

01965 3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS FARMACOS ANTIEPILEPTICOS (DIACEPAM, VIGABATRINA Y GABAPENTIN) EN LOS RECEPTORES mu, BZD Y PROTEINA FOS

284248

T E S I S

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN PSICOBIOLOGIA

P R E S E N T A:

GRACIELA/JIMENEZ RUBIO

SINODALES:

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUISA L. ROCHA ARRIETA

COMITE DE TESIS: DRA. MARÍA CORSI CABRERA

DRA. SELENE CANSINO ORTIZ

MTRO. GUSTAVO BACHÁ MÉNDEZ

DR. RODOLFO ONDARZA ROVIRA

MEXICO, D. F.

FEBRERO DEL 2001



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.

A AYLÍN SINDARI:

AGRADECIMIENTOS

A Aylín Sindari: Porque representa el motor de mis logros

A Toño: Porque respeta y enriquece día a día mis metas

A mi Mamá: Porque se que esto sería importante para ella

A mi Papá: Porque se que apoya este y otros proyectos futuros

A mis hermanas: Por transmitirme su espíritu de lucha para lograr cualquier objetivo

Al Dr. Augusto Fernández-Guardiola. Por permitirme realizar este proyecto de investigación.

A la Dra. Luisa Rocha. Por sus enseñanzas, orientación y apoyo a este proyecto.

A Magdalena Briones y Eva González. Por brindarme su amistad y su colaboración técnica y experimental.

A Adrián Martínez. Por su asistencia incondicional en aspectos computacionales.

Al Dr. Gustavo Luna. Porque cada actividad que hago en el área de la investigación esta matizada con sus enseñanzas.

A Raúl Cardoso y José Luis Calderón. Por su excelente asistencia técnica.

A Vicky, Juanita, Magdalena y Graciela. Por su eficiencia administrativa y laboral durante este trabajo.

El presente estudio fue llevado a cabo en el Instituto Nacional de Psiquiatría (Ramón de la Fuente) y financiado parcialmente por esta institución (clave 3280) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) -programa de becas-crédito, no. de registro 119976; y proyecto con clave 31702-M-.

ÍNDICE

1. Epilepsia	
1.1 Definición	Pag. 2
1.2 Tipos de crisis y epilepsias	Pag. 3
1.3 Tratamiento Farmacológico	Pag. 4
2. Epilepsia Intratable	Pag. 5
3. Sistemas Inhibidores Endógenos	
3.1 Ácido Gamma-Amino-Butírico (GABA)	Pag. 9
3.1.1 GABA y Epilepsia	Pag. 11
3.2 Péptidos Opioides	Pag. 13
3.2.1 Péptidos Opioides y Epilepsia	Pag. 17
3.3 GABA y Opioides	Pag. 20
3.4 Diacepam	Pag. 23
3.4.1 DZP y Receptores a Benzodiazepinas (RBDZ)	Pag. 24
3.5 Gabapentin (GBP)	Pag. 25
3.6 Vigabatrina (VGB)	Pag. 27
3.6.1 VGB y RBDZ	Pag. 29
3.7 Pentilenetetrazol (PTZ)	Pag. 29
4. Gen c-fos y Proteína Fos	Pag. 31
4.1 Crisis, antiepilépticos y Expresión de la Proteína Fos	Pag. 34
5. Planteamiento del Problema	Pag. 36
6. Hipótesis	Pag. 37
7. Objetivos	
7.1 Objetivo General	Pag. 38
7.2 Objetivos Específicos	Pag. 38
8. Método	
8.1 Sujetos	Pag. 38
8.2 Fármacos y Tratamientos	Pag. 39
8.3 Grupos Experimentales	
8.3.1 Estudios para la evaluación de receptores	Pag. 40
8.3.2 Estudio de la Expresión de la Proteína Fos	Pag. 41
8.4 Autorradiografía	Pag. 42
8.5 Análisis Conductual	Pag. 44
8.6 Perfusión e Inmunohistoquímica para detectar la Proteína Fos	Pag. 44
9. Resultados	
9.1 Unión al RBDZ y al receptor μ después de los tratamientos (agudo y subcrónico) con DZP, GBP y VGB	Pag. 47
9.2 Cambios conductuales inducidos por PTZ en ratas pretratadas con DZP, GBP y VGB	Pag. 52
9.3 Inmunorreactividad de la proteína Fos	Pag. 56
10. Discusión	Pag. 67
Bibliografía	Pag. 78

RESUMEN

JUSTIFICACIÓN. La exposición crónica de un agonista a su receptor produce una reducción en el número de receptores así como una disminución en la respuesta del sistema en el que está actuando. Se desconoce el efecto de la administración subcrónica de fármacos antiepilépticos de la nueva generación, como son la Vigabatrina (VGB) y el Gabapentin (GBP), en la unión al receptor a benzodiacepinas (RBDZ), al receptor μ de los opioides endógenos y en la expresión de la proteína Fos -la cual se ha empleado como índice de activación neuronal-. **MÉTODO.** Para el estudio de la unión a receptores, se utilizaron ratones macho (CD1), se les administró de manera aguda o subcrónica Diacepam (DZP) (10mg/Kg), GBP (100 mg/Kg) o VGB (500 mg/Kg), se sacrificaron por decapitación a la 24 hrs de la última administración y se procedió a realizar la técnica de autorradiografía *in vitro*. Para el análisis de la expresión de la proteína Fos se emplearon ratas macho (Wistar), se les administró una sola dosis de DZP, GBP o VGB, 1 h después se les aplicó Pentilene tetrazol (PTZ) (60 mg/Kg) y 2 hrs después se perfundieron, procediéndose entonces a realizar la técnica de inmunohistoquímica. **RESULTADOS.** El análisis de la unión al RBDZ demostró que tanto la administración aguda como subcrónica de DZP y GBP disminuyó la unión a este receptor en áreas cerebrales específicas, no observándose cambios después de la administración de VGB. Respecto a la unión al receptor μ , la administración aguda de DZP, GBP y VGB incrementó, mientras la subcrónica disminuyó la unión en este receptor. Por otro lado, todos los fármacos disminuyeron la expresión de la proteína Fos producida por PTZ, aunque en diferentes estructuras del cerebro de la rata. **CONCLUSIÓN.** El efecto de la administración subcrónica de DZP, GBP y VGB en la unión al RBDZ y al receptor μ , podría asociarse con un disminución en la neurotransmisión inhibitoria. Asimismo, el resultado en la expresión de la proteína Fos producto del pretratamiento con DZP, GBP y VGB mostró un mapeo de los sitios de posible inactivación neuronal, lo cual se puede asociar con sus efectos antiepilépticos. Por último, la falta de correlación entre las áreas en las cuales se observaron cambios en la unión al RBDZ y al receptor μ y las modificaciones en la expresión de la proteína Fos podría sugerir que otros genes de expresión temprana estén asociados con los cambios en estos receptores.

1. EPILEPSIA

1.1 DEFINICIÓN

La palabra epilepsia se deriva del griego επιλαμβάνειν (epilamvanein; ser tomado o sorprendido). Afecta aproximadamente al 1% de la población considerándose como uno de los trastornos neurológicos más comunes (Hauser y cols., 1993).

La epilepsia es una disfunción cerebral episódica que se caracteriza por crisis espontáneas impredecibles y recurrentes. El término crisis se refiere a una alteración transitoria de conducta debido a descargas repetitivas, sincronizadas y anormales de poblaciones neuronales en el sistema nervioso central (Shin y McNamara, 1994).

La sincronización anormal y la descarga neuronal observadas en la epilepsia pueden ser el resultado de la interacción de varios factores (McNamara, 1992), los cuales son: la habilidad de grupos de neuronas para generar descargas intrínsecas; la incapacidad de mecanismos inhibitorios, como el GABAérgico, para restringir el desarrollo de la crisis epiléptica; y, el aumento de la transmisión sináptica excitadora, en particular involucrando sinapsis glutamatérgicas usando receptores N-Metil-

D-Aspartato (NMDA).

1.2 TIPOS DE CRISIS Y DE EPILEPSIAS

Las crisis pueden ser clasificadas clínicamente en dos categorías: parciales y generalizadas. Las crisis parciales se restringen a un pequeño grupo de neuronas que constituyen un foco epiléptico. Pueden ser parciales simples (sin alteración de la conciencia) o parciales complejas (con alteración de la conciencia) (Kandel, 2000).

Las crisis generalizadas involucran a ambos hemisferios y se clasifican en crisis de ausencia, crisis mioclónicas, clónicas, tónicas, tónico-clónicas y atónicas. Las crisis de ausencia se observan comúnmente en niños y se caracterizan por un comienzo abrupto de la crisis, cese de toda actividad motora y pérdida de conciencia. Los pacientes pueden exhibir pequeñas manifestaciones motoras tal como pestañeos pero no se observan movimientos tónico-clónicos. La crisis tónico-clónica también comienza abruptamente, frecuentemente con un gruñido o llanto como contracción tónica del diafragma y tórax lo cual crea una espiración forzada. Durante la fase tónica el paciente puede caer al suelo rígidamente con la mandíbula apretada, perder el control de esfínteres y mostrar una apariencia azul (cianótica). La fase tónica típicamente dura 30 s antes de involucrar las sacudidas

clónicas de las extremidades, lo cual dura 1-2 min. Esta fase activa de la crisis tónico-clónica generalizada es seguida por una fase postictal (sommolencia, dolor de cabeza y muscular) (Kandel, 2000).

1.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Según una revisión llevada a cabo por Bazil y cols. (1998), el primer tratamiento farmacológico efectivo fue el Bromuro de Potasio, el cual se introdujo en 1857 (Locock, 1857) y se utilizó por más de 50 años hasta el descubrimiento de Fenobarbital en 1912 (Hauptman, 1909). La Fenitoína, sintetizada en 1908, se convirtió en una droga de primera elección cuando se descubrió su actividad antiepiléptica en 1938 (Merritt y Putnam, 1938). Trimetradiona, el primer tratamiento específico para las crisis de ausencia, se introdujo en 1946 (Richards y Everett, 1944; Lennox, 1945). Posteriormente, entre 1946 y 1978 se desarrollaron y aprobaron 16 drogas de las cuales la Primidona, Carbamazepina, Clonazepam, Ethosuximida y Valproato, son las más prescritas para el tratamiento de la epilepsia. A partir de 1993, 4 drogas se aprobaron en el mercado (Felbamato, GBP, Lamotrigina y Topiramato) y en la actualidad representan a las drogas de la nueva generación. Finalmente esperando aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) se encuentran la VGB y la Tiagabina (Bazil y cols., 1998).

Las drogas antiepilépticas ejercen su efecto principal a través de uno o más de los siguientes mecanismos: a) inhibición de descarga neuronal por bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje (Fenitoína, Carbamacepina, Lamotrigina, Valproato de Sodio, Topiramato); b) potenciación de la inhibición postsináptica mediada por GABA_A (Fenobarbital, DZP, GBP, VGB, Tiagabina); c) bloqueo de canales de calcio tipo T (Ethosuximida, Valproato); y d) bloqueo de la transmisión o liberación de glutamato (Pentobarbital, Felbamato, Lamotrigina, Topiramato) (Bazil y Pedley, 1998).

Las dosis efectivas para el humano y las características farmacocinéticas de las drogas mencionadas anteriormente se presentan en la tabla I; sus posibles mecanismos de acción y su eficacia en los diferentes tipos de crisis se presentan en la tabla II.

2. EPILEPSIA INTRATABLE

Se sabe que del 20 al 30% de los pacientes epilépticos son refractarios a tratamiento farmacológico (Regesta y Tanganelli, 1997). La intratabilidad de la epilepsia se asocia a crisis persistentes a pesar de una monoterapia tolerada al máximo o a la terapia que combina fármacos antiepilépticos; a la presencia de crisis repetidas durante periodos largos aún con tratamiento

Las drogas antiepilépticas ejercen su efecto principal a través de uno o más de los siguientes mecanismos: a) inhibición de descarga neuronal por bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje (Fenitoína, Carbamacepina, Lamotrigina, Valproato de Sodio, Topiramato); b) potenciación de la inhibición postsináptica mediada por GABA_A (Fenobarbital, DZP, GBP, VGB, Tiagabina); c) bloqueo de canales de calcio tipo T (Ethosuximida, Valproato); y d) bloqueo de la transmisión o liberación de glutamato (Pentobarbital, Felbamato, Lamotrigina, Topiramato) (Bazil y Pedley, 1998).

Las dosis efectivas para el humano y las características farmacocinéticas de las drogas mencionadas anteriormente se presentan en la tabla I; sus posibles mecanismos de acción y su eficacia en los diferentes tipos de crisis se presentan en la tabla II.

2. EPILEPSIA INTRATABLE

Se sabe que del 20 al 30% de los pacientes epilépticos son refractarios a tratamiento farmacológico (Regesta y Tanganelli, 1997). La intratabilidad de la epilepsia se asocia a crisis persistentes a pesar de una monoterapia tolerada al máximo o a la terapia que combina fármacos antiepilépticos; a la presencia de crisis repetidas durante periodos largos aún con tratamiento

de dosis altas y con la incapacidad del sujeto para realizar su vida normal (Cascino, 1990; Juul-Jensen, 1986; Schachter's, 1993).

Tabla I. Dosis efectiva y farmacocinética de drogas antiepilépticas				
Fármaco	Dosis usual para adulto 24 h (mg)	Vida media (h)	C.P. efectiva (mg/ml)	Pico Máx. de C.P. (h)
Fenitoína	300-400	22	10-20	3-8
Carbamazepina	800-1600	8-22	8-12	4-8
Pentobarbital	90-180	100	15-40	2-8
Valproato	1000-3000	15-20	50-120	3-8
Ethosuximida	750-1500	60	40-100	3-7
Felbamato	2400-3600	14-23	20-140	
GBP	800-3600	5-7	>2 ^a	2-3
Lamotrigina	100-500	12-60 ^b	1-4 ^a	2-5
Topiramato	200-400	19-25 ^b	NE ^c	2-4
VGB	1000-3000	5-7	NE	1-4
Tiagabina	32-56	5-13	NE	1

^aNo se ha establecido; corresponde a el rango usual en pacientes tratados con la dosis recomendada.
^bAltamente dependiente de drogas administradas.
^c NE, No se ha establecido.
 C.P.: Concentración Plasmática
 Tomado de Bazil y Pedley (1998).

No se sabe porqué y cómo la epilepsia llega a convertirse en un trastorno intratable. Regesta y Tanganelli (1997) establecen como posibles factores que predisponen a la intratabilidad a factores electroclínicos y biológicos. Dentro de los primeros se incluye un comienzo a edad temprana de las crisis, un tiempo prolongado antes de recibir tratamiento con antiepilépticos, una alta frecuencia de crisis, historia de

crisis febriles, tipo y persistencia de las crisis, estado epiléptico, síndromes epilépticos, estado neurológico anormal, alteraciones electroencefalográficas e historia familiar de epilepsia. Dentro de los factores biológicos se encuentran

Tabla II. Mecanismos de acción y aplicación de algunos antiepilépticos en diferentes tipos de crisis

Fármacos	Mecanismos	Crisis Parciales	Crisis Generalizadas		
			Tónicas y/o clónicas	Ausencia	LGS
Fenitoína	↓ Na+	+	+	-	-
Carbamazepina	↓ Na+	+	+	-	-
Pentobarbital	↑ GABA, ↓ Glutamato	+	+	-	-
Valproato	↓ Na+, ↓ GABA	+	+	+	+
Ethosuximida	↓ Ca	-	-	+	-
Felbamato	↓ Na+, ↓ Glutamato inhibic. NMDA	+	+	np	+
GBP	↓ Na+, ↓ GABA nuevo sitio de unión	+	+	+	np
Lamotrigina	↓ Na+, inhib. liber. Glutam.	+	+	+	+
Topiramato	bloqueo canales Na+, ↓ GABA	+	+	-	-
VGB	↑ GABA	+	±	*	+
Tiagabina	↑ GABA	+	+	-	-

LGS=Síndrome de Lennox-Gastaut, ↓disminución, ↑aumento, Na= Sodio, GABA= ácido gamma-amino-butírico, += efecto antiepiléptico, ± débil efecto, -=ningún efecto, *=puede exacerbar las crisis, np= no probado.
Tomado de Emilien y Maloteaux (1998).

procesos inflamatorios, neoplásicos y metabólicos, así como trastornos en la migración y desarrollo neural.

El tratamiento para la epilepsia refractaria a fármacos antiepilépticos es, en la mayoría de los casos, la resección del área epileptógena, lo que se conoce como tratamiento quirúrgico. Sin embargo, la cirugía para la epilepsia podría no ser necesaria si se sabe más acerca de la forma de prevenir la intratabilidad farmacológica o si se tienen drogas antiepilépticas menos tóxicas y efectivas (Theodore, 1992).

La epilepsia puede ser intratable desde el comienzo o puede llegar a ser intratable durante el tratamiento crónico con antiepilépticos (Löscher, 1997). Al respecto, se menciona que la intratabilidad depende entre otras cosas del tipo de tratamiento recibido tal como de la duración y la cantidad de este (Aicardi (1988). De hecho, el uso de un tipo de tratamiento, la politerapia, la cual es una práctica tradicional en la clínica, puede estar involucrada en la resistencia a las drogas (Jallon, 1997). Sin embargo, en la actualidad no hay estudios que aclaren el papel de la administración crónica de drogas antiepilépticas en la refractariedad a la epilepsia.

Así, la epilepsia intratable representa un reto para la investigación experimental y clínica, y el tener nuevos conocimientos y perspectivas de sus mecanismos permitirá una aproximación para su manejo racional en el futuro.

3. SISTEMAS INHIBIDORES ENDÓGENOS

3.1 ÁCIDO GAMMA-AMINO-BUTÍRICO (GABA)

El ácido gamma-amino-butírico (GABA) es una de las principales sustancias inhibitoras del Sistema Nervioso Central (SNC). Está presente en todo el cerebro y participa en aproximadamente 20-40% de las sinapsis (McCormick, 1989).

Respecto al metabolismo del GABA, se sabe que la enzima responsable de su síntesis es la glutamato descarboxilasa (GAD_{65} y GAD_{67}). La reacción catalizada por la GAD es la descarboxilación del grupo carboxilo alfa del ácido glutámico, dando como productos al GABA y CO_2 (Ganong, 1986). La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la transaminasa del GABA (GABA-T, 4-aminobutirato: 2-oxoglutarato aminotransferasa). Esta enzima, que requiere de fosfato de piridoxal como coenzima, cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al alfa-oxoglutarato, dando como productos semialdehído succínico y glutamato (Ganong, 1986).

El GABA sintetizado en las neuronas GABAérgicas se almacena en vesículas sinápticas y se libera por un mecanismo dependiente de calcio en respuesta a potenciales de acción que invaden las terminales nerviosas. Una vez en la hendidura sináptica, el GABA

interactúa con su receptor en la membrana sináptica (del cuerpo celular, dendritas o terminales axonales) de neuronas blanco y en el caso del receptor GABA_A (el cual se tratará más adelante), se abre el canal de cloro y se hiperpolariza a la célula (Haefely, 1987).

El GABA interactúa con tres tipos de sitios en el SNC: los receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C (Bormann y Feigenspan, 1995). El receptor GABA_A es una proteína compleja con sitios de reconocimiento para el GABA (el cual está acoplado a un canal de cloro), para benzodiazepinas (BDZ), barbitúricos, esteroides y picrotoxina (Bereau y Olsen, 1993).

En cuanto a la distribución de los receptores GABA_A de alta afinidad, se encuentran predominantemente en algunos núcleos talámicos y en las capas I-IV de la corteza frontoparietal, corteza del cíngulo anterior y giro dentado, mientras la distribución de los receptores GABA_A de baja afinidad se encuentran en altos niveles en la neocorteza, en el núcleo accumbens, giro dentado y áreas del hipocampo. Los RBDZ se localizan en la corteza cerebral, en el giro dentado, área CA1 del hipocampo, colículo superior y sustancia negra pars reticulata (Olsen y cols., 1990).

Respecto a la estructura del receptor GABA_A, éste tiene una

estequiometria $\alpha_2\beta_2$ alrededor de un ionóforo de cloro (Schofield y cols., 1987). La subunidad β es el sitio del reconocimiento del GABA, mientras la subunidad α contiene al sitio de reconocimiento para las BDZ. A esta subunidad α se le denomina RBDZ o receptor de modulación alostérica del receptor GABA_A, porque modula el enlace del GABA y la activación del receptor, afectando asimismo al canal de cloro (Haefely, 1992). Específicamente, las BDZ incrementan la frecuencia de apertura del canal de cloro.

3.1.1.1 GABA Y EPILEPSIA

Varios autores han señalado (Meldrum, 1979; Olsen y cols., 1986; Gale, 1992) que un déficit en la transmisión sináptica GABAérgica puede contribuir a la actividad hiperexcitable sincrónica del cerebro. Esto es apoyado, por un lado, por la efectividad de fármacos antiepilépticos que incrementan la transmisión GABAérgica (Gale, 1992), y por el otro porque la disminución de la actividad sináptica del GABA, resulta en crisis epilépticas (Olsen y cols., 1986).

Varias líneas experimentales relacionan a la epilepsia con una alteración en la actividad GABAérgica cerebral. Así, en pacientes epilépticos, la concentración de GABA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra disminuida (Wood y cols., 1979). Sujetos con crisis parciales complejas y crisis tónico-

clónicas generalizadas tienen niveles más bajos del GABA en el LCE que aquellos con crisis parciales simples; lo mismo se observa en niños con crisis febriles en comparación con sujetos controles (Schmidt y Loscher, 1981). Asimismo, se reporta una disminución en la concentración de GABA en el tejido que rodea al foco epiléptico producido por cobalto en el cerebro de rata (Ross y Graig, 1981).

Por otro lado, la actividad de la GAD se encuentra reducida en tejido obtenido de pacientes con crisis de tipo parcial (Lloyd y cols., 1981) y en animales con focos epilépticos producidos por la aplicación cortical de gel de alúmina (Ribak y cols., 1982).

Los cambios en los receptores a GABA y a BDZ varían según el modelo experimental. Respecto a los niveles de receptores GABAérgicos, se describe una reducción en la unión de [³H]GABA en tejido cerebral humano obtenido de pacientes epilépticos (Lloyd y cols., 1981) en gerbos susceptibles a crisis (Olsen y cols., 1985) y en ratones genéticamente susceptibles a crisis audiogénicas (Horton y cols., 1982). Por otro lado, existe una disminución en la unión al RBDZ en el foco epiléptico comparado con una región de referencia y con la neocorteza restante en pacientes con epilepsia idiopática (Savic y cols., 1988); un incremento en la unión al RBDZ en áreas cerebrales específicas de animales con "kindling" (modelo de epilepsia) (Nobrega y

cols., 1990; Shin y cols., 1985; Tuff y cols., 1983) y modificaciones bidireccionales en este receptor después de la administración de PTZ (Rocha y cols., 1996a; Syapin y Rickman, 1981) o de la administración de ácido kaínico (Rocha y cols., 1999a; Kish y cols., 1983; Tanaka y cols., 1992; Yoshida y cols., 1996).

3.2 PÉPTIDOS OPIOIDES

La palabra opio se deriva del nombre griego jugo, ya que la droga es obtenida del jugo de la amapola, *Papaver somniferum*. El término opioide se empleaba para designar drogas derivadas del opio tales como morfina y codeína. Después del desarrollo de entidades sintéticas con acciones parecidas a la morfina, la palabra opioide se acuñó para referirse en una forma genérica a todas las drogas (naturales o sintéticas) con acciones parecidas a la morfina (Jaffe y Martin, 1990).

En 1973, tres grupos de investigadores independientemente describieron sitios de unión estereoespecífica para drogas opioides en el sistema nervioso de mamíferos (Pert y Snyder, 1973; Simón y cols., 1973; Terenius, 1973). A este descubrimiento siguió la separación de dos pentapéptidos (met-enkefalina y leu-enkefalina) del cerebro del cerdo por Hughes y cols. (1975). Meses después, Goldstein y colaboradores (1975) reportaron la

presencia de sustancias parecidas a péptidos en la glándula pituitaria con actividad opioide. Posteriormente se descubrió que hay tres familias distintas de péptidos opioides (encefalinas, endorfinas y dinorfinas) y varios tipos de receptores.

Existen tres precursores de los péptidos opioides que son: la proopiomelanocortina (POMC) de la cual derivan la hormona estimulante de los melanocitos (γ -MSH), la adrenocorticotropina, la β -lipotropina, la β -endorfina y la β -MSH. Aunque β -endorfina contiene la secuencia para met-encefalina en su amino terminal, éste no se convierte a dicho péptido; la proencefalina que da origen a la met-encefalina, amidorfina, met-encefalina-Arg-Gly-Leu, metorfamida, leu-encefalina y met-encefalina-Arg-Phe; y la prodinorfina que da origen a la dinorfina A (1-17), la cual puede separarse además a dinorfina A (1-8), dinorfina B (1-13) y α - y β - neoendorfina, las cuales difieren una de otra por sólo un aminoácido (Evans y cols., 1988).

Los precursores de los péptidos opioides tienen una distribución diferencial en el SNC. La POMC está densamente distribuida en la estria terminalis, en el tálamo periventricular, en los núcleos basal, medial y arcuato del hipotálamo, en la sustancia gris periacueductal, en el núcleo parabraquial, en el núcleo del tracto solitario y en el lóbulo intermedio. La proencefalina esta ampliamente distribuida en el

núcleo olfatorio anterior, en el tubérculo olfatorio, en la amígdala, en varios núcleos talámicos, en la sustancia gris periacueductal y en el núcleo parabraquial. Por último, la prodinorfina está distribuida en el globo pálido ventral y sustancia negra pars reticulata (Goodman y cols., 1988).

La liberación de opioides es dependiente de calcio (Chavkin y cols., 1983) y requiere de estimulación de alta frecuencia de las neuronas (Wagner y cols., 1990). Los péptidos opioides se difunden a través del espacio extracelular y tienen una alta afinidad a sus receptores (Corbett y cols., 1982). Los opioides son capaces de afectar la excitabilidad de las neuronas que están lejanas a su sitio de liberación por lo que se consideran neuromoduladores (Drake y cols., 1994).

Los receptores a opioides se clasifican entre otros en: μ (mu), δ (delta) y κ (kappa), y se han identificado dos subtipos de cada categoría. Las encefalinas y la morfina se unen preferencialmente a los receptores μ y δ , mientras las dinorfinas y la ketociclazocina se unen al receptor κ . El antagonista naloxona se une con diferente afinidad a todos estos receptores (Itzhak, 1988).

Una vez unido a su receptor, los péptidos opioides activan canales de K^+ e inhiben el flujo de iones Na^+ , acciones mediadas

vía proteínas G_i y/o G_o . Se activa el canal de K^+ por el acoplamiento directo del receptor opioide vía una proteína G. En contraste, la inhibición del flujo de Na^+ es indirecta, mediada por la inhibición de la adenil-ciclasa y la subsecuente disminución de los niveles de AMPc y de la proteína-quinasa dependiente de AMPc (Nestler y cols., 1993).

La localización de los receptores a opioides tiene una distribución diferencial. Los receptores μ se encuentran principalmente en el estriado, la línea subcallosal, capas I y IV de la corteza cerebral, ciertos núcleos talámicos, hipotálamo, núcleo interpeduncular, capa celular piramidal del hipocampo y sustancia gris periacueductal. En contraste, los receptores δ están localizados principalmente en las capas II, III y V de la corteza cerebral, la amígdala, el tubérculo olfatorio, y núcleo pontino, y difusamente en el estriado, núcleo accumbens e hipocampo (Goodman y cols., 1988). Respecto a la distribución regional del receptor κ , éste se concentra en las capas V y VI de la corteza cerebral, en la corteza piriforme, núcleo caudado y núcleo accumbens, así como en la capa molecular del hipocampo (Goodman y cols., 1988).

Los péptidos opioides están relacionados con la analgesia, el estrés, la tolerancia y dependencia a drogas, las conductas de comer, beber, la ingesta de alcohol, la depresión, el

aprendizaje, la memoria, respuestas cardiovasculares, la regulación de la temperatura, la respiración, la actividad motora, enfermedades mentales, la agresión, la actividad sexual, el embarazo y el desarrollo, así como la epilepsia (Olson, 1997).

3.2.1 PÉPTIDOS OPIOIDES Y EPILEPSIA

Se sugiere que los péptidos opioides tienen un papel importante en la epilepsia (Albertson y cols., 1984; Bohme y cols., 1987; Tortella y Long, 1985) y en alteraciones conductuales inducidas por la misma (Engel y cols., 1982).

Respecto a la síntesis de péptidos opioides, se describe que una sola estimulación tipo "kindling" en animales incrementa la expresión del gen a la proencefalina (Shinoda y cols., (1991), y una dosis subconvulsivante de PTZ produce un incremento en la expresión de RNAm de proencefalina (Rocha y cols., 1999b). Por otro lado, se observa una disminución en los niveles de RNAm de prodinorfina a las 2 h (Moneta y Hollt, 1990) y 1 día (Harrison y cols., 1995; Morris y cols., 1987) después de crisis inducidas por "kindling".

Niveles elevados de inmunorreactividad de péptidos opioides se detectan en LCR de ratas después de choques electroconvulsivos (Tortella y Long, 1985; Iadarola y cols., 1986). Sin embargo, en

un modelo de estado epiléptico autosostenido inducido en ratas por medio de estimulación de la vía perforante, se observó una disminución en la inmunorreatividad a la dinorfina y encefalina en el giro dentado y área CA3 del hipocampo (Mazarati y cols., 1999).

Se sabe que el "kindling" (Vindrola y cols., 1981; Naranjo y cols., 1986; Talavera y cols., 1989) y las crisis inducidas por kainato (Douglass y cols., 1991; Lason y cols., 1992) modifican los niveles tisulares de péptidos opioides y sus precursores y que las crisis inducidas por PTZ producen una elevación en la liberación de IR-Met-encefalina en el estriado en experimentos "in vitro" (Zubieta y cols., 1985).

La liberación de péptidos opioides en la epilepsia se ha estudiado ampliamente. Así, pacientes con epilepsia tienen altos niveles de Leu-encefalina en el LCR (Jianguo y Xuekong, 1990). Por otro lado, un incremento en la liberación de péptidos opioides en la amígdala e hipocampo se observó después de la administración aguda de PTZ o por la estimulación simple o repetitiva de estimulación tipo "kindling" en ratas con crisis parciales; y una disminución en la amígdala en ratas con "kindled" total (Rocha y cols., 1994, 1999).

Empleando diferentes modelos de epilepsia se señala que, la

administración de agonistas de los receptores a opioides μ , δ y κ protegen en contra de las crisis (Albertson y cols., 1984; Bohme y cols., 1987; Schwark y cols., 1986), mientras que el antagonista opioide, naloxona facilita el desarrollo de las mismas (Fernández-Guardiola y cols., 1989; Garant y cols., 1985; Hardy y cols., 1980;). Sin embargo, los agonistas de los receptores a opioides μ , δ y κ aplicados directamente en el cerebro inducen crisis parecidas al "kindling" y convulsiones (Cain y cols., 1990). La administración de antagonistas de los receptores μ y δ y los agonistas del receptor κ protegen en contra de alteraciones producidas por el "kindling" eléctrico (De Coster y cols., 1994).

Existen evidencias de que los péptidos opioides presentan efectos bifásicos. Un incremento en los niveles de unión al receptor μ producto de tratamiento crónico con morfina o naloxona a ratas, facilita el desarrollo del kindling amigdalino, y produce un incremento en la latencia de aparición de crisis epilépticas subsecuentes (Rocha y cols., 1996b; Rocha y cols., 1991; Rocha y cols., 1993a).

Los receptores μ se modifican dependiendo del modelo de epilepsia utilizado. El "kindling" químico por PTZ disminuye la unión o el número de sitios de unión al receptor μ en varias estructuras del cerebro de la rata (Rocha y cols., 1996c, 1999b).

Mientras que el "kindling" eléctrico amigdalino produce un incremento en los niveles de unión a los receptores μ en varias regiones cerebrales de la rata (Rocha y cols., 1993a). Sin embargo, otros autores establecen que el "kindling" amigdalino produce una disminución selectiva en la densidad de unión al receptor μ en regiones hipocampales (Crain y cols., 1987).

Respecto a los receptores δ , se observó que el "kindling" químico por PTZ produce una disminución en el número de neuronas inmunorreactivas a la proteína del receptor delta en la amígdala y neocorteza en el cerebro del ratón (Rocha y cols., 1996c). Asimismo, el "kindling" amigdalino disminuye la densidad de unión de este receptor en el giro dentado del hipocampo de la rata (Crain y cols., 1987).

3.3 GABA Y OPIOIDES

Existen evidencias experimentales que indican una interacción entre GABA y opioides. Se establece que los opioides pueden modificar a los sistemas GABAérgicos (Ho y Gilliland, 1979) y que la administración de agonistas a opioides resulta en un incremento en el contenido de GABA (Tzeng y Ho, 1978). Además, la activación de receptores a opioides reduce el transporte de GABA del exterior al interior de las neuronas, lo cual resulta en una potenciación de las acciones de GABA (Cupello

e Hydén, 1981). Asimismo, observaciones conductuales, electrofisiológicas y neuroquímicas indican que los agonistas opioides ejercen efectos inhibidores en rutas de la sustancia nigra similares a las producidas por agonistas de GABA (Collingridge y Davies, 1982).

La morfina, un agonista opioide, modifica enzimas relacionadas a GABA (GAD) (Ho y Gilliland, 1979), y su administración repetida incrementa los niveles de GABA en áreas subcorticales y talámicas de ratas (Lin y cols., 1973), actúa directamente en los receptores a GABA (Breuker y cols., 1976) y su administración crónica resulta en "up-regulation" de receptores a GABA (Sivam y cols., 1981,1982). Asimismo, la administración intravenosa de muscimol, un agonista de GABA, potencia el efecto analgésico (Biggio y cols., 1977) y cataléptico de la morfina (Della Bella y cols., 1973; Knoll y Zsilla, 1974).

Por otro lado, la administración crónica de naloxona, morfina o met-enkefalina incrementan la unión al RBDZ en varias estructuras del sistema nervioso de la rata (Rocha y cols., 1993b). Asimismo, ratas con "kindled" amigdalino pretratadas crónicamente con morfina incrementan la unión al RBDZ en varias áreas del SNC (Rocha y cols., 1996b). El incremento en la unión al RBDZ observado en estos estudios está asociado con un

incremento en la función del complejo receptor GABA. Apoyando lo anterior, la administración de GBP, una droga antiepiléptica cuya posible acción es la modulación de GABA, incrementa los niveles de péptidos opioides extracelulares (Leu y Met-enkefalina) en la amígdala (Rocha y cols., 1999c).

Sin embargo, otras evidencias sugieren que el sistema de péptidos opioides tiene un efecto inhibitor sobre el neurotransmisor GABA. Los GABAmiméticos disminuyen la actividad epileptiforme inducida por encefalina en el ventrículo lateral (Dzoljic y Van Der Poel-Heisterkamp, 1980), la administración de naloxona disminuye la dosis de bicuculina necesaria para producir crisis epilépticas, y la naloxona, morfina, levorfanol, dextrorfan y bicuculina desplazan a [³H]GABA de sitios receptores GABA en homogenados de cerebelo de humano (Breuker y cols., 1976; Dingledine y cols. 1978).

La aplicación exógena de agonistas μ y δ inhiben la liberación de GABA de interneuronas, resultando en un incremento en la excitabilidad de células granulares y piramidales (Lupica, 1995; Piquet y North, 1993; Zieglgänsberger y cols., 1979). También reducen la inhibición tónica en el hipocampo por disminuir la frecuencia de potenciales sinápticos inhibitorios a través de una acción directa en terminales GABAérgicas presinápticas (Rekling, 1993). Asimismo, regulan la inducción de

potenciación a largo plazo en el giro dentado del hipocampo, mecanismo que depende de la inhibición de la neurotransmisión GABAérgica (Bramham y Sarvey, 1996; Xie y Lewis, 1995). Por último, reducen o bloquean las corrientes internas inducidas por GABA en el SNC de *Lymnaea stagnalis* L (Rozsa y cols., 1996).

3.4 DIACEPAM

Diacepam (DZP; 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-uno) es una benzodiazepina que tiene acciones sedantes, antiepilépticas, tranquilizantes y miorelajantes.

El DZP es una benzodiazepina de absorción rápida alcanzando su concentración máxima en plasma aproximadamente en una hora. Este fármaco se une a las proteínas plasmáticas en casi un 99%. Su volumen de distribución es de 1.1 litros por kilogramo y su vida media de eliminación es de 5 días. El DZP sufre un proceso de desmetilación y oxidación (hidroxilación), para transformarse en nordiacepam, sustancia farmacológica activa; posteriormente en hidroxidiacepam y por último en oxacepam, biotransformaciones que se llevan a cabo en el hígado. Tanto la droga madre como el metabolito desmetilado tienen una vida media plasmática de 1 a 2 días aproximadamente (Rall, 1990).

Los efectos del DZP resultan de su habilidad en la

potenciación de la neurotransmisión GABAérgica, vía su acción moduladora en el RBDZ (Menini y cols., 1987; Olsen, 1987). En la clínica DZP se utiliza principalmente para el tratamiento del estado epiléptico. En animales, este fármaco previene las crisis inducidas por PTZ, sin embargo, es menos eficaz en controlar las crisis producidas por electrochoque máximo (Rall, 1990). Al respecto, en modelos experimentales de epilepsia, las BDZ, incluyendo a DZP, suprimen la propagación de la actividad epiléptica producida por el foco epileptogénico en la corteza, tálamo y estructuras límbicas pero no abole la descarga anormal del foco. Además, DZP suprime las crisis generalizadas inducidas por el "kindling" en ratas aunque no produce reducción en la postdescarga producida por el estímulo (Albright y Burnham, 1980).

3.4.1 DZP Y RBDZ

El estudio de la unión al RBDZ después de la administración de DZP (aguda o crónica) ha arrojado resultados diversos. Algunos autores han mostrado, que la administración subaguda o crónica de DZP no modifica la unión de [³H]Flunitrazepam (benzodiazepina radioactiva) en estructuras analizadas del cerebro de la rata (Brett y Pratt, 1995; Maloteaux y cols., 1987; Moratalla y cols., 1989). Otros estudios han mostrado, sin embargo, que la administración crónica de DZP produce una disminución

significativa en la unión al RBDZ (Grimm y Hershkowitz, 1981; Rosenberg y Chiu, 1979) o un incremento (Distefano y cols., 1979). La administración crónica de DZP a pacientes que sufren de ansiedad produce un incremento en la densidad de RBDZ periféricos (Ferrarese y cols., 1990).

En estudios en los que además de administrar aguda o crónicamente DZP se administra GABA se observó que este fármaco es incapaz de incrementar la unión de [³H]Flunitrazepam al RBDZ (Gallager y cols., 1984; Holt y cols., 1999). Sin embargo, otros estudios muestran que la administración de GABA disminuye (Brett y Pratt, 1995; Holt y cols., 1999) o incrementa (Brett y Pratt, 1995) la unión de [³H]Flunitrazepam en estructuras específicas de animales.

3.5 GABAPENTIN

Gabapentin (GBP, ácido 1-(aminometil)ciclohexanoacético; Neurontin, Parke Davis] se aprobó en 1993 por la Food and Drug Administration para el tratamiento de las crisis parciales complejas, con y sin generalización.

Respecto a la farmacocinética de GBP, los niveles pico en plasma se detectan 2 a 3 h después de la ingestión oral de una cápsula de 300 mg (Bartoszyk y cols., 1986). Este fármaco tiene

una vida media de 5 a 9 h (Foot y Wallace, 1991; Bialer, 1993; Goa y Sorkin, 1993). No se une a proteínas plasmáticas (Vollmer y cols., 1986) y tiene un volumen de distribución de 60 L (Richens, 1993), sugiriendo una amplia distribución y concentración en tejido. GBP no es metabolizado en humanos (Hengy y Kolle, 1985) y es excretado sin cambios en la orina (Vollmer y cols., 1986) con una vida media de eliminación de 0.1 a 5.3 h (Schmidt, 1989).

El mecanismo de acción de GBP se desconoce, sin embargo, Taylor y cols. (1998) sugieren los siguientes: 1) atraviesa barreras de membrana en el cuerpo vía un transportador de aminoácidos específico (sistema L) compitiendo con aminoácidos excitadores; 2) se une con alta afinidad a un nuevo sitio de unión que está asociado con una subunidad auxiliar de canales de Ca^{2+} en áreas tales como: corteza cerebral, hipocampo y cerebelo; 3) reduce la liberación de varios neurotransmisores monoaminérgicos; 4) inhibe canales de Na^{+} activados por voltaje; y por último, 5) aumenta la concentración y la síntesis de GABA.

Además, se sugiere que el efecto antiepiléptico de GBP se asocia con la activación de sistemas de péptidos opioides, ya que éste incrementa la liberación de Met y Leu-encefalina en el cerebro de la rata (Rocha y cols., 1999c).

GBP se ha estudiado en una amplia variedad de modelos animales de crisis epilépticas (Foot y Wallace, 1991; Taylor, 1993,1994). En el modelo de electrochoque máximo es tan efectivo como la fenitofina en prevenir las crisis. La dosis efectiva de GBP para bloquear crisis tipo "kindled" total hipocampal es de 30 mg/Kg. Las dosis arriba de 100 mg/Kg no bloquea completamente las crisis parciales en el modelo de "kindling". Este fármaco también incrementa el umbral de crisis clónicas inducidas en ratón por PTZ, pero no por bicuculina, picrotoxina o estriquina. GBP prolonga la latencia a crisis tónico-clónicas y muerte después de la inyección de NMDA, pero no de kainato y quisquilato. Este fármaco es inefectivo en crisis de ausencia en rata y en crisis mioclónicas inducidas en babuinos fotosensibles (McLean, 1995).

3.6 VIGABATRINA

Vigabatrina (VGB; ácido 4-amino-5-hexenoico γ -vinil-GABA) es un análogo estructural del GABA con un grupo vinil.

Se establece que la absorción de VGB en humanos es rápida, con un pico de concentración máximo alcanzado en las primeras dos horas después de una dosis de entre 0.5 y 3 g. Su vida media terminal está entre 5 y 7 h y este se detecta en el plasma 24 h

después de su administración. Aproximadamente el 60-80% de VGB puede recuperarse sin cambios en la orina de las 0 a 24 h después de su administración (Ben-Menachem, 1995; Haegele y Schechter, 1986; Saletu y cols., 1986).

VGB es un inhibidor irreversible de la GABA-transaminasa (GABA-T), la enzima responsable de la degradación del GABA (Lippert y cols., 1977; Schechter y cols., 1979), lo que resulta en un aumento en el contenido de GABA, de β -alanina, homocarnosina e hipotaurina, y a una declinación de la actividad de la GABA-T, de la GAD y de los niveles de aspartato, glutamato y glutamina (Ben-Manachem y cols., 1993; Paulsen y Fonnum, 1988; Perry y cols., 1979).

Los efectos antiepilépticos de VGB se han evaluado en varios modelos de epilepsia. Protege de crisis inducidas por estriquina (Leppik, 1994); isoniazida (Bernasconi y cols., 1988; Schechter y cols., 1979); crisis audiogénicas (Schechter y cols., 1979); "kindled" amigdalino (Kalichman y cols., 1982; Löscher y cols., 1987); PTZ (Bernasconi y cols., 1988; Gale, 1986); picrotoxina (Bernasconi y cols., 1988); electrochoque máximo (Gale, 1986; Leppik, 1994) y bicuculina (Gale, 1986; Kendall y cols., 1981). Otros autores reportan que VGB es menos potente o es inefectiva en crisis inducidas por PTZ (Leppik, 1994; Jung y Palfreyman,

1995); picrotoxina (Leppik, 1994; Jung y Palfreyman, 1995); electrochoque máximo (Bernasconi y cols., 1988; Jung y Palfreyman, 1995) y bicuculina (Leppik, 1994).

En la clínica, VGB es eficaz en pacientes que sufren crisis parciales simples (Mumford y Dam, 1989); en crisis parciales complejas refractarias o no a tratamiento farmacológico (Sivenius y cols., 1991); en espasmos infantiles por esclerosis tuberal (Vles y cols., 1993) y en niños que sufren el síndrome de Lennox-Gastaut (Appelton, 1993).

3.6.1 VGB Y RBDZ

Existen estudios que indican que la administración aguda o crónica de VGB en animales y humanos produce una disminución en la unión al RBDZ (Miller y cols., 1988), mientras que en otros no se reporta ninguna modificación (Halonen y cols., 1991; Schmid y cols., 1996; Verhoeff y cols., 1999).

3.7 PENTILENETETRAZOL

Pentilenetetrazol (PTZ ;6,7,8,9-Tetrahidro-5H-tetrazolo[1-5-a]azepina) es un estimulante del SNC (Budavari y cols., 1989) que tiene una vida media de 3.8 h (Vohland y Koransky, 1972).

PTZ es un potente convulsivante empleado como modelo experimental para producir descargas epileptiformes focales o generalizadas en el SNC de mamíferos (Marsan, 1969). Las crisis inducidas por PTZ son diferentes de las producidas por la estriocina pero similares de las inducidas por picrotoxina (Woodbury, 1980).

Los mecanismos por los cuales PTZ produce actividad epiléptica aún no están totalmente definidos. Hay evidencias que indican que PTZ puede inhibir la neurotransmisión mediada por GABA (Corda y cols., 1990). De acuerdo con lo anterior, se demostró que PTZ produce crisis por actuar en un sitio sensible a picrotoxina del complejo GABA (Ramanjaneyulu y Ticku, 1984); y que las BDZ, las cuales se sabe que facilitan la transmisión GABAérgica, antagonizan las crisis inducidas por PTZ (Tallman y cols., 1980). Se describe que este fármaco inhibe competitivamente la unión de BDZ en la corteza (Rehavi y cols., 1982).

Utilizando la técnica de autorradiografía se observó una disminución en la unión de [³H]-Flunitrazepam en todas las áreas evaluadas después de la administración aguda y repetida de PTZ (Rocha y cols., 1996a). Sin embargo, en otro estudio se mostró que, inyecciones diarias de una dosis subconvulsivante de PTZ induce el "kindling" químico y un incremento en la unión de

[³H]DZP en el cerebro anterior (Syapin y Rickman, 1981).

Miller y cols. (1987) mostraron que las crisis inducidas por PTZ se producen por la activación de la formación reticular, el tálamo anterior medial, el hipotálamo caudal y regiones bulbares que coinciden con rutas motoras descendentes a la médula espinal. Por otra parte, la actividad epiléptica sostenida inducida por PTZ produce cambios en el soma de las neuronas y en células gliales (Schulze-Bonhage y cols., 1995). La administración de PTZ produce un incremento del RNAm del gen c-fos en todo el cerebro (Morgan y cols., 1987) y de la proteína Fos en el giro dentado, amígdala caudal, partes de la corteza cerebral, núcleo rojo de la estria terminalis, varios núcleos talámicos, el núcleo parabraquial terminal y el núcleo del tracto solitario (Shehab y cols., 1992).

4. GEN C-FOS Y PROTEÍNA FOS

El gen viral c-fos se aisló en 1982 como el oncogen del virus sarcoma osteogénico murine Finkel-Biskis-Jenkins (Curran y Teich, 1982). Su contraparte celular c-fos se describió poco después (Curran y cols., 1983). Este gen se clasifica como gen de expresión temprana, por analogía a los virus de genes de expresión temprana (Lau y Nathans, 1987; Curran y Morgan, 1987). A los genes de expresión temprana también se les denomina

[³H]DZP en el cerebro anterior (Syapin y Rickman, 1981).

Miller y cols. (1987) mostraron que las crisis inducidas por PTZ se producen por la activación de la formación reticular, el tálamo anterior medial, el hipotálamo caudal y regiones bulbares que coinciden con rutas motoras descendentes a la médula espinal. Por otra parte, la actividad epiléptica sostenida inducida por PTZ produce cambios en el soma de las neuronas y en células gliales (Schulze-Bonhage y cols., 1995). La administración de PTZ produce un incremento del RNAm del gen c-fos en todo el cerebro (Morgan y cols., 1987) y de la proteína Fos en el giro dentado, amígdala caudal, partes de la corteza cerebral, núcleo rojo de la estria terminalis, varios núcleos talámicos, el núcleo parabraquial terminal y el núcleo del tracto solitario (Shehab y cols., 1992).

4. GEN C-FOS Y PROTEÍNA FOS

El gen viral c-fos se aisló en 1982 como el oncogen del virus sarcoma osteogénico murine Finkel-Biskis-Jenkins (Curran y Teich, 1982). Su contraparte celular c-fos se describió poco después (Curran y cols., 1983). Este gen se clasifica como gen de expresión temprana, por analogía a los virus de genes de expresión temprana (Lau y Nathans, 1987; Curran y Morgan, 1987). A los genes de expresión temprana también se les denomina

terceros mensajeros, porque ellos son el próximo paso bioquímico que sigue a la activación de los segundos mensajeros (Tippettts y cols., 1988). Algunos de los genes de expresión temprana (tal como c-fos) se conocen como proto-oncogenes nucleares, porque sus productos proteínicos se acumulan en el núcleo celular y su homólogo oncogen nuclear pueden transformar a las células (Sambucetti y Curran, 1986).

El gen c-fos codifica una fosfoproteína nuclear llamada proteína Fos (Curran y cols. , 1984). Esta proteína se asocia con cromatina y puede unirse a DNA in vitro, sugiriendo que Fos está implicado en la regulación de la expresión de genes, referidos como genes de expresión tardía (Sambucetti y Curran, 1986). Fos funciona directamente como un regulador transcripcional en cooperación con la proteína Jun (la proteína codificada por el gen c-jun) a través del llamado activador de la proteína 1 (AP-1) (Lee y cols., 1988). Las proteínas AP-1 incrementan el proceso transcripcional que aumenta la expresión de genes (como la prodinorfina y la proencefalina) respecto a los niveles basales. En adición al papel de activación de genes, se ha demostrado que Fos también actúa como un regulador negativo de su propia expresión.

En la mayoría de las células, los niveles basales de RNAm de c-fos y la expresión de la proteína Fos, son relativamente

bajos, aunque hay ocasiones excepcionales en las cuales las células mantienen relativamente altos niveles de expresión (Curran, 1988). Se establece que muchos tipos de estímulos, algunos asociados con el proceso de diferenciación y algunos con excitación neuronal, producen una inducción transitoria del RNAm de c-fos y de la proteína Fos. La activación transcripcional ocurre dentro de 5 minutos y continua por 15-20 min (Greenberg y Ziff, 1984). El RNAm se acumula y alcanza valores pico en 30-45 min post-estimulación (Muller y cols., 1984), con una vida media relativamente corta (12 min.). La síntesis de la proteína Fos sigue a la expresión del RNAm, teniendo una vida media de aproximadamente 2 h (Müller y cols., 1984, Curran y cols., 1984).

Entre los estímulos que conducen a un aumento del RNAm de c-fos y de la proteína Fos en el SNC se encuentran las crisis epilépticas (Dragunow y Robertson, 1987; Morgan y cols., 1987; Shin y cols., 1988), la isquemia cerebral (Gehlert y cols., 1988; Jorgensen y cols., 1988; Onodera y cols., 1989) lesiones por herida de navaja (Dragunow y Robertson, 1988), estrés psicológico (Morgan y cols., 1988), estimulación neuronal vigorosa (Kaczmarek y cols., 1988; Sagar y cols., 1988), privación de agua (Sagar y cols., 1988) y varias drogas incluyendo cafeína (Nakajima y cols., 1988), agonistas β -adrenoceptores (Gupits y cols., 1988), morfina (Chang y cols., 1988) y estrógenos (Cattaneo y cols., 1988) entre otros. Se

sugiere, que la acumulación de Fos puede emplearse como un marcador metabólico de alta resolución para el trazo de las rutas postsinápticas (Sagar y cols., 1988; Dragunow y Faull, 1989). Sin embargo, a este respecto, hay que tener en cuenta que algunas regiones cerebrales como la sustancia negra y cerebelo, no muestran producción de Fos. La ausencia de la expresión de Fos en estas regiones puede ser debida a la falta de la maquinaria bioquímica para su producción.

4.1 CRISIS, ANTIEPILEPTICOS Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FOS

Con la excepción de las crisis audiogénicas, las cuales inducen inmunorreactividad de Fos predominantemente en el colículo inferior y el núcleo auditivo (Le Gal La Salle y Naquet, 1990), los demás tipos de crisis provocan una inducción de c-fos y Fos en el SNC (Morgan y cols., 1987; Popovici y cols., 1990; Sharp y cols., 1989).

En el caso de PTZ, aproximadamente 60 minutos después su administración (50 mg/Kg), existe un incremento de c-fos en todo el cerebro; posteriormente se incrementan los niveles de Fos en estructuras tales como la corteza piriforme, núcleo olfatorio anterior, núcleo rojo de la estria terminalis, giro dentado, hipocampo, amígdala y corteza (Morgan y cols., 1987; Dragunow y Robertson, 1987). A estos estudios pioneros se sucedieron

otros, reportando en general resultados similares (Shehab y cols., 1992). Las regiones que presentan un incremento de c-fos y Fos producidos por PTZ y en general por las crisis, son regiones que están implicadas en la generación de las crisis (por ejemplo: hipocampo y amígdala).

Un solo neurotransmisor no puede explicar la inducción de los genes de expresión temprana durante las crisis en el SNC. Sin embargo, los receptores a glutamato juegan un papel preponderante en la expresión de c-fos y Fos (Morgan y Curran, 1991). Inicialmente una coincidencia se estableció entre la inmunorreactividad de la proteína Fos después de crisis con PTZ y la densidad de receptores NMDA (Morgan y cols., 1987). Subsecuentemente se mostró que la mayoría de c-fos inducido por PTZ puede ser bloqueado no sólo por antiepilépticos tales como DZP, barbitúricos y ácido valproico, sino también por antagonistas del receptor NMDA tal como MK801 (Morgan y cols., 1987; Sonnenberg y cols., 1989). Además, la administración de NMDA en dosis no convulsivas induce c-fos con la misma cinética y farmacología que PTZ y picrotoxina (Sonnenberg y cols., 1989; Kaczmarek y cols., 1988). Ya que se piensa que PTZ puede actuar en el mismo sitio que la picrotoxina, esto último sugiere que por reducir la actividad del receptor GABA_A, PTZ potencia la neurotransmisión de los receptores NMDA (Morgan y Curran, 1991).

Existen pocas evidencias del efecto de las drogas antiepilépticas en la expresión del gen c-fos y su proteína Fos producto de la actividad epiléptica. Al respecto, se observó que el incremento de c-fos en todo el cerebro inducido por PTZ es bloqueado por un tratamiento previo con DZP (Morgan y cols., 1987). Asimismo, se establece que el DZP atenúa o bloquea la expresión de Fos inducida por el estrés (Beck y Fibiger, 1995). Otros autores, reportaron que midazolam (una benzodiazepina) bloquea la inmunoreactividad de Fos producida por PTZ en todo el cerebro (Dragunow y Robertson, 1987). También se encontró que el pentobarbital, el DZP y el ácido valproico -los cuales potencian los efectos de GABA- bloquean completamente el incremento inducido por kainato en la inmunoreactividad de Fos en el hipocampo (Pennypacker y cols., 1993).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que la administración crónica de un agonista disminuye los niveles de receptores del sistema en el que está actuando, seguido de una disminución en la eficacia de dicho sistema (Tietz y cols, 1986). En el caso de los fármacos antiepilépticos que actúan en el sistema GABAérgico, como es la VGB y GBP, se desconocen los cambios en los receptores de ese sistema que resultan de su administración crónica, así como alteraciones en otros tipos de receptores como son los de los

Existen pocas evidencias del efecto de las drogas antiepilépticas en la expresión del gen c-fos y su proteína Fos producto de la actividad epiléptica. Al respecto, se observó que el incremento de c-fos en todo el cerebro inducido por PTZ es bloqueado por un tratamiento previo con DZP (Morgan y cols., 1987). Asimismo, se establece que el DZP atenúa o bloquea la expresión de Fos inducida por el estrés (Beck y Fibiger, 1995). Otros autores, reportaron que midazolam (una benzodiacepina) bloquea la inmunoreactividad de Fos producida por PTZ en todo el cerebro (Dragunow y Robertson, 1987). También se encontró que el pentobarbital, el DZP y el ácido valproico -los cuales potencian los efectos de GABA- bloquean completamente el incremento inducido por kainato en la inmunorreactividad de Fos en el hipocampo (Pennypacker y cols., 1993).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que la administración crónica de un agonista disminuye los niveles de receptores del sistema en el que está actuando, seguido de una disminución en la eficacia de dicho sistema (Tietz y cols, 1986). En el caso de los fármacos antiepilépticos que actúan en el sistema GABAérgico, como es la VGB y GBP, se desconocen los cambios en los receptores de ese sistema que resultan de su administración crónica, así como alteraciones en otros tipos de receptores como son los de los

opioides endógenos.

Por otra parte, se sabe que agonistas que se unen al RBDZ evitan la expresión de la proteína Fos, la cual se ha utilizado como un marcador de actividad neuronal. Sin embargo, se desconocen los cambios inducidos por la VGB y el GBP en la expresión de esta proteína. Dichos cambios resultan relevantes ya que se sugiere que Fos interviene en la expresión de genes de expresión tardía.

6. HIPÓTESIS

Si se administran fármacos que potencian la acción del GABA, tal como VGB, GBP y DZP, entonces se disminuirá la expresión de la proteína Fos inducida por la epilepsia en áreas cerebrales específicas involucradas en las crisis.

Asimismo, si se administra en forma repetida dichos fármacos entonces se disminuirá la unión al RBDZ y μ de los opioides endógenos en las mismas áreas en las que se bloqueó la expresión de Fos.

Estos cambios a largo plazo disminuirán la acción del GABA y podrán ser un mecanismo que facilite la producción de la epilepsia refractaria a tratamiento farmacológico.

opioides endógenos.

Por otra parte, se sabe que agonistas que se unen al RBDZ evitan la expresión de la proteína Fos, la cual se ha utilizado como un marcador de actividad neuronal. Sin embargo, se desconocen los cambios inducidos por la VGB y el GBP en la expresión de esta proteína. Dichos cambios resultan relevantes ya que se sugiere que Fos interviene en la expresión de genes de expresión tardía.

6. HIPÓTESIS

Si se administran fármacos que potencian la acción del GABA, tal como VGB, GBP y DZP, entonces se disminuirá la expresión de la proteína Fos inducida por la epilepsia en áreas cerebrales específicas involucradas en las crisis.

Asimismo, si se administra en forma repetida dichos fármacos entonces se disminuirá la unión al RBDZ y μ de los opioides endógenos en las mismas áreas en las que se bloqueó la expresión de Fos.

Estos cambios a largo plazo disminuirán la acción del GABA y podrán ser un mecanismo que facilite la producción de la epilepsia refractaria a tratamiento farmacológico.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración repetida de los fármacos antiepilépticos: VGB, GBP y DZP, en la unión de RBDZ y μ . Asimismo, investigar los cambios en la expresión de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica después de la administración aguda de estos fármacos.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar los cambios en los niveles de unión al RBDZ y μ en ratones tratados con DZP, GBP y VGB -una sola dosis y crónicamente-.

-Evaluar en ratas el efecto de DZP, GBP y VGB en la expresión de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica con PTZ.

8. MÉTODO

8.1 SUJETOS

Se utilizaron ratas macho adultas (10-12 semanas) de la cepa Wistar con un peso entre 250-350 grs para la técnica de

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración repetida de los fármacos antiepilépticos: VGB, GBP y DZP, en la unión de RBDZ y μ . Asimismo, investigar los cambios en la expresión de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica después de la administración aguda de estos fármacos.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar los cambios en los niveles de unión al RBDZ y μ en ratones tratados con DZP, GBP y VGB -una sola dosis y crónicamente-.

-Evaluar en ratas el efecto de DZP, GBP y VGB en la expresión de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica con PTZ.

8. MÉTODO

8.1 SUJETOS

Se utilizaron ratas macho adultas (10-12 semanas) de la cepa Wistar con un peso entre 250-350 grs para la técnica de

inmunohistoquímica y ratones macho adultos (6 semanas) de la cepa CD-1 con un peso entre 20-35 grs para la técnica de autorradiografía. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida y se mantuvieron con un ciclo 12-12 luz-oscuridad.

8.2 FÁRMACOS Y TRATAMIENTOS

Los animales se manipularon previamente a los tratamientos con el fin de habituarlos al procedimiento experimental. Dicha manipulación consistió en pesarlos y administrarles solución salina (SS) v.o. o i.p. diariamente por una semana.

a) La SS se administró en un volumen de 0.1 ml/10 grs i.p. o v.o. en el caso del ratón y de 0.1 ml/100 grs i.p. o 1 ml/100 grs v.o. en el caso de la rata.

b) El PTZ se administró a ratas a una dosis de 60 mg/Kg i.p. en un volumen total de 0.1 ml/100 grs.

c) La VGB se administró a una dosis de 500 mg/Kg v.o. en un volumen total de 1 ml/100 grs en el caso de la rata y de 0.1 ml/10 grs en el caso del ratón.

d) El GBP se administró a una dosis de 100 mg/Kg v.o. en un volumen total de 1 ml/100 grs en el caso de la rata y de 0.1

ml/10 grs en el caso del ratón.

d) El DZP se administró a una dosis de 5 (en los experimentos de inmunohistoquímica) o 10 (en los experimentos de autorradiografía) mg/Kg i.p. en un volumen total de 0.1 ml/100 grs en el caso de la rata o de 0.1 ml/10 grs en el caso del ratón.

Todos los fármacos se disolvieron en SS como vehículo, excepto el DZP en el grupo de ratas para la inmunohistoquímica, el cual se administró sin diluir en la forma farmacéutica de solución inyectable.

8.3 GRUPOS EXPERIMENTALES

8.3.1 ESTUDIOS PARA LA EVALUACIÓN DE RECEPTORES

a) Grupo control (SSA; n=30). Los ratones recibieron SS (0.1 ml/10 grs, i.p. o v.o.) por 8 días.

b) Grupos "dosis única" (F1AVGB, F1AGBP y F1ADZP; n=10). A cada ratón se le aplicó SS una vez al día por 7 días y 24 h después de la última aplicación se le administró una dosis única de VGB, GBP o DZP.

c) Grupos "tratamiento subcrónico" (FCAVGB, FCAGBP y FCADZP;

n=10). Se administró VGB, GBP o DZP una vez al día a cada ratón por un periodo de 8 días.

Los animales se sacrificaron por decapitación a las 24 h después de la última administración y se procedió a realizar la técnica de autorradiografía (Ver después).

8.3.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FOS

a) Grupo SS (SSI; n=15). Las ratas se inyectaron con SS.

b) Grupo SS + PTZ (SSI+PTZ; n= 23). Cada rata recibió SS y 1 hora después se le administró PTZ.

c) Grupo fármaco + PTZ (VGB+PTZ, n=6; GBP+PTZ, n=5; y DZP+PTZ, n=11). Las ratas recibieron VGB, GBP o DZP y 1 hora después se inyectaron con PTZ.

A las 2 h después del PTZ, los animales se anestesiaron con ketamina y xilacina y se perfundieron por vía intracardíaca, procediéndose a realizar la técnica de inmunohistoquímica (ver más adelante).

8.4 AUTORRADIOGRAFÍA

Veinticuatro horas después de la administración de SS o del fármaco correspondiente, los animales se sacrificaron por decapitación, sus cerebros se extrajeron rápidamente, se congelaron en hielo seco pulverizado y se almacenaron a -70°C . En un criostato se obtuvieron secciones coronales de $20\ \mu\text{m}$ de grosor, se montaron por descongelación en laminillas cubiertas previamente con gelatina y se mantuvieron a -70°C hasta el día de la incubación.

Para la autorradiografía se procedió a lavar las secciones cerebrales en una solución Tris HCl $50\ \text{mM}$ (pH 7.4) para receptores μ o en Tris HCl $170\ \text{mM}$ (pH 7.4) para RBDZ, por 30 min a 25°C . Para receptores μ las secciones se incubaron durante 60 min a 25°C en una solución $2\ \text{nM}$ de [^3H] DAMGO (agonista para los receptores μ) y Tris HCl $50\ \text{mM}$, en ausencia o presencia de $2\ \mu\text{M}$ de naloxona. La unión obtenida en presencia de naloxona se consideró unión no específica. Para RBDZ, las laminillas se incubaron durante 45 min a 4°C en una solución $2\ \text{nM}$ de [^3H] Flunitrazepam (agonista para el sitio de acción de las BDZ en el complejo GABA) y Tris HCl $170\ \text{mM}$. Se utilizó $1\ \mu\text{M}$ de clordiacepóxido no marcado, como ligando frío para evaluar la unión no específica. La incubación se terminó con 2 lavados sucesivos en solución Tris HCl $50\ \text{mM}$ (pH 7.4) para receptores

μ o en Tris HCl 170 mM (pH 7.4) para RBDZ (1 min c/u; 4°C). Las secciones se secaron rápidamente con aire frío.

Las laminillas se colocaron en magazines de plomo, se pusieron en contacto con película sensible al tritio (Amersham, Hyperfilm-³H) y se conservaron en un lugar oscuro y a temperatura ambiente de 3 (RBDZ) a diez semanas (μ). Posteriormente se procesaron con revelador Kodak (D11) y fijador rápido. La densidad óptica (OD) de los autorradiogramas se determinó utilizando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software del Análisis de Video). Para cada área cerebral, se realizaron 10 lecturas de la OD en por lo menos cinco secciones diferentes de cada cerebro y se obtuvo un promedio. La OD se convirtió en fentomolas por mg de tejido con base en valores obtenidos de estándares de tritio. Las áreas corticales evaluadas fueron las siguientes: las cortezas motora, somatosensorial y del cíngulo; caudado putamen, núcleo acumbens, áreas CA1 a CA3 y giro dentado del hipocampo, amígdala (medial, basomedial, basolateral y central), tálamo e hipotálamo.

Los valores obtenidos en fentomolas por mg de tejido para cada área estudiada se contrastaron entre las tres condiciones experimentales (SSA, F1A, FCA) por droga, utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) completamente aleatorizado de 1 factor (nivel de significancia $p < 0.05$) y la prueba de comparaciones múltiples

de Duncan.

8.5 ANÁLISIS CONDUCTUAL

Inmediatamente después de la administración de PTZ o SS, las ratas se colocaron en cajas individuales y se observaron continuamente durante 20 min. Se determinó el número de animales que presentaron crisis parciales y crisis tónico-clónicas generalizadas inducidas por PTZ, así como la latencia a las crisis (tiempo en minutos desde la administración de PTZ hasta el comienzo de la crisis) y la duración de la misma (tiempo en minutos desde el comienzo al fin de la crisis).

La actividad epiléptica (crisis parciales y crisis generalizadas) de los grupos de tratamiento (F + PTZ) y del grupo control (SSI+PTZ) se reportó en porcentaje. Por otro lado, se empleó un Análisis de Varianza completamente aleatorizado (1 factor; nivel de significancia $p < 0.05$) para comparar la latencia y la duración de las crisis del grupo SSI+PTZ comparado contra los tres grupos de tratamiento (F + PTZ).

8.6 PERFUSIÓN E INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR LA PROTEÍNA FOS

Después de 2 horas de la administración de SS o PTZ todas

las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (20 mg/Kg) y se perfundieron por punción intracardiaca con 500 ml de PBS (0.1 M) y 500 ml de paraformaldehído al 4% en 0.1 M de PBS con un pH de 7.4. Después de la perfusión se extrajeron los cerebros y se colocaron en paraformaldehído al 4% por 4 horas, y se procedió a sumergirlos en sacarosa al 30% por 72 hrs para su crioprotección. En un microtomo se obtuvieron cortes coronales de 40 μ m de grosor a nivel del hipocampo dorsal y la amígdala (Bregma -3.14 mm; Paxinos y Watson, 1986). Después de incubar por dos horas en una solución de tritón al 2%, las secciones cerebrales se lavaron con PBS 0.1 M (3 veces 10 minutos cada vez) y se incubaron en el anticuerpo primario policlonal (1:5000; diluido en suero de conejo al 5%) por 48 hrs a 4°C. Después de lavar con PBS las secciones se incubaron en anticuerpo biotinilado (Kit ABC Vectastin) por una hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo reagente (Kit ABC Vectastin) por 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron y la reacción se reveló con 0.05% de diaminobencidina, 1% de agua oxigenada en PBS 0.1 M y 100 μ l de sulfato de níquel, finalmente los cortes se montaron en portaobjetos no gelatinizados.

Las estructuras seleccionadas para el análisis cuantitativo

de la proteína Fos fueron las siguientes: cortezas motora, somatosensorial y retrosplenial; amígdala (medial, basolateral y corteza piriforme) e hipocampo (áreas CA1-3 y giro dentado). Cada estructura se fotografió con una amplificación de 100x y las células inmunorreactivas se cuantificaron en una área de $400 \times 287 \mu\text{m}^2$.

Para contrastar entre sí los efectos de los tratamientos (F+PTZ) con los grupos de SSI y SSI+PTZ en la inmunorreactividad de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica, los datos en cada una de las áreas estudiadas se sometieron al Análisis de Varianza completamente aleatorizado (1 factor; nivel de significancia $p < 0.05$) y a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

9. RESULTADOS

En acuerdo con nuestra hipótesis, se observó que la administración aguda de DZP, GBP y VGB, los cuales potencian la acción del GABA, produjo una reducción en la expresión de la proteína Fos inducida por la epilepsia; mientras su administración subcrónica disminuyó la unión al RBDZ y μ en áreas cerebrales específicas involucradas en la expresión de las crisis. Sin embargo, no se observó una correlación entre las áreas en las que se observaron cambios en la expresión de la

de la proteína Fos fueron las siguientes: cortezas motora, somatosensorial y retrosplenial; amígdala (medial, basolateral y corteza piriforme) e hipocampo (áreas CA1-3 y giro dentado). Cada estructura se fotografió con una amplificación de 100x y las células inmunorreactivas se cuantificaron en una área de $400 \times 287 \mu\text{m}^2$.

Para contrastar entre sí los efectos de los tratamientos (F+PTZ) con los grupos de SSI y SSI+PTZ en la inmunoreactividad de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica, los datos en cada una de las áreas estudiadas se sometieron al Análisis de Varianza completamente aleatorizado (1 factor; nivel de significancia $p < 0.05$) y a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

9. RESULTADOS

En acuerdo con nuestra hipótesis, se observó que la administración aguda de DZP, GBP y VGB, los cuales potencian la acción del GABA, produjo una reducción en la expresión de la proteína Fos inducida por la epilepsia; mientras su administración subcrónica disminuyó la unión al RBDZ y μ en áreas cerebrales específicas involucradas en la expresión de las crisis. Sin embargo, no se observó una correlación entre las áreas en las que se observaron cambios en la expresión de la

proteína Fos y entre las áreas de disminución en la unión a los receptores μ y BDZ. La descripción de los resultados obtenidos en el presente proyecto se especifica a continuación.

9.1 EFECTOS EN LA UNIÓN AL RBDZ Y AL RECEPTOR μ DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS (AGUDO Y SUBCRÓNICO) CON DIACEPAM, GABAPENTIN Y VIGABATRINA

9.1.1 SOLUCIÓN SALINA (SSA)

En el grupo SSA se observó un mayor nivel de unión al RBDZ en las cortezas motora, somatosensorial y del cíngulo, en el hipocampo (áreas CA1-CA3 y giro dentado) y en la amígdala (medial, basomedial, basolateral y central); mientras que un menor nivel de unión se presentó en el caudado putamen, núcleo acumbens, tálamo e hipotálamo (Tabla III, V y VII).

Respecto al receptor μ , las cortezas motora, somatosensorial y del cíngulo, el caudado putamen, el hipocampo (áreas CA1-3 y giro dentado) y el hipotálamo mostraron un menor nivel de unión en este receptor, mientras que el núcleo acumbens, y la amígdala (medial, basomedial, basolateral y central) mostraron un mayor nivel de unión (Tabla IV, VI y VIII).

9.1.2 DIACEPAM

Los animales del grupo F1ADZP mostraron una disminución en la unión al RBDZ en la amígdala basomedial (38.22%) comparados contra el grupo SSA. Se observó una disminución significativa en la unión de [³H]flunitracepam en la amígdala medial (41.60%), central (37.92%) y basomedial (44.97%) en el grupo FCADZP comparado contra el grupo SSA. (Tabla III; Fig. 1).

Un incremento significativo en la unión de [³H]DAMGO se observó en la corteza somatosensorial (49.66%) de los animales del grupo F1ADZP comparados contra el grupo SSA (Tabla IV; Fig. 1). Sin embargo, el grupo FCADZP no mostró cambios significativos en la unión al receptor μ comparado con el grupo SSA en todas las áreas analizadas.

9.1.3 GABAPENTIN

Los animales del grupo F1AGBP mostraron una disminución en la unión al RBDZ en la amígdala basolateral (29.61%) cuando se compararon contra el grupo SSA. En el grupo FCAGBP se observó una disminución en la unión al RBDZ en las cortezas motora (20.52%; 19.84%), y somatosensorial (34.57%; 23.84%) y en las áreas CA1-CA3 (34.39%; 23.46%) comparado contra el grupo SSA y el grupo F1AGBP respectivamente. A nivel de la amígdala basolateral el

grupo FCAGBP (33.23%) mostró una disminución en la unión al RBDZ cuando se comparó contra el grupo SSA (Tabla V; Fig. 1 y Fig. 2).

En comparación al grupo SSA y al grupo F1AGBP, los animales del grupo FCAGBP presentaron una disminución en los niveles de unión de receptores μ en la corteza del cíngulo (49.85 y 51.20% respectivamente) (Tabla VI; Fig. 1).

Tabla III. Unión de ^3H -Flunitrazepam (fmol/mg de proteína en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1ADZP) y subcrónica de DZP (FCADZP).

ÁREA	SSA	F1ADZP	FCADZP	ANOVA p (F)
CX MOTORA	524.7 \pm 27.5	413.6 \pm 72.5	382.6 \pm 61.0	p < 0.2
CX. SOMATOSEN	503.4 \pm 35.2	411.6 \pm 70.9	367.6 \pm 62.4	p < 0.2
CX. CÍNGULO	542.1 \pm 30.1	392.0 \pm 90.0	334.4 \pm 50.0	p < 0.06
CAUPUT	199.2 \pm 40.0	201.7 \pm 28.4	143.7 \pm 8.4	p < 0.2
ACUMMBENS	253.8 \pm 38.1	194.4 \pm 32.3	210.9 \pm 34.9	p < 0.5
CA1-CA3	435.7 \pm 57.1	400.5 \pm 39.3	286.1 \pm 47.7	p < 0.09
GIRUS	564.3 \pm 62.1	531.9 \pm 40.6	378.5 \pm 69.4	p < 0.08
AMMED	552.7 \pm 50.2	440.3 \pm 39.7	322.8 \pm 56.6@	p < 0.01
AMBSM	544.9 \pm 58.0	336.6 \pm 46.0*	299.8 \pm 51.3@	p < 0.007
AMBSL	466.3 \pm 60.6	351.8 \pm 46.4	276.3 \pm 56.8	p < 0.06
AMCEN	456.2 \pm 45.1	356.5 \pm 36.1	283.2 \pm 56.8*	p < 0.05
TÁLAMO	290.6 \pm 37.7	273.1 \pm 22.0	206.8 \pm 34.7	p < 0.1
HIPOTÁLAMO	431.5 \pm 53.4	338.6 \pm 23.8	280.3 \pm 57.3	p < 0.1

Cada valor es la media \pm el error estándar

* p < 0.05 Comparado con el grupo SSA (Prueba post-hoc)

@p < 0.01 Comparado con el grupo SSA

Corteza motora (CX. MOTORA); Corteza somatosensorial (CX. SOMATOSEN); Corteza del cíngulo (CX. CÍNGULO); Caudado Putamen (CAUPUT); Núcleo acummbens (ACUMMBENS); Áreas CA1 a CA3 del cuerno de Ammón (CA1-CA3); Giro dentado del hipocampo (GIRUS); Amígdala Medial (AMMED), basomedial (AMBSM), basolateral (AMBSL) y central (AMCEN).

9.1.4 VIGABATRINA

Los niveles de unión al RBDZ mostraron una tendencia a

incrementar en el grupo F1AVGB (amígdala basomedial, basolateral y central; tálamo) y a disminuir en el grupo FCAVGB (cortezas motora y del cíngulo; caudado putamen, núcleo acumbens y amígdala basomedial) comparados contra el grupo SSA. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (Tabla VII; Fig. 1).

Tabla IV. Unión de [³H]DAMGO (fmol/mg de proteína) en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1ADZP) y subcrónica de DZP (FCADZP)

ÁREA	SSA	F1ADZP	FCADZP	ANOVA p (F)
CX. MOTORA	26.6 ± 2.0	33.4 ± 1.7	30.4 ± 2.1	p < 0.08
CX. SOMATOSEN	28.4 ± 2.2	42.5 ± 4.0*	35.8 ± 3.7	p < 0.03
CX. CÍNGULO	35.3 ± 3.6	38.4 ± 2.7	39.6 ± 4.0	p < 0.6
CAUPUT	42.5 ± 5.6	55.4 ± 3.3	57.8 ± 6.7	p < 0.1
ACUMBENS	86.8 ± 4.0	98.6 ± 4.9	98.0 ± 4.8	p < 0.1
CA1 -CA3	34.9 ± 4.9	35.7 ± 2.3	29.0 ± 1.8	p < 0.2
GIRUS	25.2 ± 1.6	27.6 ± 2.1	25.9 ± 2.1	p < 0.6
AMMED	88.8 ± 5.7	86.1 ± 2.4	82.7 ± 4.3	p < 0.6
AMBSM	80.9 ± 5.5	74.7 ± 3.1	75.7 ± 2.5	p < 0.5
AMBSL	93.4 ± 3.5	87.1 ± 1.7	91.1 ± 6.7	p < 0.6
AMCEN	71.7 ± 2.5	72.0 ± 2.1	72.8 ± 2.7	p < 0.9
TÁLAMO	148.0 ± 9.0	147.4 ± 7.2	134.1 ± 8.2	p < 0.5
HIPOTÁLAMO	72.8 ± 5.2	70.7 ± 1.1	71.6 ± 2.6	p < 0.9

Cada valor es la media ± el error estándar

* p < 0.05 Comparado con el grupo SSA

Para anotaciones ver Tabla III

Un incremento en los niveles de unión al receptor μ se observó en el tálamo de los animales del grupo F1AVGB comparados contra el grupo SSA (20.01%) y el grupo FCAVGB (26.22%) (Tabla VIII; Fig. 1). Mientras una disminución en este receptor se observó en la amígdala basolateral (13.32%) en el cerebro de los ratones del grupo FCAVGB, comparados contra el grupo SSA. (Tabla

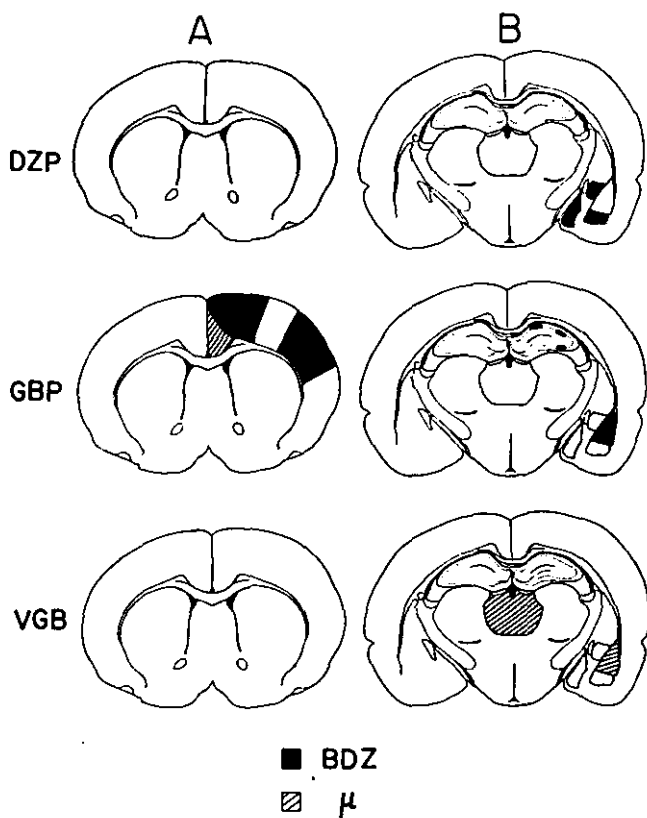


Fig. 1. Representación gráfica del efecto de la administración subcrónica de diazepam (DZP), gabapentin (GBP) y vigabatrina (VGB) en la unión al RBDZ y al receptor μ en el cerebro de el ratón a nivel del caudado-putamen (A) y amígdala e hipocampo dorsal (B). Las áreas oscuras representan la disminución en la unión al RBDZ; mientras las regiones con líneas indican la disminución en la unión al receptor μ .

VIII; Fig. 1 y Fig. 3).

9.2 CAMBIOS CONDUCTUALES INDUCIDOS POR PENTILENETETRAZOL EN RATAS PRETRATADAS CON DIACEPAM, GABAPENTIN O VIGABATRINA

9.2.1 GRUPO SS+PTZ

Todos los animales (100%) del grupo SS+PTZ presentaron crisis generalizadas y seis de ellos murieron (26%) (Fig. 4). Con una latencia a las crisis epilépticas de 0.72 ± 0.07 min. y una duración de las crisis de 2.45 ± 0.70 min (Fig. 5).

Tabla V. Unión de [³H]Flunitracepam (fmol/mg de proteína) en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1AGBP) y subcrónica de GBP (FCAGBP).

ÁREA	SSA	F1AGBP	FCAGBP	ANOVA p (F)
CX. MOTORA	505.5 ± 23.2	501.3 ± 23.5	401.8 ± 30.4*~	p < 0.02
CX. SOMATOSEN	503.1 ± 29.4	432.1 ± 29.4	329.1 ± 37.7@‡	p < 0.01
CX. CÍNGULO	501.5 ± 53.2	461.5 ± 11.5	397.2 ± 33.0	p < 0.1
CAUPUT	190.4 ± 21.3	152.7 ± 7.3	173.9 ± 28.4	p < 0.5
ACUMMBENS	296.5 ± 28.3	221.5 ± 26.5	218.9 ± 27.9	p < 0.1
CA1-CA3	480.7 ± 12.8	412.0 ± 46.7	315.3 ± 33.5@‡	p < 0.006
GIRUS	535.7 ± 18.4	507.4 ± 101.5	417.7 ± 29.8	p < 0.1
AMMED	463.9 ± 50.7	459.1 ± 48.3	338.0 ± 40.7	p < 0.1
AMBMS	459.6 ± 60.0	332.9 ± 27.9	310.5 ± 64.0	p < 0.1
AMBSL	458.8 ± 15.7	322.9 ± 41.9*	306.3 ± 32.67@	p < 0.006
AMCEN	371.1 ± 63.0	305.3 ± 32.5	296.5 ± 57.2	p < 0.6
TÁLAMO	315.5 ± 55.2	303.7 ± 74.4	172.6 ± 32.3	p < 0.1
HIPOTÁLAMO	389.1 ± 56.3	310.2 ± 52.7	238.9 ± 49.6	p < 0.1

Cada valor es la media ± el error estándar

* p < 0.05 Comparado con el grupo SSA

~ p < 0.05 Comparado con el grupo F1AGBP

@p < 0.01 Comparado con el grupo SSA

‡ p < 0.01 Comparado con el grupo F1AGBP

Para anotaciones ver tabla III

9.2.2 GRUPO DZP+PTZ

En el grupo DZP+PTZ un animal presentó crisis tónico-clónicas generalizadas (9.09%), 2 de ellos mostraron crisis parciales (18.18%) y 8 no presentaron crisis epilépticas (72.72%) (Fig.4). Se observó un retardo en la aparición de las crisis en los animales del grupo DZP+PTZ comparados contra el grupo SS+PTZ (1.78 ± 0.60 min. vs 0.72 ± 0.07 min.; $p < 0.01$). Respecto a la duración de las crisis epilépticas, esta fue significativamente menor en el grupo DZP+PTZ (0.21 ± 0.18 min) comparada con el grupo control (SS+PTZ) (2.45 ± 0.70 min; $p < 0.05$) (Fig. 5).

9.2.3 GRUPO GBP+PTZ

En este grupo 3 animales (60%) mostraron crisis tónico-clónicas generalizadas y 2 no presentaron crisis (40%) (Fig. 4). En cuanto a la latencia a las crisis epilépticas no se observaron diferencias significativas entre el grupo GBP+PTZ (1.10 ± 0.03 min.) y el grupo SS+PTZ (0.72 ± 0.07 min.). Sin embargo, la duración de las crisis epilépticas fue significativamente menor en el grupo GBP+PTZ (0.14 ± 0.06 min.) comparado con el grupo SS+PTZ (2.45 ± 0.70 min. $p < 0.05$) (Fig. 5).

9.2.4 GRUPO VGB+PTZ

En el grupo VGB+PTZ, 4 de 6 ratas (68%) mostraron crisis generalizadas, una rata presentó crisis parcial (16%) y una no mostró cambios conductuales (16%) (Fig.4). La duración de las crisis epilépticas del grupo VGB+PTZ fue menor (0.39 ± 0.15 min.) con respecto al grupo SS+PTZ (2.45 ± 0.70 min.), aunque no resultó estadísticamente significativa. La latencia de las crisis epilépticas de los animales del grupo VGB+PTZ (1.11 ± 0.02 min.) no mostró diferencias respecto al grupo SS+PTZ (0.72 ± 0.07 min.) (Fig. 5).

Tabla VI. Unión de [3 H]DAMGO (fmol/mg de proteína) en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1AGBP) y subcrónica de GBP (FCAGBP).

ÁREA	SSA	F1AGBP	FCAGBP	ANOVA p (F)
CX. MOTORA	51.2 \pm 11.9	45.4 \pm 8.4	36.2 \pm 5.0	p < 0.5
CX. SOMATOSEN	50.2 \pm 12.6	26.7 \pm 2.4	26.1 \pm 3.2	p < 0.08
CX. CÍNGULO	74.2 \pm 6.7	76.4 \pm 5.4	37.2 \pm 9.2@†	p < 0.007
CAUPUT	77.3 \pm 23.2	62.7 \pm 13.2	63.2 \pm 14.4	p < 0.8
ACUMMBENS	141.5 \pm 30.9	107.6 \pm 2.6	119.6 \pm 25.0	p < 0.7
CA1 -CA3	45.7 \pm 17.3	41.8 \pm 6.2	36.0 \pm 4.5	p < 0.8
GIRUS	39.2 \pm 10.6	29.8 \pm 2.4	27.3 \pm 1.6	p < 0.5
AMMED	107.2 \pm 26.5	90.3 \pm 31.0	72.1 \pm 13.8	p < 0.5
AMBSM	95.5 \pm 17.0	77.8 \pm 25.1	69.8 \pm 3.9	p < 0.5
AMBSL	155.0 \pm 46.5	129.3 \pm 54.7	145.8 \pm 20.3	p < 0.9
AMCEN	114.9 \pm 16.9	80.1 \pm 25.8	77.4 \pm 8.4	p < 0.2
TÁLAMO	261.7 \pm 31.0	218.6 \pm 40.0	221.3 \pm 20.2	p < 0.5
HIPOTÁLAMO	54.6 \pm 10.8	52.6 \pm 19.3	55.5 \pm 7.9	p < 0.9

Cada valor es la media \pm el error estándar

@: p < 0.01 Comparado con el grupo SSA

†: p < 0.01 Comparado con el grupo F1AGBP

Para anotaciones ver Tabla III

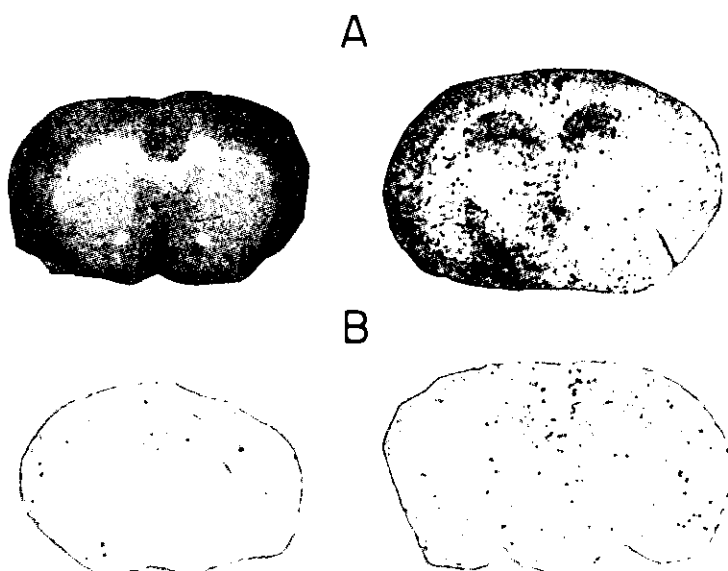


Fig. 2. Autorradiogramas que muestran la distribución de los RBDZ marcados con ^3H -Flunitrazepam en secciones coronales a nivel del caudado-putamen (izquierda) y amígdala e hipocampo dorsal (derecha). Las estructuras con mayor unión a los RBDZ aparecen como áreas grises o negras, mientras las áreas blancas representan menor unión a los receptores. En comparación con las secciones del ratón tratado con solución salina (A), las secciones del animal tratado con GBP (B) muestran una disminución en la unión a los RBDZ.

9.2.5 COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO EN LA LATENCIA Y DURACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS

El pretratamiento con DZP mostró ser el más eficaz en aumentar la latencia a la aparición de las crisis producidas por PTZ (grupo DZP+PTZ) (1.78 ± 0.60), con respecto al grupo GBP+PTZ (1.10 ± 0.03 min.; $p < 0.05$) y el grupo VGB+PTZ (1.11 ± 0.02 min; $p < 0.05$). Respecto a la duración de las crisis epilépticas, no se observaron diferencias significativas entre el grupo DZP+PTZ (0.21 ± 0.18 min.), el grupo GBP+PTZ (0.14 ± 0.06 min.) y el grupo VGB+PTZ (0.39 ± 0.15 min).

Tabla VII. Unión de [3 H]Flunitracepam (fmol/mg de proteína) en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1AVGB) y subcrónica de VGB (FCAVGB).

ÁREA	SSA	F1AVGB	FCAVGB	ANOVA p (F)
CX. MOTORA	439.7 \pm 52.4	433.7 \pm 27.5	398.9 \pm 33.8	p < 0.7
CX. SOMATOSEN	360.3 \pm 50.6	351.0 \pm 39.1	368.9 \pm 38.3	p < 0.9
CX. CÍNGULO	408.5 \pm 51.5	419.0 \pm 33.4	386.6 \pm 33.6	p < 0.8
CAUPUT	180.4 \pm 21.9	154.6 \pm 14.5	147.4 \pm 13.6	p < 0.3
ACUMMBENS	190.7 \pm 26.6	185.0 \pm 22.6	168.6 \pm 14.6	p < 0.7
CA1 -CA3	292.1 \pm 38.7	300.2 \pm 37.8	272.6 \pm 23.0	p < 0.8
GIRUS	365.8 \pm 43.2	375.3 \pm 36.5	351.5 \pm 30.8	p < 0.8
AMMED	354.5 \pm 46.2	402.8 \pm 31.5	379.8 \pm 31.8	p < 0.6
AMBMS	352.3 \pm 40.8	374.1 \pm 23.1	329.7 \pm 32.9	p < 0.6
AMBSL	288.5 \pm 29.4	322.5 \pm 30.8	295.1 \pm 34.0	p < 0.7
AMCEN	285.6 \pm 41.7	310.7 \pm 25.5	281.6 \pm 27.4	p < 0.7
TÁLAMO	245.1 \pm 31.5	265.8 \pm 17.9	277.8 \pm 26.9	p < 0.6
HIPOTÁLAMO	296.9 \pm 36.4	300.4 \pm 28.1	292.6 \pm 24.7	p < 0.9

Cada valor es la media \pm el error estándar

Para anotaciones ver Tabla III

9.3 ESTUDIO DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA FOS

9.3.1 EXPRESIÓN BASAL DE LA PROTEÍNA FOS (GRUPO SSI). EL

grupo SSI presentó una baja expresión de la proteína Fos en todas las áreas evaluadas.

9.3.2 GRUPO SS+PTZ (Grupo control). El grupo SS+PTZ mostró un incremento masivo en la inmunorreactividad de la proteína Fos en todas las estructuras analizadas (Tabla IX).

9.3.3 GRUPO DZP+PTZ. Los animales del grupo DZP+PTZ comparados contra el grupo control presentaron una disminución en la expresión de la proteína Fos en las cortezas motora (67.03%; $p < 0.01$), somatosensorial (58.28%; $p < 0.01$), granular retrosplenial (66.61%; $p < 0.05$) y piriforme (73.95%; $p < 0.01$); en el giro dentado del hipocampo (87.04%; $p < 0.01$); en la amígdala medial (87.87%; $p < 0.01$) y basolateral (64.09%; $p < 0.01$); y a nivel del tálamo (64.09%; $p < 0.05$) e hipotálamo (70.33%; $p < 0.01$) (Fig. 6, 7 y 8; Tabla IX).

9.3.4 GRUPO GBP+PTZ. En los animales del grupo GBP+PTZ se observó una disminución de la inmunorreactividad de la proteína Fos en el giro dentado del hipocampo (84.05%; $p < 0.01$); en la amígdala medial (69.11%; $p < 0.01$) y en el hipotálamo (81.71%; $p < 0.05$) comparados con el grupo SS+PTZ (Fig. 6, 7 y 8; Tabla IX)

9.3.5 GRUPO VGB+PTZ. Una disminución en la expresión de la proteína Fos se observó después del pretratamiento con VGB en las

corteza motora (54.85%; $p < 0.01$); somatosensorial (55.34%; $p < 0.01$); y piriforme (48.54%; $p < 0.05$); en el giro dentado del hipocampo (89.37%; $p < 0.05$) y en la amígdala medial (62.49%; $p < 0.05$) comparado contra el grupo SS+PTZ (Fig. 6, 7, 8 y 9; Tabla IX).

Tabla VIII. Unión de [3 H]DAMGO (fmol/mg de proteína) en áreas cerebrales de ratones tratados con solución salina (SSA), administración aguda (F1AVGB) y subcrónica con VGB (FCAVGB)

ÁREA	SSA	F1AVGB	FCAVGB	ANOVA p (F)
CX. MOTORA	54.0 ± 3.9	59.7 ± 5.3	54.4 ± 6.3	$p < 0.7$
CX. SOMATOSEN	58.4 ± 4.6	59.6 ± 2.7	55.4 ± 6.2	$p < 0.8$
CX. CÍNGULO	65.8 ± 5.8	75.6 ± 5.2	70.4 ± 6.8	$p < 0.5$
CAUPUT	70.1 ± 3.6	81.7 ± 8.0	77.4 ± 6.3	$p < 0.5$
ACUMBENS	112.0 ± 6.4	123.5 ± 10.4	124.8 ± 7.5	$p < 0.5$
CA1 -CA3	54.2 ± 4.8	60.4 ± 5.0	46.0 ± 4.8	$p < 0.1$
GIRUS	53.3 ± 6.4	61.8 ± 4.6	50.6 ± 4.6	$p < 0.3$
AMMED	103.3 ± 5.5	108.0 ± 7.3	92.1 ± 4.6	$p < 0.1$
AMBSM	92.5 ± 3.4	101.4 ± 4.8	93.9 ± 4.0	$p < 0.3$
AMBSL	164.4 ± 5.7	147.0 ± 8.6	142.5 ± 5.5*	$p < 0.05$
AMCEN	81.7 ± 5.6	80.5 ± 8.6	69.7 ± 5.6	$p < 0.3$
TÁLAMO	282.9 ± 12.6	339.6 ± 15.6*	269.0 ± 17.2‡	$p < 0.01$
HIPOTÁLAMO	77.1 ± 3.8	80.0 ± 7.8	65.9 ± 6.0	$p < 0.2$

Cada valor es la media ± el error estándar

* $p < 0.05$ Comparado con el grupo SSA

‡ $p < 0.01$ Comparado con el grupo F1AVGB

Para anotaciones ver tabla III

9.3.6 COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO EN LA INMUNORREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA FOS

El grupo DZP+PTZ mostró una disminución significativa en la inmunorreactividad de la proteína Fos comparado con el grupo GBP+PTZ en las corteza motora (56.64%; $p < 0.01$); somatosensorial

(53.93%; $p < 0.01$) y piriforme (69.30%; $p < 0.05$) (Fig. 6 y Fig. 7; Tabla IX).

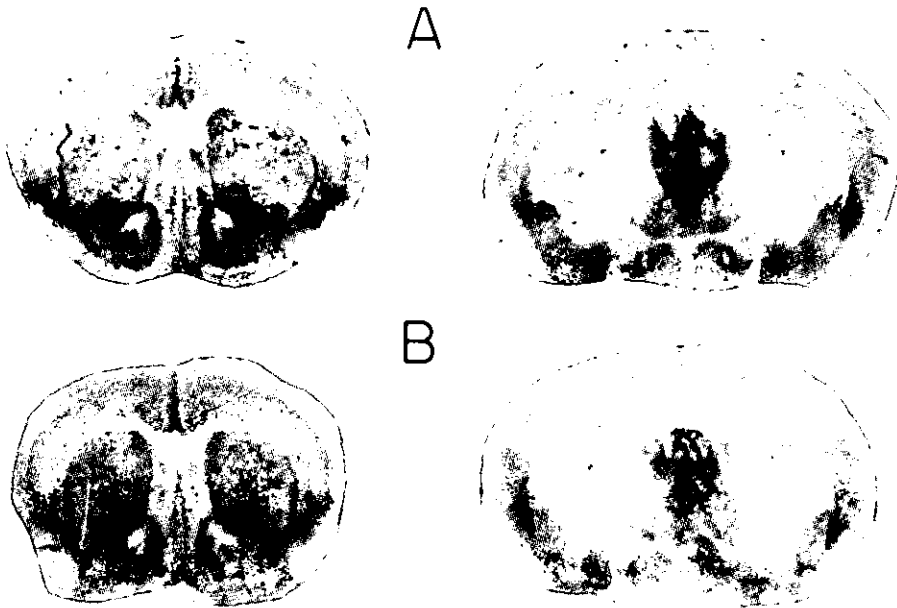


Fig. 3. Autorradiogramas que muestran la distribución de los receptores μ marcados con ^3H -DAMGO en secciones coronales a nivel del caudado-putamen (izquierda) y amígdala e hipocampo dorsal (derecha). En comparación con las secciones del ratón tratado con solución salina (A), las secciones del animal tratado con VGE (B) muestran una disminución en la unión al receptor μ en varias áreas cerebrales. Para anotaciones ver Fig. 2.

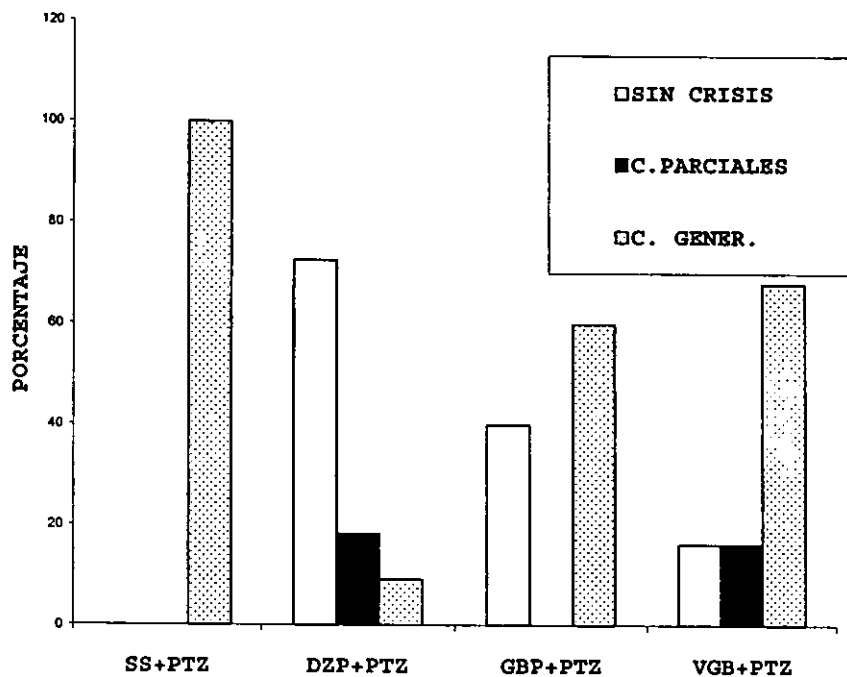


Fig 4. Porcentaje de animales que presentaron crisis parciales (C. Parciales) o crisis clónico-tónicas generalizadas (C. Gener.) en los grupos de solución salina + PTZ (SS+PTZ), diazepam + PTZ (DZP+PTZ), gabapentin + PTZ (GBP+PTZ) y vigabatrina + PTZ (VGB+PTZ).

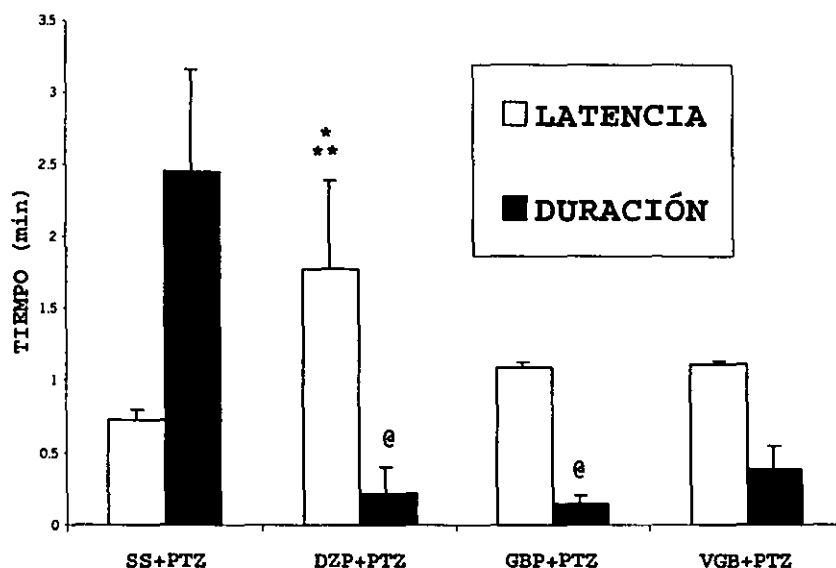


Fig. 5. Efecto del pretratamiento con diazepam (DZP+PTZ), gabapentin (GBP+PTZ), vigabatrina (VGB+PTZ) y solución salina (SS+PTZ) en la latencia y duración de las crisis epilépticas inducidas por PTZ. Los valores representan la media \pm el error estándar de cada uno de los grupos. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control. ** $p < 0.01$ comparado contra el grupo GBP+PTZ y VGB+PTZ. @ $p < 0.05$ comparados con el grupo control.

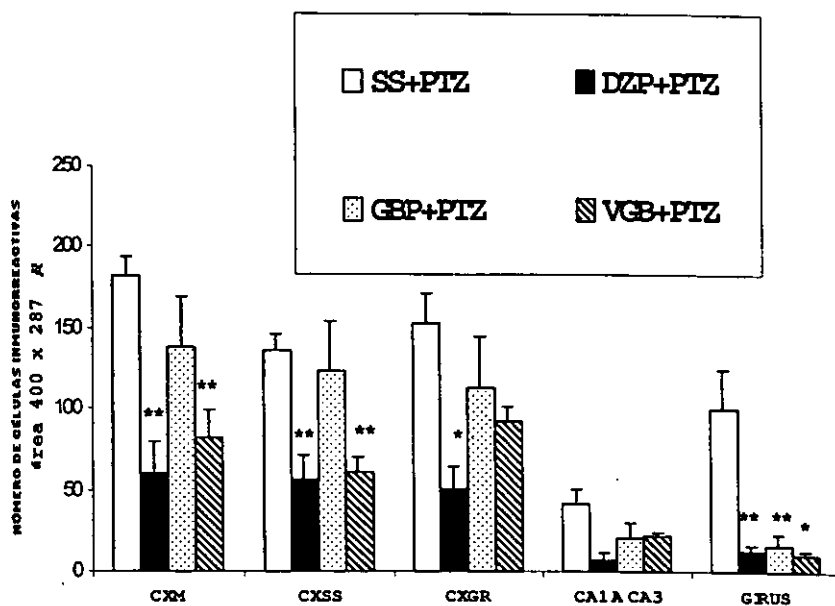


Fig. 6. Efecto del pretratamiento con diazepam (DZP+PTZ), gabapentin (GBP+PTZ), vigabatrina (VGB+PTZ) y solución salina (SS+PTZ) en la inmunoreactividad de la proteína Fos inducida por PTZ en las cortezas motora (CXM), somatosensorial (CXSS), granular retrosplenial (CXGR), áreas CA1 a CA3 y giro dentado (GIRUS) del hipocampo. Los valores son la media \pm el error estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparados contra el grupo control (SS+PTZ).

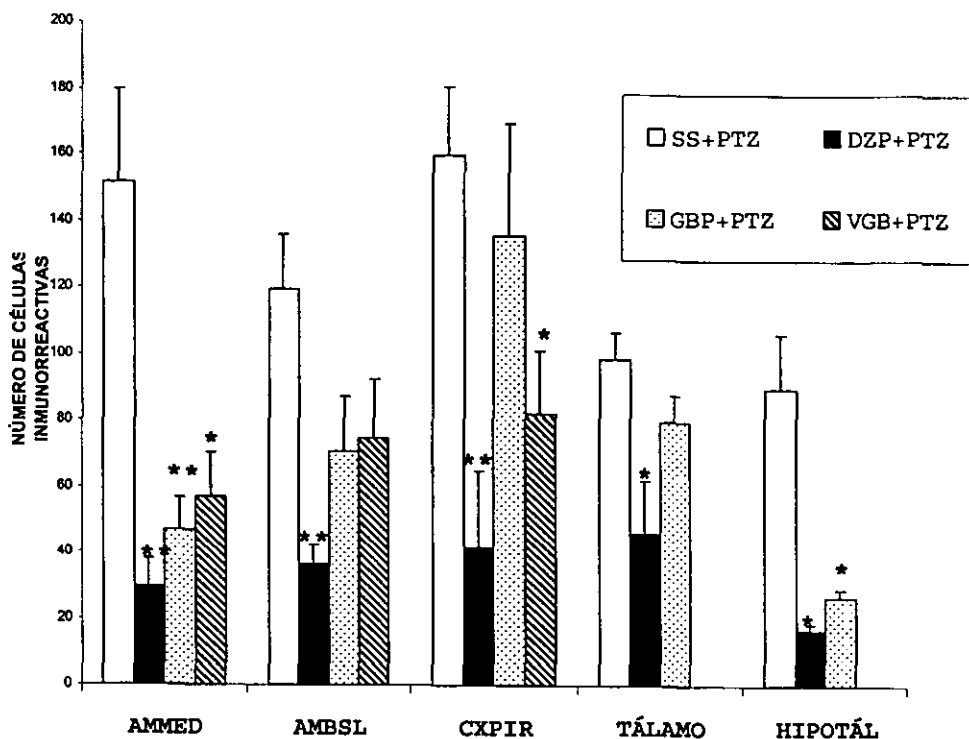


Fig. 7. Inmunorreactividad de la proteína Fos en los núcleos amigdalinos medial (AMMED) y basolateral (AMBSL), corteza piriforme (CXPIR), tálamo e hipotálamo (HIPOTÁL) de animales de los grupos SS+PTZ, DZP+PTZ, GBP+PTZ y VGB+PTZ. Los valores son la media \pm el error estandar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparados contra el grupo control.

Asimismo, se observó que el grupo VGB+PTZ mostró menores niveles de inmunorreactividad en la proteína Fos cuando se comparó contra el grupo GBP+PTZ en las regiones de las cortezas motora (40.63%; $p < 0.05$) y somatosensorial (50.68%; $p < 0.01$) (Fig. 6; Tabla IX). Sin embargo, no se observaron diferencias en ninguna de las estructuras analizadas entre el grupo VGB+PTZ y el grupo DZP+PTZ.

Tabla IX. Efecto del pretratamiento de DZP, GBP y VGB en la inmunorreactividad de la proteína Fos inducida por PTZ en el cerebro de la rata.

ESTRUCTURA	SS+PTZ	DZP+PTZ	GBP+PTZ	VGB+PTZ	ANOVA p (F)
CX MOTORA	182 ± 11.8	60 ± 19.5	138.4 ± 30.6	82.1 ± 16.4	$p < 0.001$
CX SOMATOUSEN	135.8 ± 10.3	56.6 ± 14.7	123 ± 31.8	60.6 ± 9.4	$p < 0.001$
CX RETROSPEN	153.5 ± 17.8	51.2 ± 13.4	113.4 ± 32.2	92.3 ± 9.1	$p < 0.01$
AMMED	151.5 ± 28.2	29.5 ± 8.5	46.8 ± 9.9	56.8 ± 13.3	$p < 0.001$
AMBLSL	119.6 ± 16.5	36.3 ± 5.9	70.8 ± 16.6	74.6 ± 17.9	$p < 0.001$
PIR	160.3 ± 21.1	41.7 ± 23.1	136 ± 34.2	82.5 ± 18.8	$p < 0.001$
CA1-CA3	41.09 ± 10.1	7.3 ± 4.0	21.2 ± 8.3	21.5 ± 3.0	$p < 0.1$
GIRUS	100.3 ± 24	13 ± 7.7	16 ± 7.5	10.6 ± 2.0	$p < 0.001$

Los valores representan el número de células inmunorreactivas contadas dentro de un área de $400 \times 287 \mu\text{m}^2$ con una amplificación de 100x.

Cada valor es la media ± el error estándar.

Corteza motora (CX MOTORA); Corteza somatosensorial (CX SOMATOUSEN); Corteza granular retrospenial (CX RETROSPEN); Amígdala Medial (AMMED); Amígdala basolateral (AMBLSL); Corteza Piriforme (PIR); Áreas CA1-CA3 del cuerno de Ammon (CA1-CA3); Giro dentado del hipocampo (GIRUS).

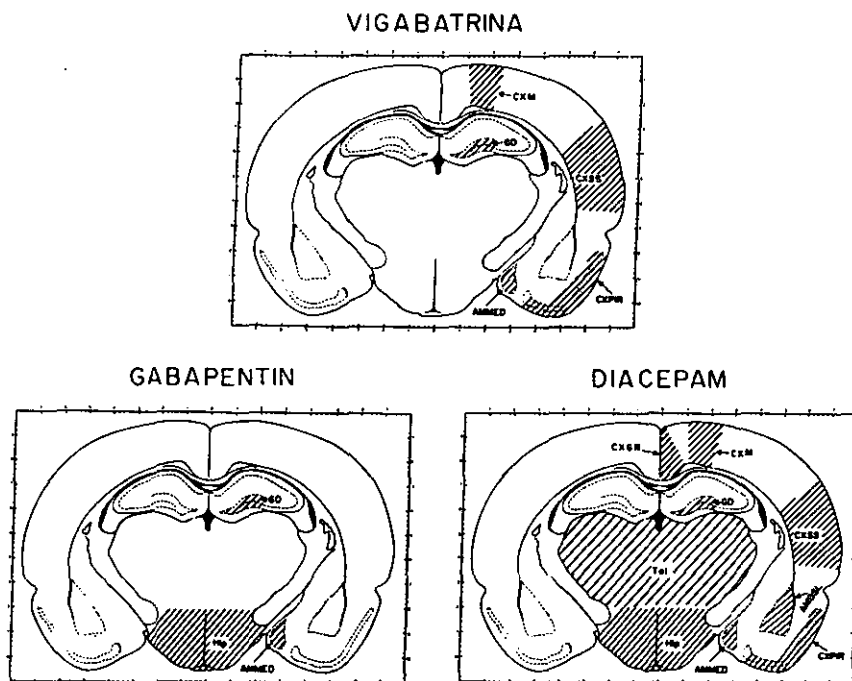


Fig. 8. Estructuras que mostraron disminución (indicado por líneas transversales) en la expresión de la proteína Fos inducida por actividad epiléptica con PTZ en los animales pretratados con Vigabatrina, Gabapentin y Diacepam. Corteza Motora (CXM); Corteza Somatosensorial (CXSS); Corteza Granular Retrospeñal (CXGR); Amígdala Medial (AMMED); Amígdala basolateral (AMBSL); Corteza piriforme (CXPIR); Giro Dentado (GD); Tálamo (Tal); Hipotálamo (Hip).

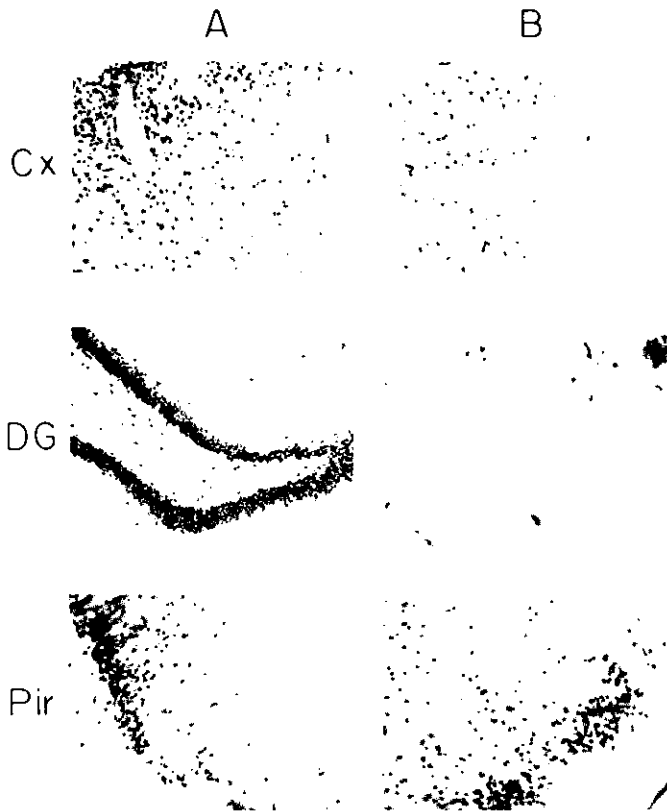


Fig. 9. Microfotografías (ampliación 100x) que demuestran la inmunorreactividad en la Corteza Somatosensorial (CX), Giro dentado (DG) y Corteza Piriforme (Pir) de ratas pretratadas con solución salina (A) o VGB (B) previa administración de PTZ.

10. DISCUSIÓN

10.1 ANTIEPILEPTICOS Y RBDZ

En el presente estudio, nosotros encontramos una respuesta diferencial en la unión al RBDZ, receptor μ y expresión de la proteína Fos después del tratamiento agudo y subcrónico con DZP, GBP y VGB.

Se sabe que la exposición crónica de un agonista a su receptor produce una respuesta de adaptación del mismo. Esta adaptación se asocia a una disminución gradual en el número de receptores o "down-regulation", o a una fosforilación del receptor. Estos cambios producen una disminución en la respuesta del sistema involucrado (Alberts y cols., 1994). Se propone entonces que, la reducción en la unión al RBDZ observado después de la administración subcrónica con fármacos que potencian la neurotransmisión GABAérgica es el resultado de estos mecanismos de adaptación.

Nuestros resultados están de acuerdo con lo que han reportado otros autores respecto a que la administración crónica de una BDZ (DZP o Flunitrazepam) reduce la unión de ^3H -Flunitrazepam en estructuras específicas del cerebro de la rata (Grimm y Hershkowitz, 1981; Rosenberg y Chiu, 1979; 1981a, 1981b; Tietz y cols., 1986). Llama la atención que en el caso de VGB

este régimen de administración no produce modificaciones en el RBDZ, como lo han reportado otros autores (Halonen y cols., 1991; Jackson y cols., 1994; Verhoeff y cols., 1999); respecto a GBP, no hay evidencias experimentales respecto a su administración crónica y su efecto en el RBDZ. Sin embargo, nuestro estudio mostró que al igual que DZP, GBP decrementa la unión de ^3H -Flunitrazepam en el cerebro del ratón.

Aunque los RBDZ se localizan en altas concentraciones en la corteza cerebral, giro dentado, área CA1 del hipocampo, colículo superior y sustancia negra (Olson y cols, 1990), nosotros no encontramos cambios en ninguna de estas estructuras después de la administración aguda y subcrónica con DZP. Sin embargo, el régimen subcrónico con DZP disminuyó los niveles de los RBDZ a nivel de la amígdala medial, basomedial y central. Se sabe que esta estructura del sistema límbico es fundamental en el desarrollo de las crisis epilépticas (Goddard y cols., 1969), por lo que los cambios en esta estructura efecto de DZP probablemente se asocien con una disminución de la neurotransmisión inhibitoria y una facilitación de la epileptogénesis.

El mapeo de los sitios de unión de ^3H -GBP en el cerebro de la rata indica una mayor distribución en la corteza frontal, parietal, occipital y entorrinal, en la región CA1 y en el giro dentado del hipocampo, tal como en el cerebelo (Hill y cols.,

1993). La comparación de estos datos se relacionan con la unión de ^3H -Flunitrazepam efecto de GBP en la corteza motora y somatosensorial y áreas CA1-CA3 observado en este estudio. Lo anterior nos puede sugerir que los sitios de unión de GBP se asocian con regiones en donde se localizan receptores GABA/BDZ.

Se desconoce el mecanismo por el cual GBP produce efectos antiepilépticos. Aunque se diseñó como un análogo estructural del GABA (Satzinger, 1994), este no actúa directamente en sus receptores (Suman-Chauhan y cols., 1993; Dooley y cols., 1986). Sin embargo, la administración aguda de GBP disminuyó la unión al RBDZ, mientras la administración subcrónica aumentó la unión a este receptor. Lo anterior nos sugiere que este fármaco activa el sistema GABAérgico directa o indirectamente; esto puede ser aumentando la actividad de la GAD (Taylor, 1995; Bartoszyk y cols., 1986; Taylor y cols., 1992) o actuando presinápticamente para potenciar la función del GABA endógeno (Taylor y cols., 1998). Es posible que el incremento de ^3H -Flunitrazepam observado como resultado de la administración aguda de GBP se explique por el efecto conocido como "GABA-shift" (Wastek y cols., 1978; Mitchell y Wilson, 1983), el cual sugiere que GABA produce un incremento en la unión de las BDZ en su receptor, y que la disminución en el RBDZ después de la administración subcrónica de GBP sea un fenómeno de adaptación producto de la exposición continua del ligando con su receptor, en forma similar a lo

observado con la administración subcrónica con DZP.

El mecanismo por el cual VGB produce su efecto antiepiléptico es la inhibición irreversible de la GABA-T (Ylinen y cols., 1991), por lo que se asocia a un aumento en los niveles de GABA y una disminución en el contenido de aminoácidos excitadores (Halonen y cols., 1991; Perry y cols., 1979). Sin embargo, su administración subcrónica no modificó la unión de ³H-Flunitrazepam en ninguna estructura en este trabajo. Otros autores sugieren que VGB no afecta la unión al receptor GABA o al RBDZ (Halonen y cols., 1991; Jackson y cols., 1994; Verhueff y cols., 1999), lo cual está de acuerdo con lo obtenido en este estudio. Probablemente, la magnitud del incremento en los niveles de GABA por VGB no fueron suficientes para inducir cambios sustanciales en el RBDZ. Esto se corrobora con evidencias que indican que la presencia de altas concentraciones de GABA (1 mM) en neuronas de cultivo disminuyó la unión a los RBDZ, mientras la presencia de bajas concentraciones de este aminoácido (0.1-1 μ M) no modificó la unión de dicho receptor (Maloteaux y cols., 1987). Por lo anterior, en futuros experimentos sería indispensable llevar a cabo mediciones de los niveles de GABA después de la administración de diferentes dosis de VGB y correlacionar estos datos con los cambios en los RBDZ.

10.2 ANTIEPILÉPTICOS Y RECEPTORES μ

Existen evidencias experimentales que indican una interacción entre GABA y opioides. La administración de opioides eleva los niveles de GABA en el cerebro (Tzeng y Ho, 1978; Lin y cols., 1973). Estos péptidos administrados crónicamente disminuyen la enzima responsable de la síntesis de GABA (GAD) (Ho y Gilliland, 1979). En el caso de la morfina, se describe que ésta actúa directamente en los receptores a GABA (Breuker y cols., 1976). También se sabe que la administración crónica de los opioides aumentan la unión al RBDZ en varias estructuras del SNC de la rata (Rocha y cols., 1993b, 1996b). Se establece que la administración de GBP incrementa los niveles de péptidos opioides extracelulares (Leu y Met-encefalina) en la amígdala (Rocha y cols., 1999a). Por otra parte se sabe que la administración de DZP, Flunitrazepam y muscimol disminuye el contenido de Met-encefalina estriatal en ratas (Harsing y cols., 1982). Otro reporte establece que la administración de bicuculina, un antagonista GABAérgico, suprime la conducta de abstinencia producida por el n-dipropilacetato (un antagonista del receptor μ) (De Boer y cols., 1977). En el presente estudio nosotros observamos que la administración aguda de DZP y VGB elevó los niveles de unión al receptor μ en la corteza somatosensorial y tálamo respectivamente, mientras que la administración subcrónica

de GBP disminuyó la unión de ^3H -DAMGO en la corteza del cíngulo y la administración de VGB redujo los niveles de unión en la amígdala basolateral. Las evidencias antes expuestas sustentan que las modificaciones en el receptor μ siguiendo a la administración de DZP, GBP y VGB (incremento después de la administración aguda y disminución después del régimen subcrónico) puede ser el resultado de la interacción GABA-opioides.

10.3 ANTIEPILÉPTICOS Y CRISIS

Aunque todos los fármacos administrados en este estudio potencian la neurotransmisión GABAérgica, su efecto en las crisis inducidas por PTZ es diferente. El DZP previene las crisis producidas por PTZ (Rall y Schleifer, 1990); el GBP bloquea las crisis clónicas inducidas por PTZ (McLean, 1995); mientras que la VGB es inefectiva en crisis epilépticas producto de la administración de este convulsivante (Leppik y cols., 1994; Jung y Palfreyman, 1995). En el presente estudio encontramos que DZP mostró ser el fármaco más efectivo en evitar la producción de crisis parciales y generalizadas inducidas por PTZ, mientras GBP y VGB mostraron ser más efectivas en disminuir las crisis parciales, sin modificar de manera importante a las crisis generalizadas.

10.4 ANTIEPILÉPTICOS Y PROTEÍNA FOS

Estudios previos han demostrado que las drogas antiepilépticas que potencian la transmisión GABAérgica, tal como diazepam, midazolam, ácido valproico y pentobarbital, bloquean el incremento en la expresión de c-fos y Fos inducido por crisis epilépticas en áreas cerebrales específicas (Dragunow y Robertson, 1987; Morgan y cols., 1987; Pennypacker y cols., 1993).

Aunque todos los fármacos empleados en el presente estudio incrementan la concentración de GABA cerebral (Halonen y cols., 1990; Löscher y Schmidt, 1987; Loscher y cols., 1991; Petroff y cols., 2000) llama la atención el efecto diferencial de ellos en la expresión de Fos producto de PTZ en el cerebro de la rata. Este efecto en la expresión de Fos producto de DZP, GBP y VGB nos muestra un mapeo diferencial de las áreas en las cuales los fármacos probablemente ejercen su efecto antiepiléptico. Sin embargo, el DZP, el GBP y la VGB disminuyeron la inmunorreactividad a Fos en estructuras cerebrales comunes, tales como el giro dentado del hipocampo y la amígdala, regiones que están implicadas en el inicio y la propagación de las crisis.

Se sabe que el giro dentado del hipocampo ejerce un papel regulador en los circuitos hipocampales y estructuras límbicas

durante las crisis (Lothman y cols., 1992) y que un incremento en la expresión de la proteína Fos en esta estructura se asocia con daño neuronal (Motte y cols., 1998). De tal manera, la disminución o bloqueo de Fos producto del pretratamiento con DZP, GBP y VGB en áreas cerebrales específicas puede asociarse con un efecto protector a las crisis epilépticas. De hecho, se sabe que VGB protege en contra de daño neuronal inducido por ácido kaínico (Halonen y cols., 1995). Asimismo, se conoce que el daño neuronal inducido por un incremento en la neurotransmisión de glutamato se previene con el tratamiento con GBP (Rothstein y Kuncl, 1995), efecto que se puede relacionar con una disminución en las corrientes de calcio (Stefani y cols., 1998).

Se establece que Fos participa en la regulación de genes de expresión tardía tales como la proencefalina y la prodinorfina (Ziółkowska y cols., 1998), y que los péptidos derivados de estos genes pueden inducir las crisis (Frenk, 1983). Asimismo, se sabe que la administración de VGB disminuye los niveles de RNAm de la hormona liberadora de corticotropina, una hormona que tiene acciones proconvulsivantes durante el desarrollo cerebral (Tran y cols., 1999). El efecto de DZP, GBP y VGB en la expresión de la proteína Fos secundaria a actividad epiléptica observado en este estudio podría asociarse con un bloqueo de los mecanismos celulares relacionados con la plasticidad neuronal en la epilepsia, que a largo plazo se asocian con facilitación de la

actividad epiléptica y daño neuronal.

Se sugiere que la activación de los receptores a glutamato median el incremento en la expresión de c-fos y Fos (Morgan y Curran, 1991). La expresión reducida de Fos después del pretratamiento con DZP, GBP y VGB observada en este estudio puede ser el resultado del incremento en los niveles de GABA y/o del decremento en el efecto de aminoácidos excitadores (Dooley y cols., 2000; Löscher y Schmidt, 1987; Perry y cols., 1979; Petroff y cols., 2000).

10.5 RECEPTORES Y FOS

La proteína Fos se emplea como un marcador neuronal de alta resolución para trazar conexiones neuroanatómicas, rutas neuronales de las crisis epilépticas y sitios de acción de drogas neuroactivas (Dragunow y Faull, 1989). Se plantea que la unión de ³H-Flunitrazepam no se correlaciona con la supresión de la expresión de la proteína Fos inducida por PTZ o bicuculina en el cerebro del ratón (Johansson y cols., 1996). En otro estudio no se encontró relación entre cambios regionales del receptor GABA_A producto de DZP crónico y cambios regionales en el empleo de glucosa en ratas (Brett y Pratt, 1995). No existe una correlación directa entre Fos y los receptores ya que, en nuestro estudio la mayoría de las áreas cerebrales evaluadas que presentaron una

disminución en la expresión de la proteína Fos no mostraron cambios en la unión al receptor μ o al RBDZ. Es probable que esta falta de correlación entre Fos y receptores se asocie al empleo de diferentes animales y diferentes regímenes de administración desarrollado en nuestro proyecto. Probablemente otros genes de expresión temprana estén asociados con modificaciones en los receptores μ y BDZ, por lo que se sugiere que en futuras investigaciones se analice su participación.

10.6 ANTIEPILÉPTICOS Y EPILEPSIA REFRACTARIA A TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Los efectos farmacológicos de las sustancias neuroactivas se correlacionan con la interacción con sus receptores; por lo que la disminución progresiva en el número o afinidad de los sitios receptores se puede asociar a con una disminución progresiva en la respuesta farmacológica (Maloteaux y cols., 1987). En la clínica, una gran proporción de pacientes epilépticos (30-40%) reciben tratamiento crónico con varios antiepilépticos (Albani y cols., 1997). Se sabe que este tipo de tratamiento conocido como politerapia puede estar involucrada en la resistencia a las drogas (Jallon, 1997). Al respecto, se establece que la epilepsia puede ser intratable desde el comienzo o puede llegar a ser intratable durante el tratamiento crónico con antiepilépticos (Löscher, 1997; Aicardi, 1998). Nuestros datos proporcionan

evidencias de la interacción entre la exposición subcrónica de un fármaco y la disminución en la unión al RBDZ y μ . Este puede ser un mecanismo que derive a la epilepsia refractaria a tratamiento farmacológico con antiepilépticos. Lo que se plantea realizar en el futuro para verificar este planteamiento, involucra entre otras cosas, un análisis de la unión a receptores de sustancias inhibitoras tal como el GABA o los péptidos opioides después de la administración repetida de fármacos antiepilépticos tradicionales en modelos animales de crisis química o eléctrica -"kindling".-

Bibliografia

- Aicardi, J. Clinical approach to the management of intractable epilepsy. *Dev Med Child Neurol*; 1988; 30: 429-440.
- Albani, F., Contin, M., Riva, R., Baruzzi, A. Pharmacokinetics during polypharmacy. Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs. London, England: John Libbey and company; 1997: 249-254. (Avanzini, G., Regesta, G., Tanganelli, P., Avari, M.).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, D.J. *Molecular Biology of the Cell*. New York; USA: Garland Publishing Inc; 1994: 721-785.
- Albertson, T.E., Joy, R.M., Stark, L.G. Modification of kindled amygdaloid seizures by opiate agonists and antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*; 1984; 228: 620-627.
- Albright, P.S., y Burnham, W.M. Development of a new pharmacological seizure model: effects of anticonvulsants on cortical- and amygdala-kindled seizures in the rat. *Epilepsia*; 1980; 21: 681-689.
- Appelton, R. The role of vigabatrin in the management of infantile epileptic syndromes. *Neurology*; 1993; 43:Suppl 5: S21-S23.
- Bartoszyk, G.D., Meyerson, N., Reimann, W., Satzinger, G., von Hodenberg, A. Gabapentin. Anticonvulsant drugs. London: John Libbey; 1986: 147-163. (Meldrum, B.S., Porter, R.J.).
- Bazil, W.C., y Pedley, A.T. Advances in the medical treatment of epilepsy. *Annu. Rev. Med.*; 1998; 49: 135-162.
- Beck, C.H.M., y Fibiger, H.C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci*; 1995; 15(1): 709-720.
- Ben-Menachem, E., Mumford, J., y Hamberger, A. Effect of long-term vigabatrin therapy on GABA and other amino acid concentrations in the central nervous system-a case study. *Epilepsy Res*; 1993; 16: 241-243.
- Ben-Menachem, E. Vigabatrin. *Epilepsia*; 1995; 36:Suppl 2: S95- S104.
- Bereau, H.M. y Olsen, W.R. GABAA Receptor Subtypes: Ligand Binding Heterogeneity Demonstrated by Photoaffinity Labeling and Autoradiography. *J Neurochem*; 1993; 61:4: 1479-1491.
- Bernasconi, R., Klein, M., Martin, P., Christen, P., Hafner, T., Portet, C., Schmutz, M. Gamma-vinyl GABA: comparison of neurochemical and anticonvulsant effects in mice. *J Neural Transm*; 1988; 72: 213-233.
- Bialer, M. Comparative pharmacokinetics of the newer antiepileptic drugs. *Clin Pharmacokinet*; 1993; 24: 441-452.
- Biggio, D., Della Bella, D., Frigeni, V., y Guidotti, A. Potentiation of morphine analgesia by muscimol. *Neuropharmacology*; 1977; 16: 149-150.
- Bohme, A.G., Stutzmann, J-M., Roques, P.B. y Blanchard, J-C. Effects of

selective mu and delta opioid peptides on kindled amygdaloid seizures in rats. *Neurosci Lett*; 1987; 74: 227-231.

-Bohme, G.A., Stutzmann, J.M., Roques, B.P., y Blanchard, J.C. Effects of selective mu and delta-opioid peptides on kindled amygdaloid seizures in rats. *Neurosci Res*; 1987; 74: 227-231.

-Bormann, J., y Feigenspan, A. GABAC receptors. *TINS*; 1995; 18:12:515-519.

-Bramham, R.C., y Sarvey, M.J. Endogenous activation of mu and delta-1 opioid receptors is required for long-term potentiation induction in the lateral perforant path: Dependence on GABAergic inhibition. *J Neurosci*; 1996; 16:24: 8123-8131.

-Brett, R.R. y Pratt, J.A. Changes in benzodiazepine-GABA receptor coupling in an accumbens-habenula circuit after chronic diazepam treatment. *British Journal of Pharmacology*; 1995; 116: 2375-2384.

-Breuker, E., Dinglidine, R., e Iversen, L.L. Evidence for naloxona and opiates as GABA antagonist. *Proc B P S*; 1976:458.

-Budavari, S., O'Neil, J.M., Smith, A., y Heckelman, E.P. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 1989. Merck and Company. New Jersey: 7094.

-Cain, D.P., Boon, F., Corcaran, M.E. Involvement of multiple opiate receptors in opioid kindling. *Brain Res*; 1990; 517:236-244.

-Cascino, G.D. Intractable partial epilepsy evaluation and treatment. *Mayo Clin Proc*; 1990; 65: 1578-1586.

-Cattaneo, E., Berchtold, M., Maggi, A. Estrogens modulate c-fos and parvalbumin gene expression in the rat CNS. *Soc Neurosci Abstr*; 1988; 14: 752.

-Chang, S.L., Squinto, S.P., Harlan, R.E. Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*; 1988; 157: 698-704.

-Chavkin, C., Bakhit, C., Weber, E. y Bloom, F.E. Relative contents and concomitant release of prodinorphan/ neoendorphin-derived peptides in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci*; 1983; 80: 7669-7673.

-Collingridge, G.L., y Davies, J. Actions of substance P and opiates in the rat substantia nigra. *Neuropharmacology*; 1982; 21: 715-719.

-Corbett, D.A., Paterson, J.S., McKnight, T.A., Magnan, J. y Kosterlitz, W.H. Dynorphin 1-8 and dynorphin 1-9 are ligands for the k-subtype of opiate receptor. *Nature*; 1982; 299: 79-81.

-Corda, M.G., Giorgi, O., Longoni, B., Orlandi, M., Biggio, G. Decrease in the function of the gamma-aminobutyric acid-couple chloride channel produced by the repeated administration of pentylentetrazol to rats. *J Neurochem*; 1990; 55: 1216-1221.

-Crain, B.J., Chang, K.J., y McNamara, J.O. An in vitro autoradiographic analysis of mu and delta opioid binding in the hippocampal formation of kindled rats. *Brain Res*; 1987; 412: 343-351.

-Cupello, A., y Hyden, H. On the presence of Met 5-Enkephalin of Deiters

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

neurons and their modulation of GABA transport. *J Neurosci Res*; 1981; 6: 589-583.

-Curran, T., MacConnell, W.P., van Straaten, F., Verma, I.M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: Molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol*; 1983; 3: 914-921.

-Curran, T., Teich, N.M. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: Characterization of a 55,000 dalton phosphoprotein. *J Virol*; 1982; 42: 114-122.

-Curran, T. The fos oncogene. *The oncogene Handbook*. Amsterdam: Elsevier; 1988: 307-325. (Reddy, E.P., y Skalka, A.M.).

-Curran, T., y Morgan, J.I. Memories of fos. *BioEssays*; 1987; 7: 255-258.

-Curran, T., Miller, D., Zokas, L., Verma, M.I. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell*; 1984; 36: 259-268.

-De Boer, T., Metselaar, J.H., Bruinvels, J. Suppression of GABA-induced abstinence behaviour in naive rats by morphine and bicuculline. *Life Sciences*; 1977; 20: 933-942.

-DeCoster, M.A., Conover, J.R., Hunter, J.C., y Tortella, F.C. The neuroprotective kappa-opioid ICI 977 alters glutamate-induced signaling in vitro. *NeuroReport*; 1994; 5: 2305-2310.

-Della Bella, D., Ferrari, V., Frigeni, V., Lualdi, P. Agonistic and antagonistic properties of diastereoisomers in a new central analgesic. *Nat New Biol*; 1973; 241: 282-284.

-Diestefano, P., Case, K.R., Colello, G.D., Bosmann, M.D. Increased specific binding of 3H-diazepam in rat brain following chronic diazepam administration. *Cell Biol Intern Rep*; 1979; 3: 163.

-Dingledine, R., Iversen, L.L. y Breuker, E. Naloxone as a GABA antagonist: evidence from iontophoretic, receptor binding and convulsant studies. *Eur J Pharmacol*. 1978 1;47(1):19-27.

-Dooley, D.J., Bartoszyk, G.D., Hartenstein, J., Reimann, W., Rock, D.M., y Satzinger, G. Preclinical pharmacology of gabapentin. Golden Jubilee Conference and Northern European Epilepsy Meeting. University of York, York; 1986; Abstract 8.

-Dooley, J.D., Mieske, A.C., Borosky, A.S. Inhibition of K-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci Lett*; 2000; 280: 107-110.

-Douglas, J., Grimes, L., Shook, J., Lee P.H.K. y Hong, J.S. Systemic administration of kainic acid differentially regulates the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNA and peptides in the rat hippocampus. *Mol Brain Res*; 1991; 9:79-86.

-Dragunow, M., y Robertson, H.A. Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res*; 1988; 455: 295-299.

- Dragunow, M., y Robertson, H.A. Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosc Lett*; 1987; 82: 157- 161.
- Dragunow, M., Currie, R.W., Faull, L.M., Robertson, H.A., y Jansen, K. Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci Biobehav Reviews*; 1989; 13: 301-313.
- Dragunow, M., y Faull, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth*; 1989; 29: 261- 265.
- Drake, T.C., Terman, W.G., Simmons, L.M., Milner, A.T., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, A.P., y Chavkin, C. Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. *J Neurosci*; 1994; 14:6: 3736-3750.
- Dzolic, M.R. y Van Der Poel-Heiterkamp, A.L. The role of nucleus accumbens and nigrostriatum in enkephalin-induced myoclonus. *Pharmacol Biochem Behav*; 1980; 13: 103-106.
- Emilien, G. y Maloteaux, J.M. Pharmacological management of epilepsy. Mechanism of action, pharmacokinetic drug interactions, and new drug discovery possibilities. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*; 1998; 36:4: 181-194.
- Evans, J.C., Hammond, L.D., y Frederickson, C.A.R. The Opioid Peptides. The opiate receptors. New Jersey: The Humana Press Clifton; 1988: 95-131. (Pasternak, W.G.).
- Engel Jr., Brown, W.J., Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Mazziotta, J.C. y Crandall, P.H. Pathological findings underlying focal temporal lobe hypometabolism in partial epilepsy. *Ann Neurol*; 1982; 12: 518-528.
- Fernandez-Guardiola, A., Rocha, L., Pellicer, F., Gutierrez, R., y Calvo, J.M. Massed amygdaloid kindling in encephale-isolet cats: its facilitation by naloxone. *Epilepsy Res*; 1989; 4:55-62.
- Ferrarese, C., Apollonio, I., Frigo, M., Perego, M., Piolti, R., Trabucchi, M., y Frattola, L. Decreased density of benzodiazepine receptors in lymphocytes of anxious patients: reversal after chronic diazepam treatment. *Acta Psychiatr Scand*; 1990; 82: 169-173.
- Foot, M., Wallace, J. Gabapentin. New antiepileptic drugs. Amsterdam: Elsevier; 1991: 109-114. (Pisani, F., Perucca, E., Avanzini, G., Richens, A.).
- Gale, K. GABA and Epilepsy: Basic Concepts from Preclinical Research. *Epilepsia*; 1992; 33:Suppl.5: S3-S12.
- Gale, K. Role of the substantia nigra in GABA-mediated anticonvulsant actions. *Adv Neurol*; 1986; 44: 343-364.
- Gallager, D.W., Lakoski, J.M., Gonsalves, S.F., Rauch, S.L. Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. *Nature*; 1984; 308: 74-77.
- Ganong, F.W. *Fisiologia Medica*. Mexico, D.F.: El manual moderno; 1986.
- Garant, S.D., y Gale, K. Infusion of opiates into substantia nigra protects against maximal electroshock seizures in rats. *J Pharmacol Exp Therap*; 1985;

234:1: 45-48.

-Gehlert, D., Jorgensen, M., Deckert, J., Wright, D.C. Transient cerebral ischaemia (TCI) induces c-fos oncogene expression in the rat brain. *Soc Neurosci*; 1988; 14: 1161.

-Goa, K.L. y Sorkin, E.M. Gabapentin: a review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy. *Drugs*; 1993; 46: 409-427.

-Goddard, V.G., McIntyre, C.D., Leech, K.C. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*; 1969; 25: 295-330.

-Goodman, R.R., Adler, A.B., Pasternak, W.G. Regional distribution of opioids receptors. The opiate receptors. New Jersey: The Humana Press Clifton; 1988: 197-223. (Pasternak, W.G.).

-Greenberg, M.E., y Ziff, E.B. Stimulation of 3T3 induces transcription of the c-fos proto-oncogen. *Nature*; 1984; 311: 433-438.

-Grimm, E.V., y Herschkowitz, M. The effect of chronic diazepam treatment on discrimination performance and 3H-Flunitrazepam binding in the brains of shocked and nonshocked rats. *Psychopharmacology*; 1981; 74: 132-136.

-Gupits, R., Smith, T., Fairhurst, J., Yu, H. Adrenergic drugs promote changes in c-fos mRNA levels in brain. *Soc Neurosci Abstr*; 1988; 14: 1161.

-Haefely, W.E. Estructure and function of the benzodiazepine receptor. *Chimia*; 1987; 41:11: 389-396.

-Haefely, W. Ligands of the GABAA Receptor-Associated Benzodiazepine Receptor. *Neuroscience Facts*; 1992; 3:18: 69-70.

-Haegeler, K.D., y Schechter, P.J.,. Kinetics of the enantiomers of vigabatrin after an oral dose of the racemate or the active S-enantiomer. *Clin Pharmacol Ther*; 1986; 40: 581-586.

-Halonen, T., Miettinen, R., Toppinen, A., Tuunanen, J., Kotti, T., Riekkinen, J.P. Vigabatrin protects against kainic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*; 1995; 195: 13-16.

-Halonen, T., Pitkanen, A., y Riekkinen, J.P. Administration of Vigabatrin (gamma-vinyl-gamma-aminobutyric acid) affects the levels of both inhibitory and excitatory amino acids in rat cerebrospinal fluid. *J Neurochem*; 1990; 55: 1870-1874.

-Halonen, T., Pitkanen, A., Saano, V., y Riekkinen, J.P. Effects of vigabatrin (gamma-vinyl GABA) on neurotransmission-related amino acids and on GABA and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsia*; 1991; 32:2: 242-249.

-Hardy, C., Panksepp, J., Rosli, J. III y Zolovick, A.J. Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res*; 1980; 194: 293-297.

-Harrison, M.B., Shumate, M.D., y Lothman, E.W. Opioid peptide expression in models of chronic temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*; 1995; 65: 785-795.

-Harsing, L.G., Yang, H.Y.T., Costa, E. Evidence for a gamma-aminobutyric acid (GABA) mediation in the benzodiazepine inhibition of the release of

- me-enkephalin elicited by depolarization. *J Pharmacol Exp Therap*; 1982; 220(3): 616-620.
- Hauser, A.W., Annegers, F.J., y Kurland, T.L. Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*; 1993; 34:3: 453-468.
- Hengy, H., Kolle, E.U. Determination of gabapentin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and precolumn labelling for ultraviolet detection. *J Chromatogr*; 1985; 341: 473-478.
- Hill, R.D., Suman-Chauhan, N., Woodruff, N.G. Localization of 3H gabapentin to a novel site in rat brain: autoradiographic studies. *Eur J Pharmacol*; 1993; 244: 303-309.
- Ho, K.I., y Gilliland, T. Effects of acute and continuous morphine administration on the affinity of glutamic acid decarboxylase for pyridoxal 5-phosphate. *Biochem Pharmacol*; 1979; 28: 355-360.
- Holt, R.A., Bateson, A.N., Martin, I.L. Decreased GABA enhancement of benzodiazepine binding after a single dose of diazepam. *J Neurochem*; 1999; 72: 2219-2222.
- Horton, R.W., Prestwich, S.A., y Meldrum, B.S. Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine binding sites in audiogenic seizure- susceptible mice. *J Neurochem*; 1982; 39: 864-870.
- Hughes, J., Smith, T., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. y Morris, H.R. *Nature*; 1975; 258: 577-579.
- Iadarola, M.J., Shin, C., McNamara, J.O., y Yang, H.Y.T. Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res*; 1986; 365: 185-191.
- Itzak, Y. Multiple opioid binding sites. The opiate receptors. New Jersey: The Humana Press Clifton; 1988: 95-131. (Pasternak, W.G.).
- Jackson, F.M., Dennis, T., Esplin, B., y Capek, R. Acute effects of gamma-vinyl GABA (vigabatrin) on hippocampal GABAergic inhibition in vitro. *Brain Res*; 1994; 651: 85-91.
- Jaffe, H.J., y Martin, R.W. Opioid analgesics and antagonists. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Pergamon Press; 1990: 485-521. (Goodman Gilman, A., Rall, W.T., Nies, S.A., Taylor, P.).
- Jallon, P. The Problem of Intractability: The continuing Need for New Medical Therapies in Epilepsy. *Epilepsia*; 1997; 38:Suppl 9: S37-S42.
- Jianguo, C., Xuekong, X. A study on opioid peptides in CSF of patients with epilepsy. *Epilepsy Res*; 1990; 6: 141-145.
- Johansson, B., Georgiev, V., Kuosmanen, T., Fredholm, B.B. Long- term treatment with some methylxanthines decreases the susceptibility to bicuculine- and pentylenetetrazol- induces seizures in mice. Relationship to c-fos expression and receptor binding. *Eur J Neurosci*; 1996; 8: 2447-2458.
- Jorgensen, M.B., Deckert, J., Wroght, D.C., Gehlert, D.R. Delayed c-fos

proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res*; 1988; 484: 393-398.

-Jung, M.J., y Palfreyman, M.G. Vigabatrin: Mechanism of action. *Antiepileptic drugs*. New York: Raven Press; 1995: 903-913. (Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S.).

-Juul-Jensen, P. Epidemiology of intractable epilepsy. *Intractable epilepsy: experimental and clinical aspects*. New York: Raven Press; 1986: 5-11. (Schmidt, D., y Morselli, P.L.).

-Kaczmarek, L., Siedlecki, J.A., Danysz, W. Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Mol Brain Res*; 1988; 3: 183-186.

-Kalichman, M.W., Burnham, M.W., y Livingston, K.E. Pharmacological investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and fully-developed generalized seizures in the amygdala-kindled rat. *Neuropharmacology*; 1982; 21: 127-131.

-Kandel, E.R. Principles of neural science. New York: McGrawHill; 2000: 910-935. (Kandel, R.E., Schwartz, T., Jesell, M.).

-Kendall, D.A., Fox, D.A., y Enna, S.J. Effects of gamma-vinyl GABA on bicuculine-induced seizures. *Neuropharmacology*; 1981; 20: 351-355.

-Kish, S.J., Sperk, G., y Hornykiewicz, O. Alterations in benzodiazepine and GABA receptor binding in rat brain following systemic injection of kainic acid. *Neuropharmacology*; 1983; 22:11: 1303-1309.

-Knoll, J., y Zsilla, G. Possible mechanism of the low tolerance capacity of azidomorphine and azidocodeine. *Biochem Pharmacol*; 1974; 23: 745-750.

-Lason, W., Przewlocka, B., y Przewlocki, R. The prodynorphin system in the rat hippocampus is differentially influenced by kainic acid and pentetrazole. *Neuroscience*; 1992; 51: 357-362.

-Lau, L.F., Nathans, D. Expression of a set of growth-related immediate-early genes in BALB/c 3t3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci*; 1987; 81:1182-1186.

-Lee, M.F.W., Lin, C., y Curran, T. Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Molecular and Cellular Biology*; 1988; 8(12): 5521-5527.

-Le Gal La Salle, G., y Nauquet, R. Audiogenic seizures evoked in DBA/2 mice induce c-fos oncogene expression into subcortical auditory nuclei. *Brain Res*; 1990; 578: 308-312.

-Leppik E.I. Antiepileptic drugs in development:prospects for the near future. *Epilepsia*; 1994; 35(Suppl 4): S29-S40.

-Lin, S.C., Sutherland, V.C., y Way, E.L. Brain aminoacids in morphine tolerant and non-tolerant rats. *Proc West Pharmacol Soc*; 1973; 16: 8-13.

-Lippert, B., Metcalf, B., Jung, M.J., Casara, P. 4-amino-hex-5- enoic acid, a selective catalytic inhibitor of 4-aminobutyric acid aminotransferase in

mammalian brain. *Eur J Biochem*; 1977; 74: 441-445.

Lloyd, K.G., Bossi, L., Morselli, P.L., Munari, C., Rougier, M., Loiseau, H. Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Advances in Neurology*. New York: Raven; 1986: 1033-1044. (Delgado-Escueta, A.V., Ward, Jr, A.A., Woodbury, D.M., Porter, R.J.).

-Lloyd, K.G., Munari, C., Bossi, L., Stoeffels, C., Talairach, J., y Morselli, P.L. Biochemical evidence for the alterations of GABA mediated synaptic transmission in pathological brain tissue (stereo EEG or morphological definition) from epileptic patients. *Neurotransmitters, seizures and Epilepsy*. New York: Raven Press; 1981: 325-338. (Morselli, P.L., Lloyd, K.G., Loscher, W., Meldrum, B., y Reynolds, E.H.).

-Loscher, W. Animal models of intractable epilepsy. *Progress in Neurobiology*; 1997; 53: 239-258.

-Loscher, W., y Schmidt, D. Diazepam increases gamma-aminobutyric acid in human cerebrospinal fluid. *J Neurochem*; 1987; 49: 152-157.

-Loscher, W., Stanislaw, J., Czuczwar, J., Jackel, R., Schwarz, M. Effect of microinjections on the development of amygdala kindling in rats. *Experimental Neurology*; 1987; 95: 622-638.

-Loscher, W., Honack, D., Taylor, C.P. Gabapentin increases aminoxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci Lett*; 1991; 128: 150-154.

-Lothman, W.E., Stringer, L.J., Bertram, H.E. The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res*; 1992; Suppl 7: 301-313.

-Lupica, C.R. Delta y mu enkephalins inhibit spontaneous GABA- mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. *J Neurosci*; 1995; 15: 737-749.

-Maloteaux, J-M., Octave, J-N., Gossuin, A., Laterre, C., Trouet, A. GABA induces down-regulation of the benzodiazepine-GABA receptor complex in the rat cultured neurons. *European Journal of Pharmacology*; 1987; 144: 173-183.

-Marsan, A. Mechanisms of the epilepsies. Boston: Little Brown; 1969: 299. (Jasper, H.N., Ward, A.A., y Pope, A.).

-Mazarati, A., Liu, H., y Wasterlain, C. Opioid peptide pharmacology and immunocytochemistry in an animal model of self/sustaining status epilepticus. *Neuroscience*; 1999; 89: 167-173.

-McCormick, A.D. GABA as an Inhibitory Neurotransmitter in Human Cerebral Cortex. *J Neurophysiol*; 1989; 62:5: 1018-1027.

-McLean, J.M. Gabapentin. *Epilepsia*; 1995; 36(Suppl 2): S73-S86.

-McNamara, O.J. The neurobiological basis of epilepsy. *TINS*; 1992; 15:10: 357-359.

-Meldrum, B. Convulsant drugs, anticonvulsants and GABA-mediated neuronal inhibition. *GABA-neurotransmitters*: 1979: 390-405. (Krogsgard-Larsen, P., Scheell-Kruger, J., y Kofod, H.).

- Mennini, R., Caccia, S., y Garattini, S. Mechanism of action of anxiolytic drugs. *Prog Drug Res*; 1987; 31: 315-347.
- Miller, G.L., Greenblatt, J.D., Barnhill, G.J., y Shader, I.R. Chronic benzodiazepine administration. I. Tolerance is associated with benzodiazepine receptor down-regulation and decreased gamma-aminobutyric acid receptor function. *J Pharmacol Exp Therap*; 1988; 246: 170-176.
- Miller, W.J., McKeon, C.A., Ferrendelli, A.J. Functional anatomy of pentylenetetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem. *Ann Neurol*; 1987; 22: 615-621.
- Mitchell, R., y Wilson, L.E. Effects of GABA receptor agonists on 3H Flunitrazepam binding to rat cerebellar and hippocampal membranes. *Neuropharmacology*; 1983; 22: 935.
- Moneta, M.E., y Holtt, V. Perforant path kindling induces differential alterations in the mRNA levels coding for prodynorphin and proenkephalin in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*; 1990; 110: 273-278.
- Moratalla, R., Barth, T.M. y Bowery, N.G. Benzodiazepine receptor autoradiography in corpus striatum of rat after large frontal cortex lesions and chronic treatment with diazepam. *Neuropharmacology*; 1989; 28:9: 893-900.
- Morgan, I.J., Cohen, R.D., Hempstead, L.J., y Curran, T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*; 1987; 237: 192-196.
- Morgan, I.J., y Curran, T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *TIPS*; 1991; 12: 343-349.
- Morgan, P., Nakajima, T., y Linnoila, M. Psychological induction of brain c-fos mRNA. *Soc Neurosci Abstr*; 1988; 14: 289.
- Morris, B.J., Moneta, M.E., Bruggencate, T.G. y Holtt, V. Levels of prodynorphin mRNA in rat dentate gyrus are decreased during hippocampal kindling. *Neurosci Lett*; 1987; 80: 298-302.
- Motte, J., Da Silva Fernandes, M.J., Baram, Z.T., Nehlig, A. Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res*; 1998; 793: 61-72.
- Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*; 1984; 312: 716-720.
- Mumford, J.P., y Dam, M. Meta-analysis of placebo-controlled studies of vigabatrin in drug resistant epilepsy. *Br J Clin Pharmacol*; 1989; 27: S101-S107.
- Nakajima, T., Daval, J., Morgan, P., Marangos, P. c-fos mRNA expression in brain induced by subconvulsive doses of caffeine. *Soc Neurosci Abstr*; 1988; 14: 1161.
- Naranjo, J.R., Iandarola, M.J., Costa, E. Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling. *J Neurosci Res*; 1986; 16: 75-87.

- Nestler, J.E., Hope, T.B. y Widnell, L.K. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*; 1993; 11: 995-1006.
- Nobrega, J.N., Kish, S.J., y Burnham, W.M. Regional brain 3H- muscimol binding in kindled rat brain, a quantitative autoradiographic examination. *Epilepsy Res*; 1990; 6: 102-109.
- Olsen, R.W., Walsley, J.K., McCabe, R.T., Lee, R.J. y Lomax, P. Benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor deficit in the midbrain of the seizure-susceptible gerbils. *Proc Natl Acad Sci*; 1985; 82: 6701-6705.
- Olsen, R.W., Wamsley, J.K., Lee, R.J., y Lomax, P. Benzodiazepine/Barbiturate/GABA Receptor-Chloride Ionophore Complex in a Genetic Model for Generalized Epilepsy. *Advances in Neurology*; 1986; 44: 365-379.
- Olsen, R.W. GABA-drug interactions. *Prog Drug Res*; 1987; 31: 224- 238.
- Olsen, W.R., McCabe, T.R., Wamsley, K.J. GABAA Receptor Subtypes: Autoradiographic Comparison of GABA, Benzodiazepine, and Convulsant Binding Sites in the Rat Central Nervous System. *Journal of Chemical Neuroanatomy*; 1990; 3: 59-76.
- Olson, A.G., Olson, D.R. y Kastin, J.A. Endogenous Opiates: 1996. *Peptides*; 1997; 18:10: 1651-1688.
- Onoreda, H., Kogure, K., Ono, Y., Igarashi, K., Kiyota, Y., Nagaoka, A. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett*; 1989; 98: 101-104.
- Paul, M.S. y Skolnick, P. Rapid changes in brain benzodiazepine receptors after experimental seizures. *Science*; 1978; 202:24: 892-893.
- Paulsen, R.E. y Fonnum, F. Regulation of transmitter gamma- aminobutyric acid (GABA) synthesis and metabolism illustrated by the effect of gamma-vinyl GABA and hypoglycemia. *J Neurochem*; 1988; 50: 1151-1157.
- Paxinos, G., y Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, London. 1986. (Paxinos, G.).
- Pennypacker, K.R., Walczak, D., Thai, L., Fannin, R., Mason, E., Doyglass, J., Hong, J.S. Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expression in the rat hippocampus. *J Neurochem*; 1993; 60: 204-211.
- Perry, L.T., Kish, J.S., Hansen, S. Gamma-vinyl GABA: effects of chronic administration on the metabolism of GABA and other amino compounds in rat brain. *J Neurochem*; 1979; 32: 1641-1645.
- Pert, A., y Snyder, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*; 1973; 179: 1011-1014.
- Petroff, C.A.O., Hyder, F., Rothman, L.D., Mattson, H.R. Effects of gabapentin on brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in epilepsy patients. *Epilepsia*; 2000; 41(6): 675-680.
- Piguet, P., y North, R.A. Opioid actions at mu and delta receptors in the rat

dentate gyrus in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*; 1993; 266: 1139-1146.

-Popovici, T., Represa, A., Crepel, V., Barbin, G., Beaudoin, M., Ben-Ari, Y. Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. *Brain Res*; 1990; 17;536(1-2): 183-194.

-Rall, W.T. Hypnotics and sedatives: Ethanol. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Pergamon Press; 1990: 345-358. (Goodman Gilman, A., Rall, W.T., Nies, S.A., Taylor, P.).

-Rall, W.T., y Schleifer, S.L. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. New York: Pergamon Press; 1990: 436-462. (Goodman Gilman, A., Rall, W.T., Nies, S.A., Taylor, P.).

-Ramanjaneyulu, R., y Ticku, M. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur J Pharmacol*; 1984; 98: 337-345.

-Regesta, G., y Tanganelli, P. Biological bases of refractory epilepsies. Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs. London, England: John Libbey and Company; 1997: 217-229. (Avanzini, G., Regesta, G., Tanganelli, P., Avoli, M).

-Rehavi, M., Skolnick, P., y Paul, S.M. Effects of tetrazole derivatives on 3H diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency. *Eur J Pharmacol*; 1982; 78: 353-356.

-Rekling, C.J. Effects of Met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus. *J Neurosci*; 1993; 13:5: 1954-1964.

-Ribak, C.E., Bradburne, R.M., y Harris A.B. A preferential loss of GABAergic, symmetric synapses in epileptic foci: a quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. *J Neurosci*. 1982; 2(12):1725-35.

-Richens, A., Clinical pharmacokinetics of gabapentin. New trends in epilepsy management: the role of gabapentin. London: Royal Society of Medicine Services; 1993: 41-46. (Chadwick, D.).

-Rocha, L., Ackermann, R.F., Engel Jr, J. Chronic an single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Res*; 1996a; 24: 65-72.

-Rocha, L., Ackermann, R.F., Engel Jr, J. Effects of chronic morphine pretreatment on amygdaloid kindling development, postictal seizure and suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Res*; 1996b; 23: 23.

-Rocha, L., Ackermann, R.F., Nassir, Y., Chugani, H.T., y Engel Jr, J. Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: and autoradiographic study. *Epilepsy Res*; 1993a; 14: 195-208.

-Rocha, L., Briones, M., Ackermann, R.F., Anton, B., Maidment, N.T., Evans, C.J. and Engel, J.Jr. Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res.*; 1996c; 26: 105-113.

-Rocha, L., Cano, A., Cruz, C., Omana-Zapata, I., Villalobos, R., Maidment,

- N.T. Opioid peptide systems following a subconvulsant dose of pentylenetetrazol in rats. *Epilepsy Res*; 1999b; 37: 141-150.
- Rocha, L., Engel, J. Jr., y Ackermann R.F. Effects of chronic naloxone pretreatment on amygdaloid kindling in rats. *Epilepsy Res*. 1991; 10(2-3):103-10.
- Rocha, L., Maidment, N.T., Evans, C.J., Ackermann, R.F., Engel Jr, J. Microdialysis reveals changes in extracellular opioid peptide levels in the amygdala induced by amygdaloid kindling stimulation. *Exp Neurol*; 1994; 126: 277-283.
- Rocha, L., Ondarza-Rovira, R. Characterization of benzodiazepine receptor binding following kainic acid administration: and autoradiography study in rats. *Neurosci Lett*; 1999a; 262: 211- 214.
- Rocha, L., Ondarza-Rovira, R., Maidment, N.T. Gabapentin modifies extracellular opioid peptide content in amygdala: a microdialysis study. *Epilepsy Res*; 1999; 35: 13-20.
- Rocha, L., Tatsukawa, K., Chugani, H.T., Engel Jr, J. Benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with naloxone, morphine and met-enkephalin in normal rats. *Brain Res*; 1993b; 612: 247-252.
- Rosenberg, C.H. y Chiu, H.T. Decreased 3H-diazepam binding is a specific response to chronic benzodiazepine treatment. *Life Science*; 1979; 24: 803-808.
- Rosenberg, C.H., y Chiu, H.T. Regional specificity of benzodiazepine receptor down-regulation during chronic treatment of rats with flurazepam. *Neurosci Lett*; 1981; 24:49-52.
- Rosenberg, C.H., y Chiu, H.T. Tolerance during chronic benzodiazepine treatment associated with decreased receptor binding. *Eur J Pharmacol*; 1981a; 70: 453-460.
- Ross, M.S. y Craig, R.C. Gamma-aminobutyric acid concentration, L-glutamate 1-decarboxylase activity, and properties of the gamma-aminobutyric acid postsynaptic receptor in cobalt epilepsy in the rat. *J Neurosci*; 1981; 1:12: 1388-1396.
- Rothstein, D.J., y Kuncl, W.R. Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *J Neurochem*; 1995; 65: 643-651.
- Rozsa, S.K., Rubakhin, S.S., Szucs, A., y Stefano, B.G. Met-enkephalin and morphiceptin modulate a GABA-induced inward current in the CNS of *Lymnaea stagnalis* L. *Gen Pharmac*; 1996; 27:8: 1337-1345.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*; 1988; 240: 1328-1331.
- Saletu, B., Grunberger, J., Linzmayer, L et al. Psychophysiological and psychometric studies after manipulating the GABA system by vigabatrin, a GABA transaminase inhibitor. *Int J Psychophysiol*; 1986; 4: 63-80.
- Sambucetti, L.C., y Curran, T. The fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science*; 1986; 234: 1417-1419.

- Satzinger, G. Antiepileptics from gamma-aminobutyric acid. *Arzneimittelforschung*; 1994; 44: 261-266.
- Savic, I., Roland, P., Sedvall, G., Persson, A., Pauli, S., Widen, L. In-vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *The Lancet*; 1988; 8616: 863-866.
- Schachter, C.S. Advances in the assessment of refractory epilepsy. *Epilepsia*; 1993; 34:Suppl 5: S24-S30.
- Schechter, P.J., Tranier, Y., Grove, J. Attempts to correlate alterations in brain GABA metabolism by GABA-T inhibitors with their anticonvulsant effects. GABA - biochemistry and CNS functions. New York: Plenum Press; 1979: 43-57. (Mandel, P., DeFeudes, F.V.).
- Schmid, L., Bottlaender, M., Brouillet, E., Fuseau, C., y Maziere, M. Vigabatrin modulates benzodiazepine receptor activity in vivo: a positron emission tomography study in baboon. *J Pharmacol Exp Therap*; 1996; 276: 977-983.
- Schmidt, B. Potential antiepileptic drugs: gabapentin. *Antiepileptic drugs*. New York: Raven Press; 1989: 925-935. (Levy, R., Mattson, R., Meldrum, B., Penry, J.K., Dreifuss, F.E.).
- Schmidt, D., y Loscher, W. GABA concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of patients with epileptic seizures. *Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy*. New York: Raven; 1981: 315-324. (Morselli, P.L., Lloyd, K.G., Loscher, W., Meldrum, B., Reynolds, E.H.).
- Schofield, R.P., Darlison, G.M., Fujita, N., Burt, R.D., Stephenson, A.F., Rodriguez, H., Rhee, M.L., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, A.T., Seeburg, H.P., Barnard, A.E. Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*; 1987; 328:16: 221-227.
- Schulze-Bonhage, A., Wiemann, M., Altrup, U., Wittkowski, W., Speckmann, E-J. Epileptic discharges induced by pentylenetetrazol: ultrastructural alterations in identified neurons and glial cells (Helix pomatia). *Epilepsy Res*; 1995; 22: 23-34.
- Schwark, W.S., Frey, H.H., y Czuczwar, S.J. Effects of opiates on the parameters of seizures in rats with full amygdaloid-kindled convulsions. *Neuropharmacology*; 1986; 25: 839-844.
- Sharp, F.R., Gonzalez M.F, Sharp J.W., y Sagar S.M. c-fos expression and (14C) 2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. *J Comp Neurol*; 1989; 284: 621-636.
- Shehab, S., Coffey, P., Dean, P., y Redgrave, P. Regional expression of Fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock. *Experimental Neurology*; 1992; 118: 261-2743.
- Shin, C., Pedersen, B.H., y McNamara, O.J. Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in the kindling model of epilepsy: a quantitative radiohistochemical study. *J Neurosci*; 1985; 5:10: 2696-2701.
- Shin, C., Cohen, D., Butler, L., McNamara, J.O. Kindling stimulation induces

- c-fos mRNA expression in rat hippocampus. Soc Neurosci Abstr; 1988; 14: 575.
- Shin, C., y McNamara, O.J. Mechanism of Epilepsy. Annu. Rev. Med.; 1994; 45: 379-389.
- Shinoda, H., Nadi, SN., Schwartz, P.J. Alterations in somatostatin and proenkephalin mRNA in response to a single amygdaloid stimulation versus kindling. Molecular Brain Research; 1991; 11: 221-226.
- Simón, E.J., Hiller, J.M. y Edelman, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. Proc Natl Acad Sci; 1973; 70: 1947-1949.
- Sivam, S.P., Nabeshima, T., y Ho, J.K. Alterations of regional gamma-aminobutyric acid receptors in morphine tolerant mice. Biochem Pharmacol; 1981; 30: 2187-2190.
- Sivam, S.P., Nabeshima, T., y Ho, I.K. An analysis of GABA receptor changes in the discrete regions of mouse brain after acute and chronic treatments with morphine. J Neurochem; 1982; 39: 933-939.
- Sivenius, J., Ylisen, A., Murros, K y cols. Vigabatrin in drug-resistant epilepsy: a 5-year follow study. Neurology; 1991; 41: 562-565.
- Sonnenberg, J.L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P.F., Hempstead, J., Morgan, J.I. and Curran, T. Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. J. Neurosci. Res.; 1989; 24: 24-72.
- Stefani, A., Spadoni, F., Bernardi, G. Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons. Neuropharmacology; 1998; 37(1): 83-91.
- Suman-Chauhan, N., Webdale, L., Hill, D.R. y Woodruff, G.N. Characterisation of 3H Gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. Eur J Pharmacol; 1993; 244: 293.
- Syapin, P.J. y Rickman, D.W. Benzodiazepine receptor increase following repeated pentylentetrazole injections. Eur J Pharmacol; 1981; 72: 117-120.
- Talavera, E., Omana-Zapata, I., Asai, M., Condes-Lara, M. Regional brain IR-Met-, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. Brain Res; 1989; 485: 141-148.
- Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P., y Gallager, D.W. Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. Science; 1980; 207: 274.
- Tanaka, T., Tanaka, S., Fujita, T., Takano, K., Fukuda, H., Sako, K., y Yonemasu, Y. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. Progress in Neurobiology; 1992; 38: 317-334.
- Taylor, C.P., Vartanian, M.G., Andruszkiewicz, R., Silverman, R.B. 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents. Epilepsy Res; 1992; 11: 103-110.
- Taylor, C.P. Emerging perspectives on the mechanism of action of gabapentin. Neurology; 1994; 44:Suppl 5: S10-S16.

- Taylor, C.P. Gabapentin: mechanism of action. *Antiepileptic Drugs*. New York: Raven Press; 1995: 829-841. (Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S.).
- Taylor, C.P. Mechanism of action of new anti-epileptic drugs. *New trends in epilepsy management: the role of gabapentin*. London: Royal Society of Medicine Services; 1993: 13-40. (Chadwick, D).
- Taylor, P.C., Gee, S.N., Su, T-Z., Kocsis, D.J., Welty, F.D., Brown, P.J., Dooley, J.D., Boden, P., Singh, L. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res*; 1998; 29: 233-249.
- Terenius, L. Endogenous peptides and analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 1978; 18: 189-204.
- Theodore, W.H. National institutes of health consensus development conference statement: surgery for epilepsy. *Surgical treatment of epilepsy*. Amsterdam: Elsevier; 1992: 241-246.
- Tietz, I.E., Rosenberg, C.H. y Chiu, H.T. Autoradiographic localization of benzodiazepine receptor downregulation. *J Pharmacol Exp Therap*; 1986; 236(1): 284-292.
- Tippets, M.T., Varnum, B.C., Lim, R.W., Herschman, H.R. Tumor promoter-inducible genes are differentially expressed in the developing mouse. *Mol Cell Biol*; 1988; 8: 4570-4572.
- Tortella, C.F. y Long, B.J. Endogenous anticonvulsant substance in rat cerebrospinal fluid after a generalized seizure. *Science*; 1985; 228: 1106-1108.
- Tuff, L.P., Racine, R.J., y Adamec, R. The effects of kindling on GABA-Mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. Paired-pulse depression. *Brain Res*; 1983; 277: 79-90.
- Tzeng, S.F., y Ho, I.K. Acute and continuous morphine administration on the gamma-aminobutyric acid system in the mouse. *Neuro Psychopharmacol*; 1978; 2: 55-64.
- Verhoeff, G.L.P.N., Petroff, C.A.O., Hyder, F., Zoghbi, S.S., Fujita, M., Rajeevan, N., Rothman, L.D., Seybyl, P.J., Mattson, H.R. y Innis, B.R. Effects of vigabatrin on the GABAergic system as determined by ¹²³I-Iomazenil SPECT and GABA MRS. *Epilepsia*; 1999; 40(10): 1433-1438.
- Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., y Fernandez-Guardiola, A. Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*; 1981; 21: 39-43.
- Vles, J.S.H., van der Heyden, A.M.G.H., y Ghijs, A y cols. Vigabatrin in the treatment of infantile spasms. *Neuropediatrics*; 1993; 24: 231-231.
- Vohland, H.W., y Koransky, W. Effect of alfa- hexachlorocyclohexane on metabolism and excretion of pentetrazol (cardiazol) in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 1972; 273: 99-108.
- vollmer, K.O., von Hodenberg, A., y Kollé, E.U. Pharmacokinetics and metabolism of gabapentin in rat, dog and man. *Arzneimittelforschung*; 1986; 36: 830-839.

-Wagner, J.J., Caudle, R.M., Neumaier, J.F. y Chavkin, C. Stimulation of endogenous opioid release displaces mu receptor binding in rat hippocampus. *Neuroscience*; 1990; 37:45-53.

-Wastek, G.J., Speth, R.C., Reisine, T.D., y Yamamura, H.I. The effect of gamma-aminobutyric acid on 3H-Flunitrazepam binding in rat brain. *J Pharmacol*; 1978; 50: 445.

-Wood, J.H., Hare, T.A., Glaeser, B.S., Ballenger, J.C. y Post, R.M. Cerebro-spinal fluid GABA reductions in seizure patients. *Neurology*; 1979; 29: 1203-1208.

-Woodbury, D. Convulsant drugs: Mechanisms of action. *Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action*. New York: Raven Press; 1980: 249. (Glaser, G.H., Penny, J.K., y Woodbury, D.M.).

-Xie, C.W. y Lewis, D.V. Endogenous opioids regulate long-term potentiation of synaptic inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. *J Neurosci*; 1995; 15:5: 3788-3795.

-Ylinen, M.A.A., Miettinen, R., Pitkanen, A., Gulyas, I.A., Freund, F.T., Riekkinen, J.P. Enhanced GABAergic inhibition preserves hippocampal structure and function in a model of epilepsy. *Proc Natl Acad Sci*; 1991; 88: 7650-7653.

-Yoshida, K., Tanaka, T., Hashizume, K., Yonemasu, Y. Central-type benzodiazepine receptor binding image in kainic acid-induced seizures. *Epilepsia*; 1996; 37:Suppl 3: 65-66.

-Zieglgansberger, W., French, E.D., Siggins, G.R, y Bloom, F.E. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science*; 1979; 205:27: 415-417.

-Zubieta, M., Vindrola, O., Talavera, E., Asai, M., Massarini, A., Linares, G. Pentylentetrazol-induced seizures produce and increased release of IR-met-enkephalin from rat striatum in vivo. *Brain Res*; 1985; 360: 101-107.