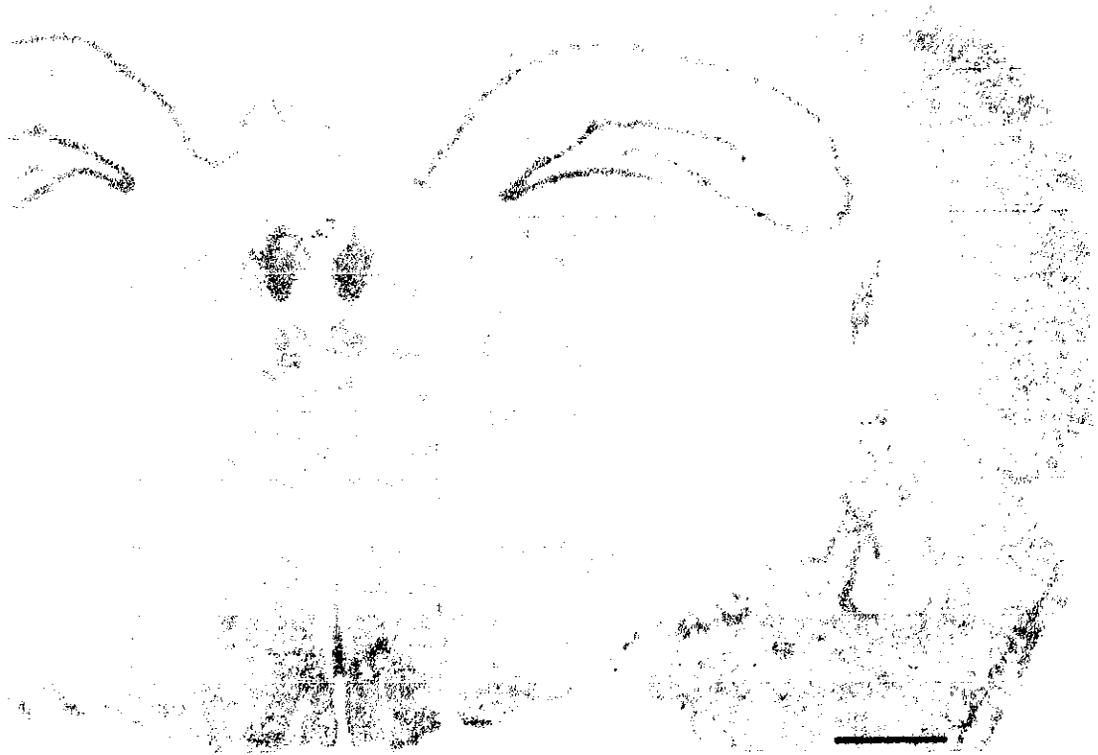


FIG: 22. Histología control con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de vehículo en la amígdala (barra de calibración igual a 1.5 cm).

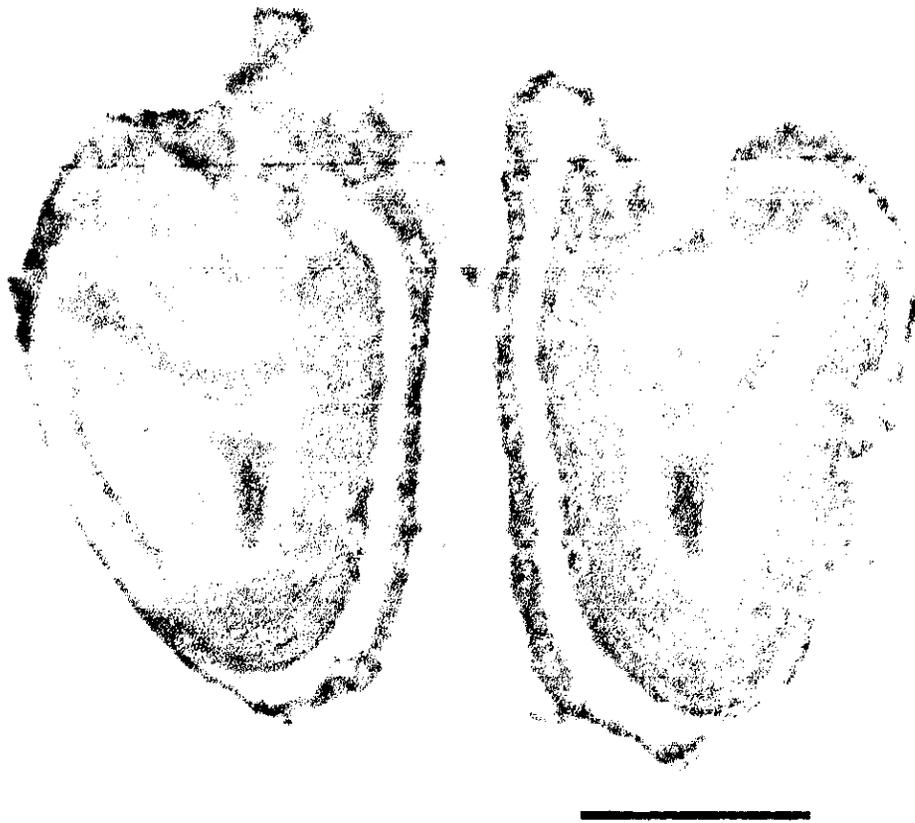


FIG : 23. Histología con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de GABA en Bulbo Olfatorio en BO izquierdo (barra de calibración igual a 1.5 cm).

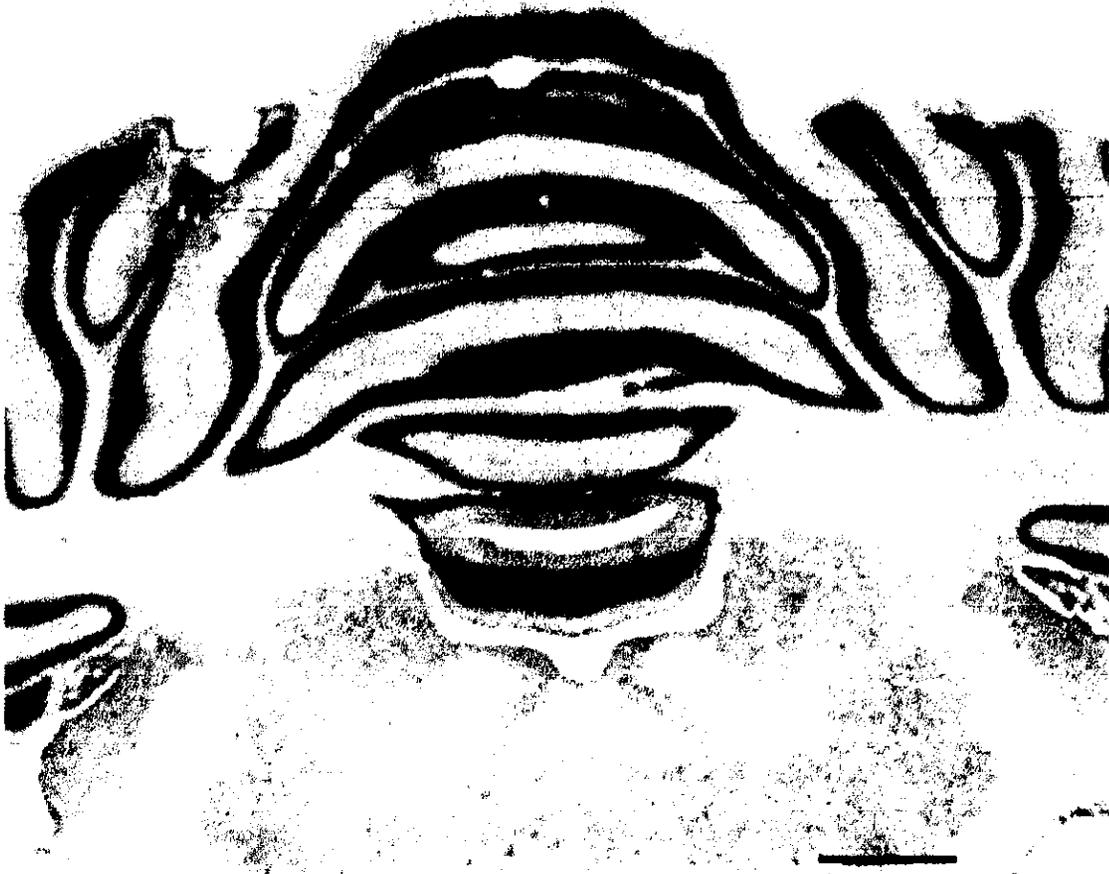


FIG : 24 . Histología con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de GABA en corteza cerebelar izquierda (barra de calibración igual a 1.5 cm).



FIG : 25 . Histología con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de GABA en el hipocampo (barra de calibración igual a 1.5 cm)



FIG : 26. Histología con tinción de Nissl que muestra el sitio de infusión de vehículo en el hipocampo (barra de calibración igual a 1.5 cm).

Nuestros resultados indican que no todas las estructuras cerebrales son susceptibles de desarrollar SAG.

Estos resultados sugieren que el SAG podría depender de una subpoblación de receptores $GABA_A$, con una localización diferencial a nivel del sistema nervioso central.

●● DISCUSIÓN

El síndrome de abstinencia al GABA es un modelo experimental de epilepsia parcial inducido por la interrupción de la infusión de GABA en estructuras cerebrales.

En este trabajo se demostró que no todas las estructuras cerebrales son susceptibles de desarrollar SAG. El cerebelo, que se caracteriza por ser una estructura resistente a la hiperexcitabilidad, no lo presentó después de la infusión de GABA. Así mismo, el bulbo olfatorio que es una estructura que presenta epilepsia en respuesta a la estimulación por kaínico o inducida por medio del modelo del Kindling en el modelo del SAG no desarrolló epilepsia.

Sin embargo, en dos estructuras límbicas: la amígdala y el hipocampo, se genera hiperexcitabilidad por medio del SAG, aún a latencias menores a las encontradas en corteza somatomotora, que es la estructura en donde se ha estudiado principalmente el modelo del SAG. Además, a diferencia de la hiperexcitabilidad encontrada en corteza somatomotora, el SAG en estructuras límbicas se encuentra siempre asociado manifestaciones conductuales tales como salivación, sacudidas de perro mojado y mioclonus de la mandíbula.

En el SAG de la amígdala y el hipocampo sólo se presentaron dos patrones electroencefalograficos: el patrón I (que también se presenta en corteza somatomotora) y el patrón crisis límbica. Los patrones II y III presentes en SAG de corteza somatomotora no se manifestaron en el área límbica.

La latencia y duración del SAG en amígdala e hipocampo (CA3) varía dependiendo de la concentración, velocidad y tiempo de infusión de GABA. En un estudio realizado por Le Gal La Salle y colaboradores (1988) se realizaron infusiones de GABA (7 días) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a un flujo de 1 $\mu\text{l}/\text{h}$ obteniendo como resultado que el SAG dura menos de 10 horas en ambas estructuras, con una latencia de 36 ± 10.4 minutos para **hipocampo**, mientras que para **amígdala** es de 51.6 ± 18.7 minutos. Sin embargo, si se aumenta la velocidad de infusión 3 $\mu\text{l}/\text{h}$, y se disminuye el tiempo de infusión a 2 horas, además de reducir la concentración de GABA de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ la latencia del SAG disminuye y la duración del proceso epiléptico aumenta, teniendo que en hipocampo una duración en promedio de 17 días, con una latencia de 14 ± 1.2 minutos. En amígdala, la duración de la hiperexcitabilidad fue en promedio de 3 días y presentó una latencia de 13.4 ± 2 .

La variación en la latencia de aparición del SAG en estas dos estructuras no es estadísticamente significativa. Sin embargo, se presenta una variabilidad entre individuos similar a la que se presenta en otros modelos de epilepsia como el Kindling o el de ácido kaínico (Yokoyama et al., 1992; McIntyre et al., 1999; Barcia et al., 1999; Maed et al., 1999).

Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por Brailowsky y colaboradores (1988) donde la latencia y la duración del SAG en corteza somatomotora muestran una relación inversa; esto es, a tiempos cortos de infusión la latencia es menor y la duración del fenómeno epiléptico se incrementa.

Al igual que el SAG, el kindling es un modelo de epilepsia, este término, fue usado por Goddard y colaboradores (1969), para indicar el desarrollo progresivo de manifestaciones epileptiformes tanto conductuales como EEG en respuesta a una aplicación repetida de pequeñas estimulaciones tetánicas eléctricas (Kammphuis y Lopes da Silva, 1990).

Los resultados de Goddard indican que la estimulación eléctrica repetitiva causa un cambio permanente en la excitabilidad cerebral, aunque no todas las regiones del cerebro responden igual a la estimulación. Existen regiones en que la sensibilidad al estímulo es, tan variada que los ensayos pueden ir de 15 hasta 77 para producir una respuesta epiléptica. La región que responde mejor es la amígdala, que necesita sólo 15 ensayos. El sistema límbico-olfatorio es la siguiente área más sensible, donde el bulbo olfatorio necesita 44 ensayos.

Las porciones más caudales del sistema extrapiramidal, incluido el núcleo rojo, sustancia negra y cerebelo, no responden al kindling. Los resultados en tálamo no son concluyentes, aunque en la mayoría de los núcleos los resultados fueron negativos, pero

en los núcleos ventral anterior y anteroventral se logró una respuesta epiléptica (Goddard et al., 1969).

Los resultados de este trabajo muestran que, análogo a lo que se observa en el kindling, el SAG produce una respuesta epiléptica diferencial en cada estructura cerebral, por ejemplo: la amígdala y el hipocampo son muy susceptibles de generar epilepsia por ambos modelos; sin embargo, el bulbo olfatorio, estructura que fácilmente desarrolla kindling, y que también desarrolla hiperexcitabilidad a la estimulación por ácido kaínico, no genera un foco epiléptico después de la interrupción de la infusión de GABA. Una respuesta posible a este fenómeno la dan la gran diversidad de receptores GABA_A y las conexiones particulares que ahí existen. La combinación de subunidades que forman el receptor, presenta una distribución diferencial por grupos celulares y regiones cerebrales.

La combinación de subunidades más comunes que forman un receptor está bien localizada. McKernan y Whiting (1996) reportan la distribución de los principales subtipos de receptor GABA_A en el cerebro de rata, encontrando que las subunidades α_1 , β_2 , γ_2 presentan una abundancia relativa en el cerebro de rata (43%) y se encuentran localizadas en interneuronas del hipocampo, en corteza cerebral y en células de Purkinje. Las subunidades α_2 , $\beta_{2/3}$, γ_2 representan el 18% y se encuentran en motoneuronas de la médula espinal y células piramidales de hipocampo. Las subunidades α_3 , β_n , γ_2 , γ_3 presentan una abundancia del 17% y se encuentran en neuronas colinérgicas y monoaminérgicas regulando la liberación de acetilcolina y monoaminas. Las subunidades α_2 , β_n , γ_1 tienen una abundancia relativa del 8% y están presentes en células gliales, núcleos del sistema límbico y en el páncreas, mientras que la combinación α_5 , β_3 , γ_2/γ_3 representan el 4% y se localizan principalmente en células piramidales del hipocampo. Las subunidades α_6 , β , γ_2 y α_6 , β , δ se localizan en células granulares del cerebelo y representan el 2%; las subunidades; α_4 , β , δ presentan una abundancia del 3% y se localizan en el tálamo y en el giro dentado hipocampal (McKernan y Whiting, 1996).

La sustitución de un solo aminoácido en el asa citosólica de la subunidad α_6 , del receptor GABA_A cambia la farmacología del receptor, la construcción de quimeras de la subunidad α_1 y α_6 , esto es la sustitución de una arginina 100 por una histinina 100 de la subunidad α_6 confiere sensibilidad a diazepam al receptor compuesto por

α_6 quimera, β_2 , γ_2 , se puede además conferir insensibilidad al diazepam a los receptores compuestos por la subunidad α_1 quimera, al reemplazar la histidina 101 por una arginina (Wieland et al., 1992).

Sin embargo, el arreglo que presentan las subunidades del receptor GABA_A no es estático, después de un evento epiléptico el arreglo y la expresión de las subunidades cambia, por ejemplo, en ratas epilépticas después de una inyección aguda de ácido kaínico y la inducción de epilepsia como consecuencia, la expresión de RNAm de 13 subunidades del receptor GABA_A en hipocampo cambia mostrando un decremento del 25 al 50% en la expresión de los RNAm de las subunidades, α_2 , α_3 , α_5 , β_1 , β_3 , γ_2 y δ , acompañado de un incremento del 50% en la expresión de los mensajeros de α_1 , α_4 y β_2 , después de 6 y 12 horas (Tsunashima et al., 1997).

Aunque 7 y 30 días después de la inyección de ácido kaínico se encontró que los RNAm de las subunidades α_2 , α_4 , β_3 y γ_2 recobraron sus valores de expresión control; mientras que α_5 y δ permanecen reducidos en un 14 y 40% respectivamente por debajo de sus valores control. Por otra parte los RNA que codifican para las subunidades α_1 , α_3 , β_1 y β_2 se incrementan significativamente entre el 20 y 50% de su valor control. Estos eventos sugieren un cambio rápido pero reversible en la expresión de algunos RNAm que traducen para diferentes subunidades del receptor GABA_A (Tsunashima et al., 1997).

En un estudio de tolerancia a diazepam (un modulador alostérico del receptor GABA_A) un cambio en la expresión de diferentes subunidades del receptor GABA_A, se asoció con la tolerancia a diazepam. Se observó un decremento del 37% en la expresión de la subunidad α_1 en las capas III - IV de la corteza motora, acompañado de un incremento en la expresión de la subunidad α_5 (150%), γ_{2L} , γ_{2S} y $\beta_{2/3}$ (48%), así como un incremento en la subunidad α_5 en todas las capas celulares (Pesold et al., 1997).

En la corteza somatosensorial, las ratas que presentaron tolerancia a diazepam mostraron un incremento de 221% en la expresión de la subunidad α_5 en todas las capas celulares, además de un incremento del 35% en la expresión de la subunidad α_3 en las capas celulares V-VI. Un análisis de Western blot indica que los cambios inducidos por la tolerancia a diazepam se reflejan en los cambios en la expresión de las subunidades (Pesold et al., 1997).

Por otro lado a ratas tratadas con imidazenil (un modulador alostérico parcial del receptor GABA_A) con dosis equivalentes al diazepam, no producen tolerancia a sus propiedades anticonvulsivas y durante este evento tampoco muestran cambios significativos en la expresión de las subunidades α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , γ_{2L} , γ_{2S} y $\beta_{2/3}$ del receptor estudiadas por inmunocitoquímica (Pesold et al., 1997).

El RNAm de la subunidad β_1 , localizado ampliamente en el hipocampo presenta cambios en su expresión en ratas tratadas con una inyección intraperitoneal pentobarbital durante 9 días (dosis: 30 mg/kg los días 1 al 3; 60 mg/kg, los días 4 al 6 y 90 mg/kg los días 7 al 9), donde los niveles de RNAm aumentaron 7 veces el valor control dos horas después de aplicar la última dosis, mientras que, el número máximo de sitios de unión a muscimol (Bmax) no presentó cambios significativos. Sin embargo, la abstinencia a pentobarbital 24 horas y siete días después de la última dosis, la Bmax en hipocampo descendió entre el 24 y 46% respectivamente de su valor control a la unión a muscimol y la expresión de RNAm de β_1 en CA1 y CA2 regreso a sus valores control. En este estudio Yin y Lee (1998) demuestran que el tratamiento con pentobarbital no altera significativamente la afinidad del radioligando al receptor en hipocampo, ni en la expresión de RNAm de β_1 en CA3 y CA4.

En algunos estudios, la función del receptor GABA_A se encuentra aumentada en respuesta al alcohol, mientras que en otros estudios esta respuesta no se puede comprobar, por lo anterior Parsian y Cloninger (1997), postulan que existe un receptor GABA_A sensible al etanol y otro resistente, que podrían diferir en la composición de sus subunidades, sin embargo esta hipótesis no se ha comprobado.

Los cambios en la eficacia sináptica son esenciales para el desarrollo del aprendizaje, la memoria así como en los estados patológicos de la excitabilidad neuronal, como la epilepsia del lóbulo temporal. En las sinapsis existe una probabilidad alta de apertura de los receptores postsinápticos a los cuales se unen los neurotransmisores liberados en cantidades discretas (*cuantos*). Una de las formas más efectivas de aumentar la respuesta postsináptica es incrementar el número de receptores. Para comprobar esto, Nusser y colaboradores (1998) realizaron un análisis *cuantitativo* de las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas y una inmunocitoquímica para localizar los

receptores sinápticos GABA_A en las células granulares del hipocampo de ratas a las que previamente se les produjo un kindling. Se encontró que las amplitudes mayores (incremento del 66%) de las corrientes sinápticas elementales (tamaño cuantal) después del kindling producen un aumento directo del 75% en el número de receptores GABA_A en las sinapsis inhibitoras tanto en soma como en segmentos iniciales del axón. La densidad del receptor aumentó entre 34 y 40% y el área de unión sináptica se expandió 31%. Los botones presinápticos se alargaron lo que se podía relacionar con un decremento del 39% en el promedio de número de paquetes (contenido cuantal) de neurotransmisor liberado. Estos resultados apoyan la inserción de un nuevo receptor GABA_A y el correspondiente incremento en la respuesta postsináptica aumentando la eficacia de las sinapsis inhibitoras (Nusser et al., 1998).

La hiperexcitabilidad producida por la abstinencia a GABA se puede detener solamente por la reinfusión de GABA (Brailowsky et al., 1988), sugiriendo con esto que algunos receptores GABA_A permanecen funcionales o reaparecen después de presentar regulación negativa.

Existe evidencia de que la presencia continua de concentraciones de GABA elevadas podrían producir una regulación negativa (down-regulation), del receptor GABA_A en neuronas (Calvin y Barnes, 1994; Tehrani y Barnes, 1988).

Por otra parte, Calixto y colaboradores (1999), demostraron que en rebanadas de cerebro de rata expuestas a GABA, también se induce hiperexcitabilidad por la abstinencia al GABA, en estas rebanadas la unión específica a muscimol se reduce durante el SAG y se recupera después de la abstinencia al GABA. Esto sugiere que el número de receptores GABA_A no explica la hiperexcitabilidad inducida por la abstinencia al GABA. Sin embargo, como el número de receptores GABA_A primero se reduce, y después se recupera. Podría ser que los receptores medidos después de la abstinencia no sean los mismos que estaban presentes en el momento de la exposición a GABA, esto es, es posible que después de la regulación negativa la combinación de subunidades que forman la estructura pentamérica del receptor GABA_A cambien y por lo tanto cambie también la farmacología de estos receptores. Si esto sucede en vivo sería el

mecanismo que mantiene la hiperexcitabilidad por varios días en ratas infundidas con GABA.

Una posible vía por la cual se podría estudiar la contribución individual de cada una de las subunidades del receptor GABA_A *in vivo*, en la función general del complejo-receptor, así como su efecto en la facilitación o inhibición de la epileptogénesis, es la infusión intracerebral de oligonucleótidos antisentido específicos para cada subunidad del receptor GABA_A. De esta forma, se impide la traducción del RNAm para una subunidad específica del receptor GABA_A, al utilizar un oligonucleótido cuya secuencia específica es capaz de aparearse al RNAm de interés. Al estar apareados el oligonucleótido antisentido y el RNAm, éste último no puede ser reconocido por el ribosoma. Lo que evita la expresión de subunidades específicas. Como se conoce la secuencia de un gran número de subunidades, al infundir oligonucleótidos antisentido se podría analizar si en las estructuras susceptibles de desarrollar SAG cambia la expresión y por lo tanto la combinación de subunidades del receptor, o bien, si diferentes combinaciones permiten la formación de receptores funcionales que eventualmente faciliten o no, la hiperexcitabilidad en diferentes estructuras.

●●● CONCLUSIONES

- 1.- No todas las estructuras cerebrales son susceptibles de desarrollar SAG

- 2.- La interrupción de la infusión de GABA en:
 - a) El bulbo olfatorio de rata no genera hiperexcitabilidad. Debido posiblemente a que sus neuronas están en constante recambio durante toda la vida de la rata y por lo tanto que las nuevas conexiones sinápticas que se forman no se ven afectadas por la infusión de GABA.
 - b) El cerebelo de rata no genera hiperexcitabilidad. Una de las características principales de esta estructura que la hace diferente de las demás, es la presencia de la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA_A.
 - c) La amígdala de rata genera hiperexcitabilidad en el área infundida.
 - d) El hipocampo (CA3) de rata genera hiperexcitabilidad en el área infundida. Comúnmente el hipocampo se asocia a la epilepsia del lóbulo temporal, y al igual que la amígdala son las dos estructuras más estudiadas por el modelo del kindling debido a su gran hiperexcitabilidad.

- 3.- En este modelo, el hipocampo y la amígdala son más sensibles que la corteza somatomotora a la epileptogénesis.

- 4.- Cuando se infunde GABA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 2 horas), tanto en amígdala así como en hipocampo, se tiene una latencia del SAG menor, comparada con la obtenida en corteza somatomotora.

- 5.- Cuando se infunde GABA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 2 horas), en amígdala e hipocampo se produce un SAG más duradero que el que se produce en corteza somatomotora, con infusiones de GABA semejantes. Posiblemente debido a que en estas dos estructuras el reclutamiento de neuronas que responden a la infusión de SAG es mayor, y en estas

células la conformación de subunidades del receptor GABA_A cambia, así como su farmacología después de la infusión de GABA.

6.- Esta hiperexcitabilidad producida en la amígdala y el hipocampo se propaga a estructuras lejanas durante las primeras horas del SAG.

7.- La actividad paroxística observada en los registros EEG de SAG en amígdala e hipocampo tiene diferentes patrones electroencefalográficos que los observados en corteza somatomotora.

8.- La actividad paroxística genera una despoblación neuronoglia observada con la tinción de GFAP, en las áreas cercanas al sitio de infusión.

9.- El SAG 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.

●●●● REFERENCIAS

Araki, T., Kato, M. y Kobayashi, T. (1995). Limbic Seizures Originating in the Olfactory Bulb: an electro-behavioral and glucose metabolism study. *Brain Research*. 693. 207-216.

Ashton, D., Fransen, J., Heeres, J., Clincke, G.H. y Janssen, P.A. (1992). In vivo Studies on the Mechanism of Action of the broad Spectrum Anticonvulsant Loreclezole. *Epilepsy Research*. 11. 27-36.

Barcia, J.A., Rubio, P., Alos, M., Serralta, A. Y Belda, V. (1999). Anticonvulsant and Neurotoxic Effects of Intracerebroventricular Injection of Phenytoin, Phenobarbital and Carbamazepine in an Amygdala-Kindling Model of Epilepsy in the rat. *Epilepsy Research*. 33 (2-3) 159-167.

Brailowsky, S. (1991). El síndrome de abstinencia a GABA: Un Modelo de Epileptogénesis focal. En *Epilepsia experimental*. Eds. Simón Brailowsky y Enrique Otero-Siliceo. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Academia de Neurología. México, D.F. pp. 121-129.

Brailowsky, S. (1992). El Sistema GABAérgico Cortical en dos Modelos de Epilepsia Experimental. *Gaceta Médica de México*. 128 (4). 447-451.

Brailowsky, S., Hirsch, E. y Marescaux, C. (1997). *Elementos Fisiopatológicos de los procesos Epilépticos*. En *Epilepsia*. Aspectos neurobiológicos, médicos y Sociales. Segunda edición. Editores Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, A. y Rubio-Donnadieu, F. Cogons. México. pp. 103-146.

Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D. and Naquet, R. (1988). The GABA-Withdrawal Syndrome: a New Model of Focal Epileptogenesis. *Brain Research*. 442. 175-179.

Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. and Naquet, R. (1987). Epileptogenic g-Acid-Withdrawal Syndrome in Baboons. *Neuroscience Letters*. 74. 75-80.

Brailowsky, S. y Montiel, T. (1991). "Isoguvacine Suppression Induces Long-Lasting Epileptogenic Changes in the Rat". *Soc. Neuroscience Abstracts*. 17. 174.

Brailowsky, S., Montiel, T., Meneses, S. y DiScala, G. (1995). Effects of GABA_B receptor antagonist on two models of focal epileptogenesis. *Brain Research*. 702. 126-132.

Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Menini, C., Riche, D., y Naquet, R., (1990). *Anticonvulsivant effects of intracortical chronic infusion of GABA in generalized*

epilepsy. En: *Generalized Epilepsy, Cellular, Molecular and Pharmacological Approaches*. Editores Avoli, M., Gloor, P., Kostopoulos, G., y Naquet, R. Birkhauser, Boston. pp. 126-136.

Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., y Naquet, R., (1989). Elementos Fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*. 12(1) pp- 53-62.

Brown, T.H., y Zador, A.M. (1990). Hippocampus. En: *The Synaptic Organization of the Brain*. Tercera edición. Editado por. Gordon M. Shepherd. Oxford University Press. New Work. pp. 346- 388.

Bu, D.F., Erlyer, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J., Kaufman, D.L., Wagner-McPherson, C.B., Evans, G.A. y Tobin, A.J. (1992). Two human Glutamate Decarboxylases, 65k-Da GAD and 67kDa GAD, are each encoded by a Single Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 89. 2115-2119.

Calixto, E., López-Colomé, A.M., Casasola, C., Montiel, T., Bargas, J. and Brailowsky, S. (2000). Neocortical Hyperexcitabilidad after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Research*. 39. 13-26

Calixto, E., Montiel, T., Menini, C. and Brailowsky, S. (1995). Allopregnanolone Potentiates a GABA-Withdrawal Syndrome in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters*. 195. 73-76.

Calkin, P. y Barnes, E. (1994). γ -aminobutyric acid a (GABA_A) agonist down-regulate GABA_A /benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 269. 1548-1553.

De Blas, A. (1996). Brain GABA_A Receptors Studied With Subunit- Specific Antibodies. *Molecular Neurobiology*. 12. 55-71.

DeLorey, M.T. y Olsen, R.W. *GABA and Glycine*. En Segel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W. y Molinoff, P.B. (Eds), *Basic Neurochemistry*, 5ta Ed.: Raven Press New York. (1994). 389-399.

De Olmos, J., Alheid, G.F., y Beltramino, C.A. (1985). *Amygdala*. En Paxinos G. editor. *The Rat Nervous System*. Volume 1. Forebrain and Midbrain. Academic Press Australia. Australia. pp. 223-317.

Dreifuss, F.E. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Edited by Engel, Jr and Pedley. Philadelphia. (1997). pp. 517-524.

Engel, J. Jr. (1992) *Experimental animal models of Epilepsy Classification and Relevance to human epileptic Phenomena*. En *Neurotransmitters in Epilepsy*. Epilepsy

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Research. (suppl. 8). Edited by Avanzini, G., Engel, J. Jr., Fariello, R and Heinemann U. Elsevier. Amsterdam. 9-20.

Feldman, D.S. y Buccafusco, J.J. (1997). Spinal Muscarinic, Glutamatergic and GABAergic Receptor Systems in Cardiovascular Regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 281 (1) 274-283.

Fritschy, J-M. and Möhler, H. (1995). GABA_A-Receptor Heterogeneity in the Adult Rat Brain: Differential Regional and Cellular Distribution of Seven Major Subunits. *The Journal of Comparative Neurology*. 359. 154- 194.

Fukuda, H., Brailowsky, S. Menin, CH., Silva-Barrat, C., and Naquet, R. (1987). Anticonvulsivant effect of Intracortical, Cronic Infusion of GABA in Kindled Rats: Focal Seizures Upon Withdrawal. *Experimental. Neurology*. 98. 120-129.

Gabbott, P.L.A. y Somogyi, P. (1986). Quantitative Distribution of GABA-immunoreactive Neurons in the Visual Cortex (area 17) of the Cat. *Experimental Brain Research*. 61. 323-331.

García-Ugalde, G., Galarraga, E., Bargas, J. y Brailowsky, S. (1992). Hypereccitability of Hippocampal CA1 region in Brain Slices after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*. 142. 229-232.

Goddard, G.V., McIntyre, D. C. y Leechc, K. (1969). A Permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation. *Experimental Neurology*. 25(3). 295-329.

Hevers, W. y Lüddens (1998). The Diversity of GABA_A Receptors. pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Molecular Neurobiology*. 18(1) 35-86.

Hughes, J.R. (1989). The Significance of the Interictal Spike Discharge: a review. *Journal of clinical Neurophysiology*. 6. 207-226.

Impagnatiello, F., Pesold, C., Longone, P., Caruncho, H., Fritschy, J.M., Costa, E. y Gudotti, A. (1996) Modifications of γ -Aminobutyric Acid_A Receptor Subunit Expression in Rat Neocortex during Tolerance to Diazepam. *Molecular Pharmacology* 49. 822-831.

Iversen, S.D. e Iversen, L.L.(1981).*Behavioral Pharmacology*. Second Edition. Oxford University Press. New York.

Janigro, D y Shwartzkroin, (1988). Effects of GABA on CA3 Piramidal Cell Dendrites in Rabbit Hippocampal Slices. *Brain Research*. 455. 265-274.

Jansen J. (1969). *Vertebrate history with special refecence to factors related to cerebellar evolution*. En: *On Cerebral Evolution and Organization from the point of view of a Morphologist*. Chicago:American Medical Association, pp 881-893.

Kamphuis,W, y Lopes Da Silva, F., (1991) The Kindling model of epilepsy: The Role of GABAergic Inhibition. *Neuroscience Research Comunitations*. 6 (1). 1-9.

Kaufman, D.L., Houser, C.R., y Tobin, A.J. (1991). Two formas of the Gamma-aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase have Distintic Intraneural Distributions and Cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry*. 56. 720-723.

Laurie, D.J., Seeburg, P.H. y Wisden, W. (1992). The Distribution of 13 GABA_A Receptor Subunit mRNAs in the Rat Brain. II. Olfactory Bulb and Cerebellum. *The journal of Neuroscience*. 12 (3). 1063-1076.

Le Gal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C. and Naquet, R. (1988). Local Asymtomatic Status Epilepticus Induced by Withdrawal of GABA Infusion into Limbic Structures. *Experimental Neurology*. 411-417.

Leidenheimer, N.J. (1996). Effect of PKG Activation on RecombinantGABA_A Receptors. *Molecular Brain Research*. 42. 131-134.

Levy, R.H., Mattson, R.H. y Meldrum, B.S. *Antiepileptic Drugs*. Fourth Edition. Rave Press. New York. (1995).

López Austin, A. *Textos de Medicina Náhuatl*. Códice Badiano. México. 1984.; Ed. Universidad Nacional Autónoma de México.

Llinás, R.R. y Walton, K.D. (1990). Cerebellum. En *The Synaptic Organzation of the Brain*. Tercera edición. Editado por Gordon M. Shepherd, Oxford University Press. New York. 214-245.

Maed,T., Hashizume, K. Y Tanaka, T. (1999). Effect of Hypothermia on Kainic Acid-Induced Limbic Seizures: an Electroencephalographic and 14C-deoxiglucose Autoradiographic Study. *Brain Research*. 818 (2). 228-235.

MacDonal. R.L. Benzodiazepines. En *Antiepileptic Drugs*. Levy, R.H., Mattson, R.H. y Meldrum, B.S. Fourth Edition. Rave Press. New York. (1992).pp. 695-703.

MacDonald y Olsen, (1994). GABA_A Receptor Channels. *Annual Review of Neuroscience*. 17. 569-602.

Machu, T.K. Firestone, J.A. and Browning, M.D. (1993). Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein Kinase II and Kinase C Phosphorylate a Synthetic Peptide

Corresponding to a Sequence that is Specific for the γ_{2L} Subunit of the GABA_A Receptor. *Journal of Neurochemistry*. 61. 375-377.

McIntyre, D.C., Kelly, M.E. y Dufresne, C. (1999). Fast and Slow Amygdala Kindling rat Strains: Comparison of Amygdala, Hippocampal, Piriform and Perirhinal Cortex Kindling. *Epilepsy Research*. 35 (3). 197-209.

Matsumoto, H., Ayala, G.F. y Gunnit, R. J. (1969). Neuronal Behavior and Triggering Mechanisms in Cortical Epileptic Focus, *Journal of Neurophysiol* 32: 688-703.

McKernan, R.M. and Whiting, P.J. (1996). Which GABA_A -Receptor Subtypes Really Occur in the Brain?. *Trends in Neurociencias*. 19 (4). 139-143.

Menini, C., Mraovitch, S., Calyo, Y., Delasayette, V., Silva-Barrat, Brailowsky, S., y Seylaz, J. (1991). Metabolic Anatomy of the Focal Epilepsy Produced by Cessation of Chronic intracortical GABA Infusión in the Rat. *Neuroscience*. 41. 607-615.

Nestler, E.J. y Greengard, P. (1994). *Protein Phosphorylation and the Regulation of Neural Function*. En Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Siegel, G. J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. y Molinoff, P.B. editores. Raven Press, New York. 449-474.

Nusser, Z., Hájos, N., Somogyi, P. y Mody I. (1998). Increased Number of Synaptic GABA_A Receptors Underlies Potentiation at Hippocampal Inhibitory Synapses. *Nature*. 395. 172-177.

Parsian, A. y Cloninger, C.R. (1997). Human GABA_A Receptor $\alpha 1$ and $\alpha 3$ Subunits Genes and Alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 21 (3). 430-433.

Paxinos, G., y Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd. San Diego, California. Ed. Academic Press.

Pesold, C., Caruncho, H.J., Impagnatiello, F., Berg, M.J., Fritschy, J-M., Guidotti, A. y Costa, E. (1997). Tolerance to Diazepam and Changes in GABA_A Receptor Subunit Expression in Rat Neocortical Areas. *Neuroscience* 79 (2). 477-487.

Raymon, L.A., Blackstone, C.D., y Huganir, R.L. (1993) Phosphorylation of Amino Acid Neurotransmitter Receptors in Synaptic Plasticity. *TINS* 16 (4). 147-153.

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. *Journal of Neurochemistry*, 58, 158-166.

Romer, A.S., (1969) *Vertebrate history with special refecence to factors related to cerebellar evolution*. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development* (Llinás, R., ed.). Chicago: American Medical Association, pp. 1-18.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., y Tapia, R. (1994) Decrease of glutamato descarboxylase activity after *in vivo* cortical infusión of γ -aminobutyric acid. *Neurochemical International*, 24, 363-368.

Schwarzer, C., Tsunashima, K., Wanzenbock, C., Fuchs, K., Sieghart, W. y Sperk, G. (1997). GABA_A Receptor subunits in the Rat Hippocampus II: Altered Distribution in Kainic Acid-Induced Temporal Lobe Epilepsy. *Neuroscience*. 80(4). 1001-1017.

Shepherd, G.M. Y Greer, C.A. (1990). *Olfactory Bulb*. En: *The Synaptic Organization of the Brain*. Third Edition. Ed. Oxford University Press. Unites States of America. Pp. 133-169.

Shiple, M., McLean, J.H. y Ennis, M. (1995). Olfactory System. En *The Rat Nervous System*. Second Edition. Edited by George Paxinos. Academic Press. United States of America. 899-926.

Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. (1995). A Potassium Current Controls burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*. 189. 105-108.

Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J., y Naquet, R. (1992). Burst generaton in Neocortical Neurons after GABA Widrawal in the Rat. *Journal of Neurophysiology*, 67, 715-727.

Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S. Menini, C. and Naquet, R. (1989). Relationship between Tolerance to GABA_A Agonist and Bursting Properties in Neocortical Neurons during GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Research*. 498. 289-298.

Stelzer A., Kay, A.R. y Wong, R.K.S. (1988). GABA_A-Receptor Funtion in Hippocampal Cells is Mainteined by Phosphorylation Factors. *Science*. 241. 339-341.

Sternberger, L.A. (1979).The Unlabeled Antibody Peroxidase Antiperoxidase (PAP) Method. En: *Immunocytochemistry*, Ed. John Wiley & Sons. United States of America. Pp- 104-169.

Tapia, R. (1991). Alteraciones Neuroquímicas Asocoadas a las Epilepsas. En: *Epilepsia experimental*. Eds. Simón Brailowsky y Enrique Otero-Siliceo.Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Academia de Neurología. México, D.F. pp. 37-45.

Tehrani, J.M.H. y Barnes, E. (1988). GABA down-regulation the GABA/benzodiazepine receptor complex in developing cerebral neurons. *Neuroscience Letters*. 87. 288-292.

Traub, R.D y Miles, R. (1991). *Neuronal Networks of the hippocampus*. Cambridge University Press. United States of America. pp. 1-33.

Tsunashima, K., Schwarzer, C., Kirchmair, E., y Sieghart, W., (1997). GABA_A Receptor Subunits in the Rat Hippocampus III. Altered Messenger RNA Expression in Kainic Acid-Induced Epilepsy. *Neuroscience* 80 (4). 1019-1032.

Voogd, J. y Glickstein, M. (1998). Anatomy of Cerebellum. *Trends in Neuroscience*. 21. 370-375.

Whiting, P.J., McKernan, R.M. y Wafford, K.A. (1995). Structure and Pharmacology of Vertebrate GABA_A Receptor. *International Review of Neurobiology*. 38. 95-138.

Wieland, H., Lüddens, H. Y Seeburg, P.H. (1992). A Single Histidine in GABA_A Receptors is Essential for Benzodiazepine Agonist Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 257. 1426-1429.

Wisden, W. Laurie, D.J., Monyer, H. y Seeburg, P.H. (1992). The Distribution of 13 GABA_A Receptor Subunit mRNAs in the Rat Brain. I. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon. *The journal of Neuroscience*. 12 (3). 1040-1062

World Health Organization (1997) OMS.
<http://wwwhq.who.or.jp/inf/fs/fact165.html>.

Wu, Y., Rosenberg, H.C., Chiu, T.H. y Zhao, T-J. (1994) Subunit-and Brain Region-Specific Reduction of GABA_A Receptor Subunit mRNAs During Chronic Treatment of Rats with Diazepam. *Journal of Molecular Neurosciences*. 5 (2) 105-120.

Yin, H-S. y Lee, Y-P. (1998). Effects of Pentobarbital on the Expression of GABA_A Receptor β 1 mRNA in the Hippocampus: Differential Responses of CA1 and CA3. *Synapse*. 29(4) 371-378.

Yokoyama, H., Mori, N., Osonoe, K., Ishida, S. YKumashiro, H. (1992). Anticonvulsivant effect of Liposome-entrapped Superoxide Dismutasein Amygdaloid-kindled rats. *Brain Research*. 572 (1-2). 273-275.

Zilles, K. y Wree, A. (1995). Cortex: Areal and Laminar Structure. En: *The Rat Nervous System*. Second Edition. Edited by George Paxinos. Academic Press. United States of America. 649-685.