



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES μ
EN CEREBRO DE RATAS A DIFERENTES EDADES
TRATADAS CON ACIDO KAINICO

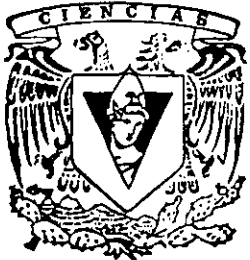
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CLAUDIA PEREZ CRUZ



FACULTAD DE CIENCIAS MEXICO, D.F.
UNAM

TUTORA: A. LUZ L. FLORES VARRIETA



2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
 " Evaluación de los niveles de receptores μ en cerebro de ratas
 a diferentes edades tratadas con Acido Káinico"

realizado por Claudia Pérez Cruz

con número de cuenta 9551961-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Propietario Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Propietario Dra. María Luisa Fanjul de Moles

Suplente Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Suplente Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Consejo Departamental de la Facultad de Ciencias
 de la Carrera de Biología

Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre, porque siempre has estado a mí lado y apoyando todas mis decisiones, porque eres mi amiga, mi confidente y mi sobretodo mí madre.

A mis hermanos, dos de ellos regados en el mundo pero muy cerca de nosotros.

Isa, porque me enseñaste el camino aunque tomé otra vereda. Por tu fuerza y tu inteligencia. Por ser el perrín mayor.

Gabo, por tener una manera muy tuya de vivir la vida, por saber muchas cosas y siempre tener una respuesta a mis preguntas. Por tu manera de querer.

Ale, por tus ideales que siempre tienes muy presentes, por ser un artista. Por tu compañía y porque sé que siempre podré contar contigo. A Hoini por ser una gran cuñadita.

A Abud, porque siempre de los siempre estás conmigo. Por todo lo que hemos vivido juntos, por las risas, por los paisajes, por las excursiones, por las buceadas, por lo que aprendemos todo el tiempo el uno del otro.

A Sabashka y a Mao, por ladrar y maullar siempre justo cuando tengo sueño.

A Bárbara, Alejandra, Diana, Heidi, Xanic, Lorena, Gabriel, y demás amigos con los que he crecido y seguiré creciendo. Ala chop por ser la representación de una gran amistad.

A la Dra. Luisa Rocha, porque siempre ha alentado mis proyectos, muchos de los cuales solo fueron posibles gracias a su apoyo. Por su dedicación, por su ejemplo y por sus enseñanzas.

A Leo y Lili, por sus elocuencias y por compartir el mismo labo. Sin su compañía la investigación no sería igual.

A Leti (por su cariño), Eva (por su talento), Chela (por su perseverancia), Male (por su experiencia), Ceci (por su fuerza),: a todas las que formamos parte de este gran equipo.

Al Dr. Fernandez-Guardiola, por ser un ejemplo a seguir y una gran persona.

A toda mi familia, amigos y compañeros que por falta de espacio no suenan en ésta página, pero quienes están inmersos en mí vida y en mi desarrollo como persona, amiga, compañera, hija, hermana, nieta, prima, sobrina o incluso vecina.

A la UNAM por ser mi casa de estudios durante los mejores años de mi vida. A mis maestros y compañeros. Al Instituto Nacional de Psiquiatría y al CINVESTAV por acogerme como estudiante durante el desarrollo de esta tesis.

El presente estudio fue llevado a cabo en el Departamento de Farmacobiología Unidad Sur del CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados) y en el Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente". Fue financiado parcialmente por el proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con clave 31702-M.

ABREVIATURAS

EEG: Electroencefalograma

CTG: Convulsiones tónico-clónicas generalizadas

EE: *Status Epilepticus*

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal

EAA: Esclerosis del asta de Ammon

AK: ácido kaínico

Glu: ac. Glutámico

i.c.v. : intracerebroventricular

i.p. : intraperitoneal

NMDA: N-metil-D-aspartato

SN: sustancia nigra (snr, pars reticulata; snc, pars compacta)

SPM: sacudidas de perro mojado

SNC: Sistema Nervioso Central

INDICE

ABREVIATURAS 4

RESUMEN 5

INTRODUCCIÓN 6

1.1 BREVE RECUENTO DE LA HISTORIA. 6

1.2 ¿QUÉ ES LA EPILEPSIA? 6

1.3 CLASIFICACIÓN DE CRISIS Y ESTADOS EPILÉPTICOS 7

1.4 FACTORES CAUSALES DE LA EPILEPSIA Y DAÑO PRODUCIDO POR LAS CRISIS. 8

1.5 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL. 9

1.5.1 **MODELOS DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL.** 12

1.6 ACIDO KAÍNICO COMO MODELO PARA GENERAR EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL. 13

1.7 RECEPTORES AL ACIDO KAÍNICO. 13

1.8 MECANISMOS DE ACCIÓN Y NEUROTOXICIDAD DE ÁCIDO KAÍNICO. 14

1.9 DAÑOS REGIONALES PRODUCIDOS POR EL AK. 15

1.10 CRISIS LÍMBICAS INDUCIDAS CON AK. 16

1.11 EPILEPSIA Y EDAD. 18

1.11.1 **SUSCEPTIBILIDAD EN SUJETOS JÓVENES A GENERAR CRISIS EPILÉPTICAS.** 19

1.11.2 **CRISIS EPILÉPTICAS EN SUJETOS ADULTOS.** 20

1.11.3 **DAÑOS Y CONSECUENCIAS DE LA EPILEPSIA EN SUJETOS VIEJOS.** 21

1.12 ACIDO KAÍNICO Y ONTOGENIA DE LA EPILEPSIA. 22

1.13 OPIOIDES ENDOGÉENOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. 23

1.13.1 **PROCESAMIENTO DE PÉPTIDOS OPIOIDES. PRECURSORES.** 23

1.13.2 **LIBERACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS PÉPTIDOS OPIOIDES.** 24

1.14 RECEPTORES A PÉPTIDOS OPIOIDES. 25

1.14.1 **TIPOS DE RECEPTORES.** 25

1.14.2 **ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE RECEPTORES OPIOIDES.** 26

1.14.3 **DESARROLLO DE RECEPTORES.** 27

1.14.4 **RECEPTORES μ .** 28

1.15 RECEPTORES μ Y EPILEPSIA. 29

1.15.1	AK Y RECEPTORES μ	31
--------	-----------------------------	----

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 32

HIPÓTESIS 33

OBJETIVO GENERAL 33

OBJETIVOS PARTICULARES 33

MATERIAL Y MÉTODOS 34

1.16	ANIMALES.....	34
1.17	TRATAMIENTO CON ACIDO KAÍNICO.....	34
1.18	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	35
1.18.1	RECEPTORES μ Y ONTOGENIA.....	35
1.18.2	RECEPTORES μ Y EPILEPSIA.....	36
1.19	TÉCNICA DE AUTORADIOGRAFÍA.....	36
1.20	ESTRUCTURAS ANALIZADAS.....	37
1.21	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38

RESULTADOS 38

1.22	NIVELES DE RECEPTORES μ EN LA ONTOGENÍA.....	38
1.22.1	RATAS JÓVENES.....	39
1.22.2	RATAS ADOLESCENTES.....	39
1.22.3	RATAS ADULTAS.....	39
1.22.4	RATAS VIEJAS.....	39
1.22.5	RATAS MUY VIEJAS.....	40
1.23	EFEECTO DEL AK EN LOS NIVELES DE RECEPTORES μ	45
1.23.1	RATAS ADULTAS.....	45

1.23.2	RATAS JÓVENES.....	45
1.23.3	RATAS VIEJAS.....	46

DISCUSIÓN	54
------------------	-------	-----------

CONCLUSIONES	60
---------------------	-------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	61
---------------------	-------	-----------

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1	PRECURSORES DE PÉPTIDOS OPIÓIDES Y LOS PÉPTIDOS QUE DAN ORIGEN	24
TABLA 2	OPIOIDES ENDÓGENOS EN CEREBRO DE RATA Y SUS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS	25
TABLA 3	DISTRIBUCIÓN REGIONAL DE UNIÓN DE μ_1 , μ_2 Y δ EN EL RATÓN.....	27
TABLA 4	VALORES DE LOS NIVELES DE SITIOS DE UNIÓN CON $^3\text{H-DAGO}$ EN LOS GRUPOS DE ONTOGENIA.	41
TABLA 5.	SITIOS DE UNIÓN MARCADOS CON $^3\text{H-DAGO}$ DE LOS SUJETOS SS Y LOS TRATADOS CON (AK).....	47
FIGURA 1	HIPÓTESIS QUE EXPLICAN LA ESCLEROSIS DEL ASTA DE AMMON.	11
FIGURA 2.	REPRESENTACIÓN DE LA MOLÉCULA DE AK Y EL RECEPTOR DE GLUTAMATO NO-	14
FIGURA 4	CRISIS LÍMBICAS INDUCIDAS POR ÁCIDO KAINICO.....	18
FIGURA 5.	REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS SITIOS DE UNIÓN A μ_1 , μ_2 Y δ	29
FIGURA 6.	NIVELES DE UNIÓN A $^3\text{H-DAGO}$ EN CORTEZAS DE RATAS A DIFERENTES EDADES.....	42
FIGURA 7.	NIVELES DE UNIÓN A RECEPTORES μ EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA LÍMBIC	43
FIGURA 8.	LOS NIVELES DE RECEPTORES μ EN OTRAS ESTRUCTURAS	44
FIGURA 9.	PORCENTAJE DE UNIÓN DE RECEPTORES μ DEL GRUPO AAK1D COMPARADO CON ASS.	48
FIGURA 10.	CAMBIOS EN PORCENTAJE DE RECEPTORES μ DEL GRUPO AAK40D COMPARADO CON ASS.....	48
FIGURA 11.	CAMBIOS PORCENTUALES DE RECEPTORES μ EN LAS RATAS JAK3D Y JAK40D.....	49
FIGURA 12.	NIVELES DE RECEPTORES μ EN RATAS VAK1D Y VAK40D COMPARADO SIS CONTROLES	49
FIGURA 13.	DISTRIBUCIÓN NORMAL DE RECEPTORES μ EN UNA RATA A Y UNA RATA B A.....	50
FIGURA 14.	RECEPTORES μ EN CEREBRO DE UNA RATA ASS Y UNA AAK1D.....	51
FIGURA 15.	DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES μ EN CEREBRO DE UNA ASS Y UNA AAK40D	52
FIGURA 16.	RECEPTORES μ EN SECCIONES DE UNA RATA VSS1D (A) Y UNA RATA DEL GRUPO VAK1D (B).....	53

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron los cambios de receptores μ inmediatos y a largo plazo inducidos por AK en estructuras cerebrales relacionadas con la epilepsia en ratas de diferentes edades. El ácido kaínico (AK) es un modelo para generar *status epilepticus* (EE) y un subsecuente daño neuronal que asemeja la Epilepsia del Lóbulo Temporal; ambos efectos inducen cambios en la regulación de los receptores μ . La aplicación de agonistas μ induce la aparición de convulsiones, aunque también están involucrados en el periodo postictal e interictal. Se utilizaron ratas Wistar macho, tratadas con solución salina (SS) o AK. Ratas jóvenes (J, 15 días de edad) fueron sacrificadas 72 horas (JSS3d, JAK3d) o 40 días (JSS40d, JAK40d) después del tratamiento, ratas adultas (A, 6 meses de edad)(ASS, AAK1d, AAK40d) y viejas (V, 12 meses de edad)(VSS1d, VAK1d, VSS40d y VAK40d), además de ratas adolescentes (Ad) y muy viejas (MV) tratadas con ss. Los cerebros se procesaron por la técnica de autoradiografía para receptores μ . Se utilizó una ANOVA para los datos de ontogenia, y t-Student para los de AK. Los resultados muestran un patrón, donde las ratas J presentan los más altos niveles de receptores μ y las ratas Ad, V y MV los más bajos. Por otra parte, las ratas AAK1d presentaron aumento de receptores μ principalmente en cortezas y estructuras del Sistema Límbico (SL). En el grupo AAK40d los receptores μ incrementaron en SL. Las ratas JAK3d tuvieron disminución de receptores μ en sustancia nigra pars (snr) reticulata y aumento en giro dentado. En el grupo JAK40d disminuyeron en snr y caudado putamen. Las ratas VSS1d tuvieron disminución de receptores μ principalmente en cortezas, mientras que en VAK40d aumentaron en SL. Se concluye que el efecto del AK en la regulación de los receptores μ difiere en la ontogenia. Los cambios en los receptores μ observados en ratas A pueden asociarse a mecanismos para evitar la propagación de las crisis, principalmente en cortezas. La alta susceptibilidad a las crisis de las ratas J pudiera estar relacionada con niveles altos de receptores μ . Por otra parte, en las ratas V este mecanismo pudiera estar retardado relacionado con la degeneración neuronal a esta edad y la incidencia de un mayor daño neuronal.

INTRODUCCIÓN

1.1 Breve Recuento de la Historia.

Los trastornos mentales han sido objeto de estudio desde tiempos inmemoriales. En la época de Hipócrates (400 a.c.) se trataba de encontrar una relación entre lesiones craneales y las crisis producidas tiempo después. Los análisis modernos en neurobiología de la epilepsia empezaron con John H. Jackson en Londres por 1860, quien relacionó que las crisis no siempre están asociadas con la pérdida de la conciencia, pero sí con alteraciones cerebrales focales. Él definió así a las crisis que empiezan con síntomas focales neurológicos y progresan a convulsiones con pérdida de la conciencia como "marcha Jacksoniana" (Engel, 1995). Poco después, Victor Horsley en 1886, realizó un tratamiento quirúrgico seccionando el córtex adyacente a una fractura craneal logrando curar a pacientes con crisis motoras focales.

Las innovaciones médicas en el uso de fármacos anticonvulsivos como los barbitúricos, el desarrollo de la electroencefalografía (EEG) con Hans Berger en 1929, los trabajos de cirugía que datan de los años 1950's con Wilder Penfield y Herbert Jasper, así como la ahora muy utilizada técnica de microdiálisis han permitido entender mejor lo que se conoce como epilepsia (Kandel et al., 2000).

1.2 ¿Qué es la Epilepsia?

Por medio de la electrofisiología se demostró que la epilepsia es una alteración en la excitabilidad de las neuronas. El individuo predispuesto a la epilepsia padece ataques cuando el nivel de excitabilidad de su sistema nervioso se eleva por encima de cierto umbral. El término "crisis" se refiere a un cambio del comportamiento debido a sincronías, alteraciones y disparos rítmicos de una población de neuronas. El término "epilepsia" se refiere a las alteraciones de las funciones del cerebro caracterizado por la aparición de crisis periódicas e

impredicibles. Las crisis pueden ser "no-epilépticas" cuando son evocadas en un cerebro normal por tratamientos como electrochoques (EEC) o químicos convulsivos y "epilépticas" cuando ocurren sin aparente provocación y son la manifestación clínica de una actividad neuronal excesiva y/o hipsincrónica en la corteza cerebral (Engel, 1989).

La epilepsia, considerada como un estado de crisis espontáneas recurrentes presenta componentes electroencefalográficos (EEG) y conductuales que pueden clasificarse como periodo ictal, postictal e interictal (Engel y Rocha, 1992). El término "ictal" se refiere al periodo de la crisis *per se*. El periodo "postictal" se presenta durante los primeros 30 minutos después de una crisis. En esta etapa la crisis termina (EEG y clínicamente) dando lugar a una depresión postictal caracterizada por una inmovilidad conductual, proponiéndose que este sea un proceso activo de inhibición (Engel et al., 1991). En este periodo se presenta un estado refractario que impide la generación de nuevas crisis y va acompañado de conductas específicas como depresión y agresividad que se han relacionado con la liberación de péptidos opioides (Caldecott-Hazard et al., 1983).

El periodo "interictal" es el periodo entre crisis y crisis. Durante esta etapa se presentan descargas interictales, cuando neuronas en una cierta región generan sincronizadamente una despolarización larga, la cual es seguida de un potencial hiperpolarizante y una inhibición neuronal de las áreas circunvecinas al foco epiléptico. Este periodo puede durar unas horas o incluso años.

La epilepsia presenta así un incremento en las influencias inhibitorias durante el estado postictal e interictal lo que puede reflejar un mecanismo homeostático para prevenir la iniciación de una nueva crisis o restringir la propagación ictal una vez que la epileptogénesis ocurre (Engel et al., 1991).

1.3 Clasificación de Crisis y Estados Epilépticos

La crisis epilépticas se clasifican como crisis parciales cuando involucran solo una parte del cerebro o como crisis generalizadas cuando abarcan ambos

hemisferios. A continuación se presenta una clasificación de crisis epilépticas de *Liga Internacional contra la Epilepsia* (Baucaud y Henrkinzan, 1981; 1989).

- I. Crisis Parciales (Focales, Locales)
 - A. Crisis parciales simples
 - 1. Con signos motores
 - 2. Con síntomas somatosensoriales o sensoriales especiales
 - 3. Con síntomas o signos autonómicos
 - 4. Con síntomas psíquicos
 - B. Crisis parciales complejas
 - 1. Con alteraciones de la conciencia al inicio
 - 2. Parcial simple al inicio, seguida de deterioro de la conciencia
 - C. Crisis parciales que involucran a convulsiones tónico-clónicas generalizadas (CTG)
 - 1. Simples que evolucionan a (CTG)
 - 2. Complejas que evolucionan a (CTG) (incluyendo aquellas con inicio parcial)
 - 3. Simples parciales que evolucionan a parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas
- II. Crisis Generalizadas (convulsivas o no convulsivas)
 - A. Crisis de ausencia
 - 1. Ausencias típicas
 - 2. Ausencias atípicas
 - B. Crisis mioclónicas
 - C. Crisis clónicas
 - D. Crisis tónicas
 - E. Crisis tónico-clónicas
 - F. Crisis atónicas
- III. Crisis epilépticas no clasificadas: Incluyen todas las crisis que no pueden clasificarse debido a datos incompletos o inadecuados.
- IV. Adendum
 - A. Crisis epilépticas repetidas que ocurren en diversas circunstancias:
 - 1. Ataques fortuitos, que llegan inesperadamente y sin alguna provocación.
 - 2. Ataques cíclicos, más o menos a intervalos regulares (ejemplo, con relación al ciclo menstrual o ciclo sueño-vigilia)
 - 3. Ataques provocados por factores sensoriales (fatiga, alcoholismo, emoción, etc.) o referidos como crisis reflejas.
 - B. Crisis prolongadas o repetitivas *status epilepticus* (EE). "Status" implica estado fijo o persistente.

1.4 Factores causales de la epilepsia y daño producido por las crisis.

Desde el punto de vista morfológico, se pueden analizar las alteraciones relacionadas a la epilepsia desde dos enfoques (Feria-Velazco y González-Angulo, 1991).

1. Alteraciones consideradas como parte de los factores causales de las crisis epilépticas: Cualquier evento que dañe al cerebro como son traumas craneales, tumores, hemorragias, infecciones o anomalías del desarrollo, así como también por causas metabólicas como hipoxia, hipoglicemia, hiponatremia, periodos de abstinencia al alcohol o drogas en sujetos adictos, drogas estimulantes, hipocalcemia, hipotiroidismo, uremia, vasculitis difusa y enfermedades de desmielinización.

2. Alteraciones cerebrales o daño producido por crisis convulsivas: Se ha observado que una convulsión generalizada por sí sola no produce cambios estructurales en el Sistema Nervioso Central (SNC), sino que es la recurrencia y repetitividad de episodios convulsivos visto principalmente en pacientes con EE. Uno de las patologías que con mayor frecuencia se presenta en pacientes epilépticos se observa en el asta de Ammon del hipocampo (CA1 y CA3 presentan esclerosis, gliosis y destrucción local de neuronas), en cerebelo (depoblación de células de Purkinje, gliosis fibrilar de la corteza) y tálamo (gliosis). Otras zonas susceptibles son las cortezas del cíngulo y lóbulo frontal (destrucción neuronal y gliosis de tipo fibrilar) así como regiones del cuerpo estriado (las lesiones son menos frecuentes presentando isquemia transitoria) (Feria-Velazco y González-Angulo, 1991).

1.5 Epilepsia del Lóbulo Temporal.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) o epilepsia parcial compleja es la forma más frecuente de epilepsia (40% de los casos de epilepsia) (Annegers et al., 1975). La ELT se caracteriza por crisis parciales simples, crisis parciales complejas, crisis secundariamente generalizadas o bien la combinación de las tres. En la mayoría de los casos se origina de una anomalía intrínseca del lóbulo temporal ya que la resección de éste último elimina las crisis epilépticas en un 80-90% de los pacientes refractarios a medicamentos tradicionales con este tipo de epilepsia (Spencer et al., 1992).

Existen diferentes modelos experimentales que ayudan a estudiar los tipos de crisis epilépticas (ver 1.5.1), gracias a ellos se ha podido determinar que la ELT se asocia a la presencia de esclerosis del asta de Ammon (EAA) caracterizado por

gliosis y una impresionante pérdida de neuronas piramidales del hipocampo en células en CA1 y CA3. El giro dentado se observa encogido, tal vez por la pérdida de neuronas hilares, tanto interneuronas inhibitorias como células musgosas excitadoras (McNamara, 1994). Se han propuesto tres hipótesis para explicar la EAA (Fig.1):

1. Hipótesis de las células de canasta durmientes:

Las crisis inducen muerte de células excitadoras en el hilus (tal vez las células musgosas) lo cual retira las señales excitadoras de las células de canasta gabaérgicas. Se produce una desinhibición de las células de canasta que sumado a señales sinápticas excitadoras, origina un disparo excesivo de las células granulares que progresa hasta la muerte celular (Sloviter, 1991)(Fig. 1A).

2. Hipótesis de reborización de fibras musgosas (circuito excitatorio):

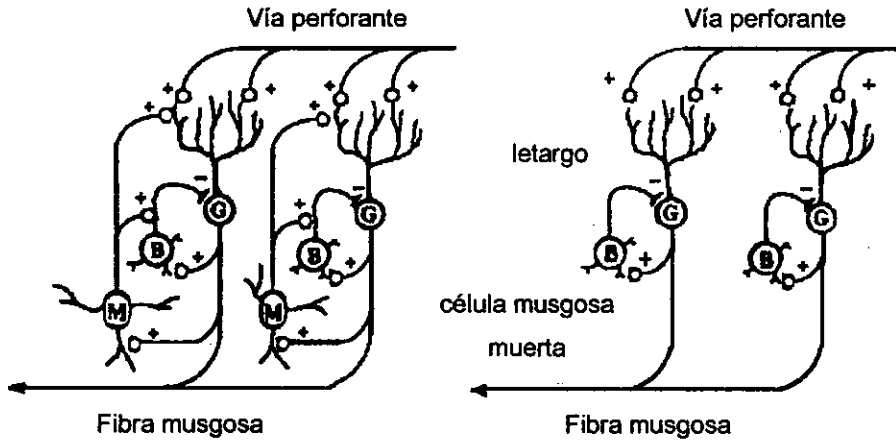
La hiperexcitabilidad de las células granulares dentadas es una consecuencia de un arreglo del circuito neuronal en el cual las células granulares excitadoras se inervan a ellas mismas, creando un circuito excitatorio recurrente (Nadler y Cuthberston, 1980)(Fig.1B).

3. Hipótesis de reborización de fibras musgosas (circuito inhibitorio):

Se ha propuesto que la reborización está relacionada con una restauración de circuitos inhibitorios en el giro dentado, sugiriendo que los nuevos axones reconectan a las interneuronas inhibitorias para limitar la propagación y generación de crisis (Sloviter, 1992).

Parece que la intensidad de las crisis puede inducir esclerosis del hipocampo, pero una vez desarrollada, la esclerosis de hipocampo puede por si misma causar epilepsia (McNamara, 1994).

A. Hipótesis de las células de canasta durmientes



B. Hipótesis de rearborización de fibras musgosas

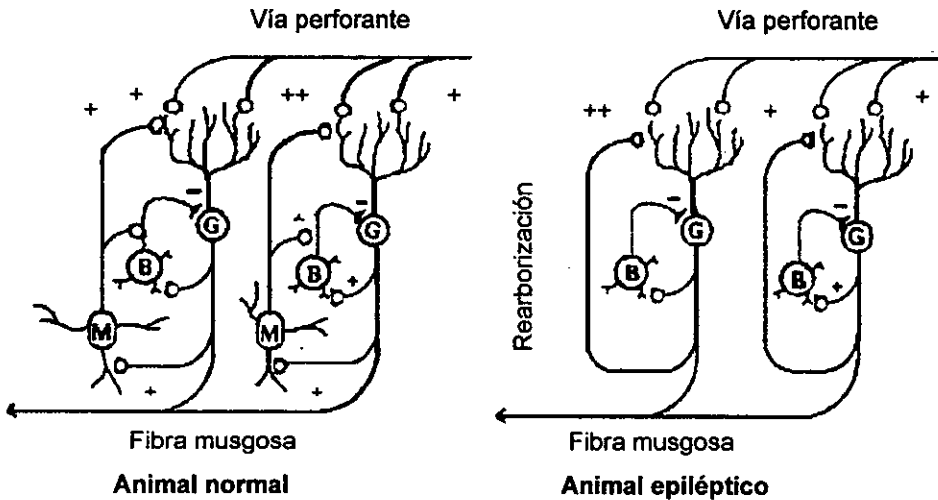


Figura 1 Hipótesis que explican la esclerosis del Asta de Ammon. Las fibras musgosas (M) generan una señal excitadora a células gabaérgicas de canasta (B) y

células granulares (G). La fig.A muestra la hipótesis de células durmientes y la fig.B la hipótesis de rearborización. Tomado de McNamara, 1994.

1.5.1 Modelos de Epilepsia Experimental.

Existen varios modelos experimentales para estudiar los mecanismos de acción y consecuencias de las diferentes crisis epilépticas. A continuación se enlistan los modelos más representativos (Tomado de Fisher, 1989).

<u>Crisis Parcial Simple Aguda</u>	Químicos Convulsivantes { Penicilina, Bicuculina, Picrotoxina Estricnina, Colinérgicos, Anticolinérgicos Estimulación eléctrica aguda Bloqueo del GABA
<u>Crisis Parcial Simple Crónica</u>	Metales implantados corticalmente { Hidroxido de Aluminio, Fe+, Cobalto, Tungsteno, Zinc Daño criogénico Inyecciones de anticuerpos a gangliósidos Epileptogénesis focal sistémica
<u>Crisis Tónico-Clónicas</u>	Genéticas { Babuinos fotosensibles, crisis audiogénicas en ratones, ratas propensas genéticamente, etc. Electrochoques (EEC) Químicos convulsivantes (Picrotoxina, Pentilenetrazol, etc.) Desajustes metabólicos (Hipoxia, Hipoglicemia, Uremia, etc)
<u>Crisis Parciales Complejas Generalizadas</u>	Acido Kaínico Toxina tetánica "Kindling" eléctrico
<u>Crisis de Ausencia Generalizada</u>	Estimulación talámica Foco cortical bilateral Penicilina sistémica Opioides intraventriculares
<u>Status Epilepticus</u>	Pilocarpina Acido Kaínico Estimulación recurrente

1.6 Acido Káínico como modelo para generar Epilepsia del Lóbulo Temporal.

El ácido Káínico (AK) fue aislado del pasto marino *Digenea simplex* por Shinozaki y Konishi en 1970, quienes describieron su efecto excitatorio en neuronas del SNC de mamíferos al trabajar con antihelmínticos e insecticidas. El ácido α -káínico es un derivado de la pirrolidina que posee dos grupos carboxilos y un canal de isopropileno (Fig.2). Este análogo del ácido glutámico (Glu) puede ser administrado periféricamente durante el periodo neonatal restringiendo el daño a áreas cerebrales como retina, núcleo acurate y órganos cincunventriculares debido a las barreras deficientes para excluir al Glu (Pérez y Onley, 1972). Sin embargo, la administración periférica es capaz de generar daño extensivo en adultos (Onley et al., 1974) induciendo selectivamente crisis límbicas y siendo el hipocampo la estructura más sensible (Lothman y Collins, 1981). Esta sustancia es capaz de inducir un síndrome caracterizado por un EE límbico y un subsecuente daño neuronal similar al que se reporta con la ELT en humanos (Nadler et al., 1978). En los días siguientes al tratamiento con AK se muestra un incremento en la hiperactividad y agresividad sugiriendo además, que el tratamiento con AK puede resultar en una reducción del umbral de las crisis subsecuentes (Caldecott-Hazard y Engel, 1987).

1.7 Receptores al Acido Káínico.

Se sabe que el AK activa receptores a Glu ionotrópicos y metabotrópicos (Fig. 2) aunque es más selectivo para el receptor kainato (Young y Fagg, 1990). Una proporción significativa de los sitios de unión parecen estar localizados presinápticamente en vías excitadoras glutamatérgicas aferentes del estriado y de las células granulares cerebelares (Biziere y Coyle, 1979).

Se ha visto también una banda densa de estos receptores en las fibras musgosas del hipocampo (Foster y Roberts, 1981). Se reporta la existencia de 3 diferentes receptores para AK: dos de alta afinidad (KD: 5nM) y uno de baja afinidad (KD:50nM) (Berger y Ben-Ari, 1983). Los sitios de baja afinidad se encuentran en la

mayoría de las regiones cerebrales de la rata y los de alta afinidad parecen estar restringidos a regiones del cerebro anterior (Greenamyre et al., 1985).

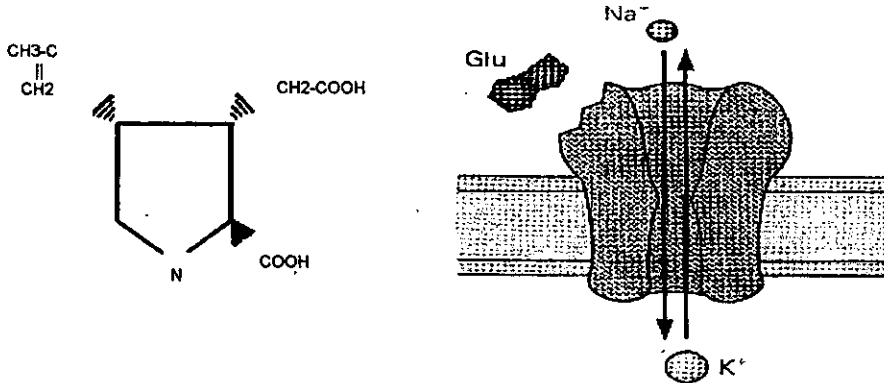


Figura 2. Representación de la molécula de AK (Coyle, 1983) y el receptor de Glutamato No-NMDA (Kandel, 2000).

1.8 Mecanismos de acción y neurotoxicidad de Ácido Kaínico.

En el sitio de inyección el AK presenta una influencia tóxica que es transmitida o al menos aumentada por una intensa actividad eléctrica en los axones cercanos al sitio donde se administró, estimulando directamente a los receptores post-sinápticos. Se sabe que el AK activa receptores a Glu, incrementando la entrada de Ca⁺², activando proteasas dependientes de calcio y produciendo un subsecuente aumento en el consumo de energía que genera un desgaste en las reservas de ATP (Coyle, 1983)(Fig.3).

Se ha visto que el AK inhibe el mecanismo de recaptura de alta afinidad del Glu resultando en un incremento de sus concentraciones locales y aumentando así los efectos neurotóxicos de este aminoácido (Lodge et al., 1979).

Si la concentración de Glu no es suficiente para causar daño, es posible que la liberación local pueda interactuar con las pequeñas cantidades de AK que se difunde a través del cerebro desde el sitio de inyección, contribuyendo a una estimulación repetida independiente a la presencia del AK (Young y Fagg, 1990)

(Fig.3). Se ha propuesto que el AK pudiera ser neurotóxico por la posible formación de un metabolito que es transportado intra-axonalmente y liberado en las terminales axónicas o bien por un efecto degenerativo transneuronal secundario a la destrucción de neuronas en el sitio de inyección (Schwob et al., 1980).

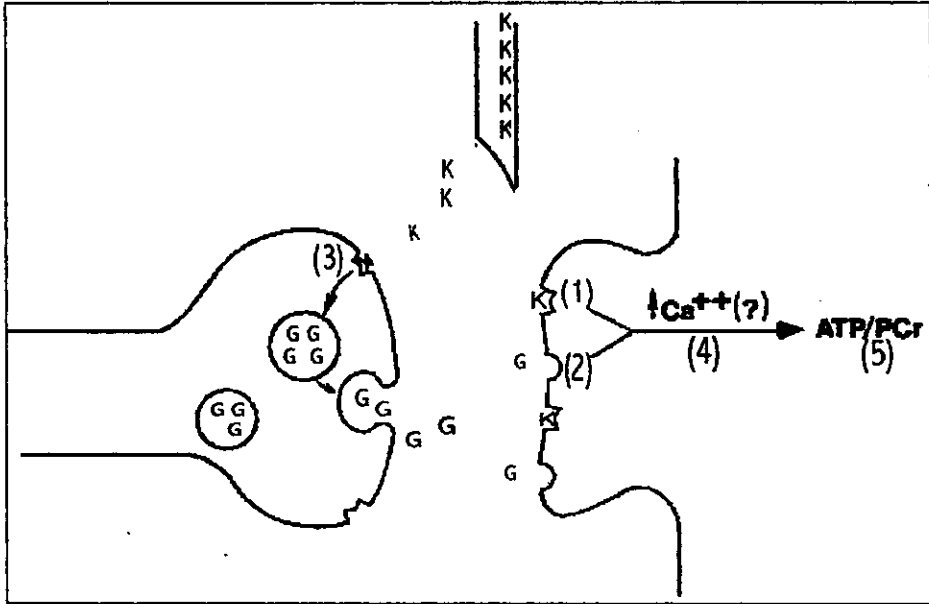


Figura 3. El AK activa receptores específicos en las dendritas neuronales (1). Receptores (2) posiblemente específicos para aminoácidos excitadores pueden ser estimulados por el efecto neurotóxico. Las señales excitadoras se elevan por la activación de receptores presinápticos específicos al kainato (3) que producen la liberación de glutamato o aspartato. La estimulación combinada y repetitiva de receptores dendríticos a kainato y aminoácidos excitadores puede incrementar el Ca^{2+} intracelular (4) activando proteasas dependientes de Ca^{2+} . Entonces hay un incremento en el consumo de energía produciendo el desgaste de las reservas de ATP y fosfocreatinas (5). (Tomado de Coyle, 1983).

1.9 Daños regionales producidos por el AK.

La administración intraperitoneal de AK produce lesiones en algunas regiones cerebrales en la rata, predominantemente en el sistema límbico. Hay pérdida de neuronas en corteza olfatoria y parte del complejo amigdalino (la degeneración de la amígdala parece ser progresiva y puede estar relacionada con varios cambios en el

comportamiento como agresividad y un incremento en el rango de crisis espontáneas) (Schwob et al, 1980). Hay una degeneración masiva de neuronas especialmente en la corteza piriforme y entorrinal (las capas I-III son selectivamente las más afectadas) (Sperk et al., 1983). De igual manera en el hipocampo las neuronas mas dañadas son las células piramidales de CA3, pero en algunos animales se induce daño en el sector CA1 (Ben-Ari et al., 1984).

Estos cambios se han relacionado con los observados en la esclerosis del hipocampo en ELT en humanos, donde hay una rearborización de fibras musgosas que inhiben a células gabaérgicas y ocurre una sobreexcitación recurrente (Fig.1). Esta rearborización se asocia a un incremento en la densidad de sitios de unión de alta afinidad para AK (Coyle, 1983).

También se produce daño en bulbo y tubérculo olfatorios. En el tálamo, el núcleo mediodorsal y medioventral están considerablemente afectados como también el geniculado (Ben-Ari et al., 1980; Sperk et al., 1983; Schwob et al., 1980). Es de enfatizar que el proceso de degeneración neuronal continua y eventualmente después de meses, ocurre un encogimiento de áreas como hipocampo, amígdala, corteza piriforme y corteza entorrinal (Coyle, 1983).

1.10 Crisis límbicas inducidas con AK.

Lothman y Collins en 1981 describieron el patrón de activación del metabolismo de la glucosa en el sistema límbico de la rata, después de la administración del AK. Es en estas regiones donde se presenta una alta densidad de receptores a kainato (Foster y Roberts, 1981) y donde se reporta daño extensivo en los circuitos neuronales (Ben-Ari et al., 1980). Este patrón de activación del sistema límbico se puede dividir en tres estados anatómicos: el primer estado está restringido al hipocampo y septum lateral (donde CA3 parece actuar como un marcapasos), en el estado intermedio se activan centros límbicos y en el tercer estado se ven involucrados centros extralímbicos (Fig. 4) (Lothman y Collins, 1981). Los cambios conductuales y electroencefalográficos inducidos por la administración de AK se han clasificado de la siguiente manera (Lothman y Collins, 1981):

- Fase I** Inmovilidad con miclónias eventuales con actividad epiléptica en el hipocampo y septum lateral.
- Fase II** Mioclonias de la cabeza y extremidades anteriores, sacudidas de perro mojado o "wet-dog-shakes", crisis límbicas leves; actividad epiléptica en regiones límbicas extrahipocampales (corteza entorrinal, amígdala, subículum y septum medial).
- Fase III** Crisis límbicas severas (mioclonicas de cabeza y extremidades), levantamiento de las extremidades anteriores y posición de canguro; actividad epiléptica propagada a centros extralímbicos.
- Fase IV** Crisis límbicas severas secundariamente generalizadas, movimientos clónicos bilaterales de todo el cuerpo, levantamiento de las extremidades anteriores y caída hacia atrás, temblor y salivación; actividad epiléptica propagada a todo el cerebro.
- EE** *Status Epilepticus* en el que se presentan crisis límbicas repetidas por más de una hora y crisis generalizadas eventuales; actividad epiléptica en todo el cerebro en regiones límbicas y durante las crisis generalizadas.

El EE inducido por AK permanece durante unas 3 horas y cuando la actividad EEG desaparece le sigue un periodo postictal refractario (Sperk, 1994). A las 24 o 48 horas después del EE los animales inician la presentación de signos considerados como conductas motoras explosivas, pero no crisis convulsivas (Caldecott-Hazzard y Engel, 1987). Semanas más tarde pueden observarse crisis motoras espontáneas (Calvaheiro y Le Gal la Salle, 1982).

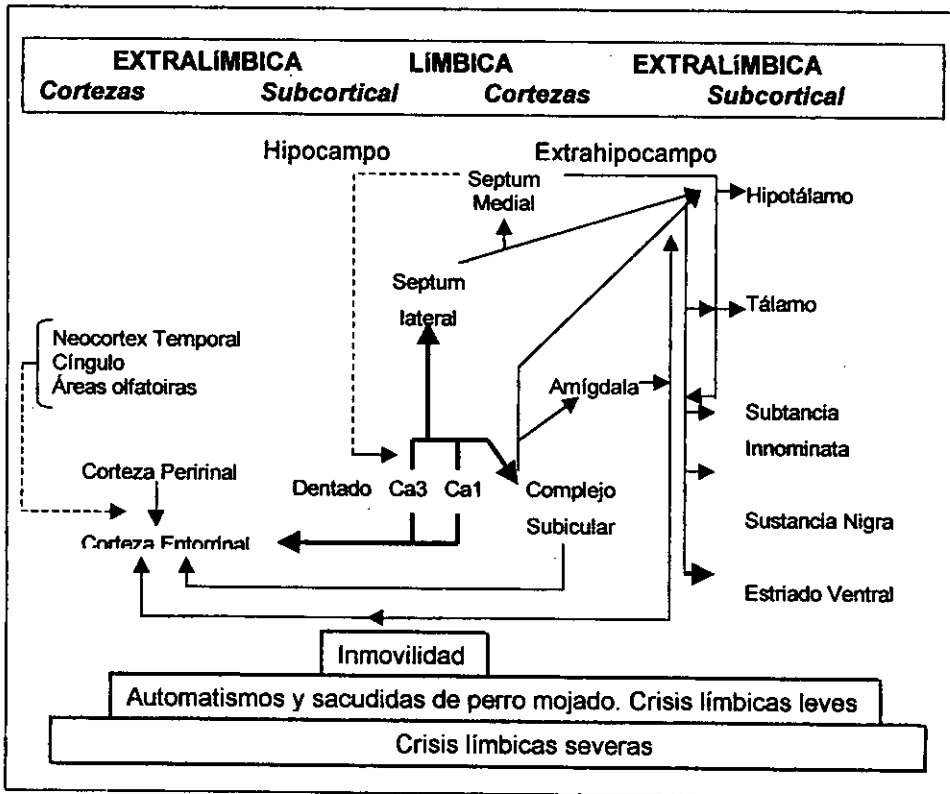


Figura 4 Crisis límbicas inducidas por ácido kainico. El efecto del AK progresa desde estructuras límbicas (CA3-CA1) hacia estructuras extralímbicas (cortezas cerebrales), lo cual está relacionado con los cambios conductuales observados como se muestra en las barras inferiores de la figura. Líneas cortadas representan vías aferentes y las líneas continuas, vías eferentes. (Lothman y Collins, 1981).

1.11 Epilepsia y edad.

La epilepsia puede iniciarse en etapas tempranas de la vida, o bien empezar en el adulto y desaparecer poco después, pero incluso puede darse en la vejez, con mayores secuelas neurológicas en estas últimas etapas. Los sujetos jóvenes por su parte, presentan mayor propensión a desarrollar crisis, pero los daños neurológicos son menores a comparación de una persona adulta. A continuación se detallará más acerca de cada edad.

1.11.1 Susceptibilidad en sujetos jóvenes a generar crisis epilépticas.

Mediante la estimulación eléctrica tipo "kindling" se ha observado que las ratas menores a las tres semanas de edad tienen mayor propensión a generar crisis (Moshé, 1981). Estas crisis generalmente van seguidas de un periodo refractario que es menor comparado con las ratas adultas a pesar de presentar crisis más severas. Lo anterior indica que la refractoriedad es un proceso activo que aumenta con la edad (Moshé et al., 1983). Así mismo, mediante la técnica de electrochoques convulsivos, se ha observado que las ratas recién nacidas muestran un umbral electroconvulsivo menor que las ratas adolescentes y adultas (Moshé et al., 1983). Lo anterior indica que estas ratas son más propensas a presentar EE, sin embargo, a esta edad no se desarrollan crisis espontáneas recurrentes, ni se presenta daño neuronal (Campochiaro y Coyle, 1978).

Se ha reportado que existen cambios en las propiedades de los canales N-metil-D-aspartato (NMDA) a diferentes edades, ya que se activan más rápidamente y por más tiempo en ratas jóvenes contribuyendo a la generación de potenciales excitatorios. Además, existe un menor número de receptores a kainato a esta edad, pero una sobre expresión de receptores NMDA y de conexiones sinápticas, confiriéndoles mayor vulnerabilidad al efecto de las neurotoxinas (Wasterlain y Mazarati, 1997).

En las primeras etapas de desarrollo postnatal de la rata existe una sobreproducción de arborizaciones axónicas excitadoras hipocámpales que se van restringiendo en la madurez (Swann et al., 1992). Estudios en sustancia nigra (SN), estructura rica en receptores GABA_A, muestra diferencias ontogénicas en la porción pars reticulata anterior y pars reticulata posterior (SNR_a y SNR_p, respectivamente). La SNR_a es una estructura que aparece semanas después del nacimiento y en ratas adultas tiene efectos anticonvulsivos. Sin embargo, la SNR_p con sus efectos convulsivos genera en ratas jóvenes una actividad motora durante las crisis epilépticas (Veliskova, 1999).

Experimentos para analizar los mecanismos inhibitorios mediante registros intracelulares de interneuronas en hipocampo en ratas jóvenes indican que el

sistema gabaérgico está bien desarrollado en esta etapa y ayuda a prevenir las crisis. Pero se ha visto que las neuronas gabaérgicas en la etapa neonatal y embrionaria presentan un transporte de Cl^- incompetente hasta la segunda semana de edad. Entonces las concentraciones de Cl^- son mayores en el interior que en el exterior y las neuronas depolarizan en vez de hiperpolarizar, mecanismo que se ha relacionado con una acción neurotrófica del GABA durante los primeros días posnatales (Pierson y Swann, 1999). La expresión de factores neurotróficos en ratas jóvenes después de una crisis epiléptica, puede resultar en un patrón anormal de reinervación que contribuye a la epileptogénesis, pero puede actuar también como protección celular, ya que los factores neurotróficos incrementan la sobrevivencia de neuronas dañadas (daño relacionado con la severidad de las crisis (Wasterlain y Mazarati, 1997).

Por otra parte, las ratas de 35 días de edad (adolescentes) a diferencia de edades más tempranas, son más resistentes a desarrollar crisis, debido tal vez a factores hormonales que se piensa acompañan el desarrollo de la SNR_a y su efecto anticonvulsivo (Veliskova, 1999).

1.11.2 Crisis epilépticas en sujetos adultos.

En animales adultos con crisis epilépticas generalizadas inducidas por "kindling" eléctrico, se produce una sobre-expresión de los canales de Ca^{+2} y un incremento en la duración del potencial de acción regenerativo. Al aumentar las concentraciones de Ca^{+2} (neurotóxico), este puede contribuir a la extensión de neuritas y formación de sinapsis que llegan a generar daño neuronal por una sobre excitación recurrente (Sperber et al., 1992). En ratas adultas la estimulación del hipocampo para generar crisis requiere de mas estimulaciones comparado con otras edades y permanecen más tiempo en etapas iniciales del "kindling" (Moshé, 1981). También se han analizado los niveles de fluido del torrente sanguíneo (TS) y del metabolismo de la glucosa (MG) en ratas adultas durante las fases tempranas de una crisis. Se ha observado que ambos niveles incrementan sincrónicamente, excepto en regiones vulnerables como el hipocampo, corteza cerebral y tálamo, donde hay un incremento temprano de MG y TS seguido de una desincronización

entre ambas mediciones, lo que coincide con la ocurrencia de daño neuronal en adultos (Nehlig et al., 1999).

El hecho de que las estructuras límbicas y subcorticales maduren antes que las estructuras corticales, aunado a que los sistemas excitatorios subcorticales maduran más tempranamente que los inhibitorios, sugiere que en los sujetos adultos la corteza cerebral puede regular las crisis inducidas por estructuras subcorticales, activando mecanismos inhibitorios en la periferia del foco (Swann y Moshé, 1997).

1.11.3 Daños y consecuencias de la epilepsia en sujetos viejos.

Durante una crisis epiléptica (por "kindling" eléctrico o AK) hay un incremento en el metabolismo de la glucosa en regiones epileptogénicas, lo que sugiere que hay un aumento de la glicólisis. La glicólisis produce lactato el cual es neurotóxico y produce muerte neuronal. Se ha observado que en sujetos viejos éste se acumula mediando las crisis en estructuras como el hipocampo (Sperber et al., 1992). Por otra parte, la aplicación de aminoácidos excitadores para inducir daño neuronal muestra que existe mayor daño en edades avanzadas (Kesslak et al., 1995). Otros estudios muestran que la acumulación de Glu no hace más vulnerables a los animales viejos a sus efectos tóxicos, tal vez debido a una disminución de los receptores glutamatérgicos durante el envejecimiento (Massieu et al., 1995).

Durante la vejez existe un decremento en el número de neuronas en el SNC y se presentan alteraciones en circuitos de distintas poblaciones neuronales (DeToledo-Morrell et al., 1988). La formación hipocampal es una de las regiones más susceptibles al envejecimiento y a las crisis inducidas por AK (Dawson y Wallace, 1992). Se reporta un decremento en el número de neuronas hilares, principalmente en neuronas gabaérgicas en ratas viejas después de la administración de AK (Ashok y Turner, 1999). Esto fue observado en ratas Fisher, pero en otro estudio con ratas Wistar no se mostró diferencia en el número de neuronas hilares a diferentes edades (Rasmussen et al., 1996). También se ha reportado que los sujetos viejos presentan un decremento en los niveles de distintos receptores, como el kainato, dopaminérgicos, adrenérgicos y a péptidos opióides debido a la edad lo cual está relacionado con la propensión al daño neuronal (Kesslak et al., 1995). Lo anterior

indica que las ratas viejas presentan una mayor susceptibilidad a generar daño neuronal por crisis epilépticas, debido a la degeneración en circuitos y sistemas neuronales.

1.12 Acido Káinico y Ontogenia de la Epilepsia.

El AK produce EE en todas las edades, variando las características de las crisis con la edad y la vía de administración (Stafstrom et al., 1992). A final de la tercera semana de nacimiento el AK llega a inducir crisis tónico-clónicas o crisis clónicas generalizada pero no presentan sacudidas de perro mojado y otras características que involucran al sistema límbico. A esa edad no se observa daño neuronal ni reorganización (Sperber et al., 1992).

Mediante la administración sistémica de AK, se ha observado que las ratas jóvenes generan crisis más intensas, con menor latencia y presentan índices de mortalidad mayores que las ratas adultas (Moshé et al., 1983; Stafstrom et al., 1992). Las ratas jóvenes requieren de dosis bajas para generar crisis y tienen más altos rangos de mortalidad debido quizá a la alta penetración del AK por la barrera hematoencefálica la cual aún no está bien desarrollada. Después de las tres semanas de edad el AK produce crisis límbicas motoras con sacudidas de perro mojado, seguidas de un automatismo y al final caída y rigidez, reportando además, daños en el sistema límbico (Nadler, 1981).

Las ratas adultas (de 60 días de edad) tratadas con AK presentan crisis motoras totalmente límbicas (parecidas al estado V del "kindling" (Lothman y Collins, 1981). Esto indica que la maduración del sistema límbico es necesaria para la aparición de crisis espontáneas recurrentes y daño neuronal (Tremblay y Ben-Ari, 1984).

La vía de administración del AK produce diferentes daños en el SNC de ratas viejas; la administración intrahipocampal produce un decremento en la toxicidad del AK con la edad (Kesslak et al., 1995). Sin embargo, la administración sistémica de AK muestra un aumento en la vulnerabilidad del hipocampo en ratas viejas debido quizás a un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a esta edad (Dawson y Wallace, 1992).

Estudios de los sitios de unión del AK a diferentes edades nos muestran que existen dos receptores que se desarrollan a diferentes tiempos en la ontogenia. Uno es de baja afinidad (con distribución difusa en cerebros inmaduros) que se desarrolla antes que el de alta afinidad (que en sujetos maduros están en las hendiduras sinápticas). Los de baja afinidad son incapaces de mediar la actividad metabólica inducida por AK, mientras que los de alta afinidad se ven relacionado con un mayor daño neuronal (Ben-Ari et al., 1992). En ratas jóvenes los niveles de receptores a AK están elevados en CA3 en la tercera semana de edad en comparación con los adultos mientras que los receptores a AK en capas internas del neocórtex están temporalmente sobre-expresados y van decrecientando gradualmente hasta los niveles de patrón adulto (Erdo y Wolff, 1989). Se ha postulado que las crisis inducidas por AK pueden estar mediadas por receptores para aminoácidos excitadores que presentan patrones de desarrollo diferentes a los receptores AK (Stafstrom et al., 1992).

1.13 Opioides endógenos en el Sistema Nervioso Central.

1.13.1 Procesamiento de péptidos opioides. Precursores.

El proceso de síntesis empieza con la formación de un precursor prepropeptídico, que es dirigido por el RNAm en el retículo endoplásmico. Después el precursor es trasladado al aparato de Golgi. Este prepropeptido contiene una proteína de señal, que es removida y catalizada por endopeptidasas microsomales. La parte sobrante se almacena en vesículas secretoras (que se cree son vesículas de centro denso) (Chavkin y Simmons, 1996) del aparato de Golgi para ser procesadas durante el transporte axónico.

Se han identificado tres precursores de los opioides con características similares, ya que cada uno posee en su parte terminal una secuencia de 20-26 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos y cada precursor contiene más de una copia de al menos uno de los péptidos activos fisiológicamente ((H-TYR-GLY-GLY-PHE)-X). Estos precursores se han caracterizado como proopiomelanocortina (POMC), proencefalina y prodinorfina (Pasternak et al., 1983) (Tabla 1).

Tabla 1 Precusores de péptidos opioides y los péptidos que dan origen (Pasternak et al., 1983).

Precusores	Péptidos
POMC	β -endorfina, β -lipotropina, ACTH (hormona adrenocorticotrófica, hormona α -melanocyto estimulante (α -MSH))
Proencefalina Contiene seis copias de la secuencia de (Met ⁵)encefalina y una de (Leu ⁵)encefalina	(Met)encefalina, (Leu)encefalina, péptido F, amidorfina, (Met)encefalina-Arg-Gly-Leu, péptido E, BAM 22, BAM 18, BAM 12, metofpamida, (Met)encefalina-Arg-Phe
Prodinorfina Contiene una secuencia de (Leu ⁵)encefalina	α -neendorfina, β -neendorfina, dinorfina A, dinorfina B.

1.13.2 Liberación y función de los péptidos opioides.

La liberación de péptidos opioides requiere de estimulaciones de alta frecuencia de las neuronas que contienen péptidos y está relacionada con la estimulación de proteínas dependientes de K^+ y Ca^{+2} . Se cree que las vesículas de centro denso están localizadas lejos de las zonas de sinápsis activas y que responden a los niveles de calcio citoplásmico. Después de su liberación los opioides se difunden al espacio extracelular y puede observarse su acción a grandes distancias (50-100 μ m) del sitio de liberación (Chang, 1986). Gracias al uso de agonistas y antagonistas de los opioides endógenos se han podido dilucidar algunas de sus funciones, como regulación del umbral de crisis, comportamiento motor, regulación de alimentación y bebida, desórdenes mentales y respuestas inmunes. Además, se han relacionado con la regulación de funciones gastrointestinales, cardiovasculares, neuroendócrinas y cognitivas (Pasternak et al., 1983). Las encefalinas en el hipocampo generalmente incrementan las respuestas excitadoras de las células piramidales (Dingledine, 1981). Se cree que este aumento en la excitabilidad es resultado de la inhibición de la transmisión inhibitoria, esto es una desinhibición (Zieglgansberger et al., 1979). Las dinorfinas en algunos casos inducen inhibición de respuestas evocadas en la región CA3 y facilitación en otros (Chang, 1986).

1.14 Receptores a péptidos opioides.

1.14.1 Tipos de receptores.

Los receptores a péptidos opioides pertenecen a una superfamilia de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Existen varios tipos de receptores a péptidos, entre los cuales se encuentran los μ , δ y κ (Tabla 2).

La β -endorfina es un péptido igual de potente en desplazar la unión de ligando marcados en μ y δ pero tiene poca afinidad a los sitios κ (Chang, 1981). La Met-enkefalina y Leu-enkefalina tienen más alta afinidad por los sitios δ que por los sitios μ y son más inactivas en los sitios κ . Las prodinorfinas actúan más sobre sitios κ que sobre sitios δ , pero la actividad en sitios μ se incrementa con la extensión del péptido siendo mayor con péptidos de tamaño mediano (dinorfina(1-11) y dinorfina (1-12)). En general para los fragmentos de proencefalinas y prodinorfinas la actividad del sitio δ es la más estable y parece ser más independiente del tamaño. En cambio, la actividad de μ y κ depende más del tamaño del péptido (Tabla 2).

Tabla 2 Opioides Endógenos en cerebro de rata y sus agonistas y antagonistas

Receptor	Ligando endógeno	Agonistas	Antagonistas	Distribución en el cerebro
μ ($\mu 1$, $\mu 2$)	Endorfinas	DAMGO (n) Morfina (s) Levorfanol (ns)	CTOP (s) Naloxona (ns) Levorfanol (ns) Naltrexona (ns)	Amígdala, hipocampo, tálamo, estriado, sustancia nigra, corteza
δ	Enkefalinas	DPDPE (s) Levorfanol(ns)	Naltrindole (s) Naloxona (ns) Naltrexona (ns)	Amígdala, hipocampo, caudado-putamen, corteza.
κ	Dinorfina A	Dinorfina (s) Levorfanol (ns)	Nor-BNI (s) Naloxona (ns) Naltrexona (ns)	Amígdala, hipocampo hipotálamo, tálamo, corteza

DAMGO: (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol) enkefalina. CTOP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-N₂, DPDPE: (D-Pen², D-pen⁵) enkefalina. (s) selectivos, (ns) no selectivos. Información obtenida de Pasternak, 1988.

1.14.2 Estructura y regulación de receptores opioides.

A nivel molecular los opioides están ligados funcionalmente con la activación de proteínas G que inhiben a la adenilato ciclasa y disminuyen los niveles de AMPc intracelulares. También modulan la entrada de Ca^{++} (por la interacción entre la fosfolipasa C (PLC) o la proteína quinasa (PKC)), la conductancia de canales de potasio y regulan la liberación de neurotransmisores (Pasternak y Standifer, 1997).

Los receptores a opioides presentan dos mecanismos de regulación importantes; la primera se observa al administrar crónicamente antagonistas, lo que produce aumento en el número de receptores en áreas específicas del cerebro, sugiriéndose que esta regulación a la alta se debe a la falta de señales normales al receptor (como la falta de ocupación del agonista) mas que a la misma ocupación del antagonista (Zukin et al., 1982). La segunda se observa con la administración de agonistas a receptores opioides, lo que induce una regulación a la baja de receptores y una subsecuente internalización (Cai et al, 1996).

Los receptores antes de la unión con su ligando se encuentran distribuidos en la membrana celular de manera difusa, pero con la interacción ligando-receptor se aglomeran en microagregaciones. Estas microagregaciones transforman las señales en una gran variedad de efectos biológicos, después de lo cual se forman macroagregaciones o parches que se cree funcionan como un mecanismo para evitar la unión a moléculas blanco y entonces generan una desensibilización aguda. Las macroagregaciones después son internalizadas por medio de vesículas "coated-pits" y los receptores son parcialmente regulados a la baja o reciclados (Chang, 1986).

La manera como la acción opioide se ve terminada es por la degradación mediante enzimas como las encefalinasas y aminopeptidasas (Chavkin y Goldstein, 1982). La distribución de los receptores a opioides endógenos no está relacionada con las vías neuronales que contienen opioides, lo que es conocido como "mismatch". En la tabla 3 se muestran los sitios de unión de receptores μ y δ en áreas específicas del cerebro.

Tabla 3 Distribución regional de unión de μ_1 , μ_2 y δ en el ratón

Región	μ_1 (fmol/gm)	μ_2 (fmol/gm)	δ (fmol/gm)	μ_1/μ_2 (fmol/gm)	μ_1/δ (fmol/gm)
Corteza Frontal					
Lámina I	17.1	5.6	39.7	3.05	0.43
Lámina II/III	ND	7.0	39.7	0	0
Lámina IV	9.9	2.8	43.7	3.54	0.23
Lámina V	8.5	2.8	63.8	3.04	0.13
Lámina VI	8.5	2.8	35.7	3.04	0.24
Corteza Temporal					
Lamina I	ND	17.0	27.7	0	0
Lamina II/III	ND	9.8	59.8	0	0
Lamina IV	ND	21.2	31.7	0	0
Lamina V	ND	21.2	23.7	0	0
Corteza Piriforme	7.1	12.7	27.7	0.56	0.26
Tuberculo olfatorio	ND	11.3	47.7	0	0
Sustancia nigra	14.5	64.4	71.8	0.23	0.20
Hipocampo (CA3)	7.2	15.5	31.7	0.46	0.23
Amígdala Central	23.0	24.1	51.7	0.95	0.44
Amígdala Medial	ND	45.7	43.7	0	0
Amígdala Cortical	7.2	15.5	75.9	0.46	0.09

(ND: no determinado) Tomado de Pasternak, 1988.

1.14.3 Desarrollo de receptores.

La distribución de receptores a opioides varía en la ontogenia, pasando de forma difusa a forma de parches o racimos (ej. receptores μ en caudado putamen a diferentes edades) (Georges et al., 1998). Los receptores a péptidos opioides muestran patrones distintos de desarrollo, ya que los sitios μ y κ están presentes antes del nacimiento, mientras que los sitios δ aparecen postnatalmente (Pasternak et al., 1983). El hecho de que los receptores opioides estén expresados durante etapas tempranas de la ontogenia probablemente indica que participan en el desarrollo del Sistema Nervioso (Georges et al., 1998). Los sitios de unión a μ aparecen en el estriado de rata a los 15 días de edad, manteniendo constante su densidad hasta la edad adulta. Se sabe que los receptores μ postnatalmente muestran una afinidad a las β -endorfinas la cual decrece hasta un patrón adulto con mayor afinidad para las encefalinas (Rius et al., 1991). Los sitios de unión δ aparecen en el estriado en un

estado más tardío del desarrollo y van incrementando gradualmente hasta un patrón homogéneo. Se ha observado que la densidad de receptores μ y δ declina por varios días después del nacimiento e incrementa rápidamente en las siguientes dos semanas con un decremento final en la etapa adulta (Spain et al., 1985).

Estudios comparativos han encontrado que los receptores μ_2 están presentes en los animales inferiores, mientras que los μ_1 aparecen en los últimos eslabones de la escala filogenética, lo cual coincide con el patrón ongenético. (Pasternak et al., 1983).

1.14.4 Receptores μ

Las drogas narcóticas clásicas como la morfina, normorfina y oximorfina son relativamente selectivas para los receptores μ (Chang, 1986). Los péptidos opioides con selectividad a μ presentan más potencia en inducir analgesia (Chang et al., 1982) además estos receptores están enriquecidos en las regiones cerebrales importantes en inducir analgesia mediante morfina (Goodman et al., 1983). Se ha observado que existe una interacción competitiva entre las encefalinas y los compuestos parecidos a morfina debido a que ambos presentan afinidad por los receptores δ y μ aunque en diferente magnitud. Los componentes de baja afinidad corresponden a sitios selectivos a morfina (μ_2) y encefalinas (δ), mientras que los componentes de alta afinidad representan un sitio de unión común para opioides encefalinas y β -endorfinas llamado sitio μ_1 (Tabla 3 y Fig. 5) (Wolozin et al., 1982).

Los receptores μ están acoplados funcionalmente a canales de potasio y se ha sugerido que la activación de estos canales puede ser importante para limitar el disparo y la actividad de la neurona, limitando la liberación de GABA (Madison y Nicoll, 1988).

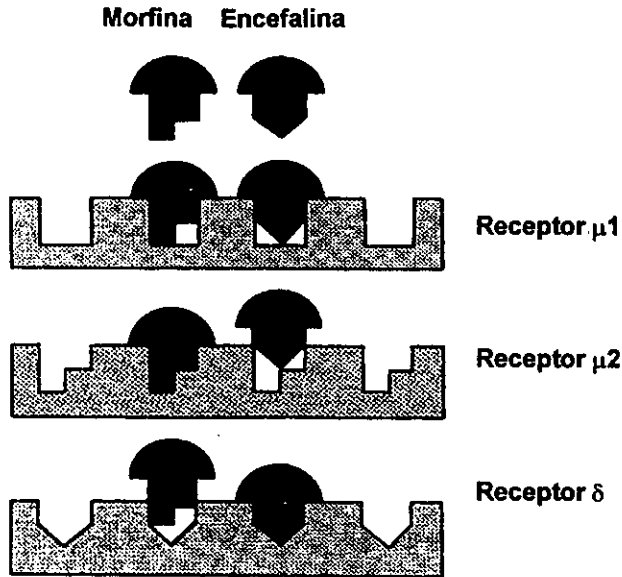


Figura 5. Representación esquemática de los sitios de unión a μ_1 , μ_2 y δ (Tomado de Pasternak, 1988).

1.15 Receptores μ y epilepsia.

Los péptidos opioides presentan una acción inhibitoria en muchas áreas cerebrales incluido el neocórtex, pero un efecto excitador en hipocampo, quizás por un decremento en las influencias inhibitorias. Los opioides parecen pues presentar efectos tanto convulsivos como anticonvulsivos (Engel, 1989).

Existen varios trabajos donde se muestra un efecto dual en la activación de los receptores μ , que varía según el modelo, las estructuras analizadas y el tiempo estimado de respuesta. En el modelo de producción de crisis por fluorotil y electrochoque convulsivos, la aplicación intracerebroventricular de agonistas μ eleva el umbral de crisis, confiriéndoles a estos receptores un efecto anticonvulsivo (Tortella et al., 1988). La activación de receptores activados por morfina también aumenta el periodo refractario postictal, evitando el advenimiento de crisis posteriores (Böhme et al., 1987). Sin embargo, también se ha reportado el efecto

proconvulsivo por la activación de los receptores μ , ya que la aplicación de sus agonistas en la región ventral del hipocampo induce convulsiones y sacudidas de perro mojado, incrementando el rango de disparo de células (Lee et al., 1989). Además, en la región hipocampal CA1 la aplicación de [D-Ala²,D-Leu²] encefalina (DADL) un agonista δ que interacciona con los receptores μ , incrementa la amplitud de espigas generando un potencial excitatorio, produciendo una post-depolarización (Dingledine, 1981) y reduciendo la amplitud de potenciales inhibitorios (Lupica et al., 1992). Se cree que los receptores μ presinápticos actúan inhibiendo la liberación de GABA de las interneuronas generando una desinhibición (Chavkin y Simmons, 1996). Así también se observan variaciones en cuanto el aumento o disminución de estos sitios de unión. La estimulación tipo "kindling" eléctrico amigdalino origina un decremento en la densidad de receptores μ un día después del tratamiento en CA1, CA2 y CA3, relacionado con un aumento en la excitabilidad de la zona, regresando a los niveles basales una semana después (Crain et al., 1987). El tratamiento con electrochoques convulsivos origina un decremento en el número de receptores μ que dura una semana aproximadamente (Nakata et al., 1985). Por otra parte, se ha encontrado un aumento en los niveles de receptores μ en etapas tempranas (etapas II y III) y tardías (etapa V) del "kindling" amigdalino a las 24 horas, pero a los 28 días existe un decremento de estos en estructuras límbicas (Rocha et al., 1993). Así mismo, el tratamiento con AK induce un aumento en el número de receptores μ y en su afinidad por el ligando ³H-DAGO (Ridd et al., 1998).

Modelos genéticos de epilepsia muestran que el número de receptores μ incrementa en hipocampo de ratas propensas a generar crisis, proponiéndose que este incremento se debe al reducido nivel de péptidos en estas ratas (Chavkin y Simons, 1996). Por otra parte, el "kindling" químico inducido por el tratamiento con pentilenoetrazol (PTZ), induce un decremento en el número de receptores μ a las 24 horas después de la última dosis, pero no a los 28 días. Se ha sugerido que este decremento de los receptores puede ser una reacción compensatoria a los altos niveles de péptidos opioides y su acción anticonvulsiva (Crain et al., 1987).

1.15.1 AK y receptores μ .

El AK induce un incremento en la afinidad al receptor μ en varias regiones del cerebro excepto cerebelo y un aumento en el número de receptores en corteza, estriado, médula y puente. Este incremento se presenta a las 4 horas en bulbo olfatorio, núcleo de la habénula, giro dentado, corteza e hipocampo (Ridd et al., 1998). Se ha sugerido que el AK puede modificar la afinidad de ligandos que se unen a proteínas G acopladas a receptores μ (Ridd et al., 1998).

También se ha observado que existe una intensificación en la neurotoxicidad inducida por AK y la co-infusión de un agonista μ (D-Ala², N-Methyl-Phe⁴-Glycol⁵)-encefalina (DAMGO) en células piramidales del área hipocampal CA1 (Lason et al., 1988).

En hipocampo existe una disminución de receptores μ 48 horas después del EE inducido por AK. Sin embargo, análisis a los 2 y 7 días posteriores al tratamiento, indican que existe aumento en los receptores μ con mayor intensidad en CA3 que CA2 y CA1, quizás debido al decremento en los niveles agonistas endógenos (Perry and Grimes, 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la actividad epiléptica es seguida por una depresión postictal. Evidencias experimentales apoyan la teoría de que los opioides endógenos están involucrados en la aparición de la depresión postictal, así como también en la disminución de la actividad motora, agresividad y algunas alteraciones afectivas observadas tanto en humanos como en modelos experimentales. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado cambios en los niveles de receptores μ inducidos por AK a distintas edades y a diferentes tiempos. En animales adultos se ha observado que existen mayores niveles de receptores μ en estructuras relacionadas con el detenimiento de las crisis después de un estado epiléptico (EE) inducido por AK. Se ha propuesto que las ratas jóvenes los cambios en receptores μ son principalmente en áreas relacionadas con la generación y detenimiento de las crisis. En cambio, en animales viejos se ha reportado que existe un decremento en los niveles de receptores a opioides y un mayor daño neuronal con el AK, se propone que esto sea debido a una deficiencia en los mecanismos inhibitorios, como es la activación de receptores μ .

Los cambios inmediatos o a largo plazo de los receptores a péptidos opioides después de una crisis epiléptica, pueden contribuir a la supresión de la actividad convulsiva como un mecanismo homeostático, lo cual nos ayudará a entender mejor los fenómenos epilépticos y sus consecuencias a diferentes edades.

HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de receptores μ en el cerebro de la rata, difieren durante la ontogenia. Así mismo, la actividad epiléptica inducida por el ácido kaínico está asociada a cambios en los receptores μ , los cuales son diferentes según el tiempo transcurrido después del *status epilepticus*, así como de la edad del sujeto experimental.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de receptores μ en condiciones normales, así como a corto y largo plazo después de presentar el *status epilepticus* inducido por ácido kaínico, en cerebros de ratas de diferentes edades.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los niveles de unión a receptores μ en cerebro de ratas de diferentes edades.
2. Analizar los niveles de receptores μ en ratas jóvenes a las 72 horas y 40 días después del tratamiento con ácido kaínico.
3. Evaluar los cambios en los niveles de receptores μ en ratas adultas 24 horas y 40 días después del *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.
4. Cuantificar las variaciones en los niveles de receptores μ en ratas viejas a las 24 horas y a los 40 días después de presentar el *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.

HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de receptores μ en el cerebro de la rata, difieren durante la ontogenia. Así mismo, la actividad epiléptica inducida por el ácido kaínico está asociada a cambios en los receptores μ , los cuales son diferentes según el tiempo transcurrido después del *status epilepticus*, así como de la edad del sujeto experimental.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de receptores μ en condiciones normales, así como a corto y largo plazo después de presentar el *status epilepticus* inducido por ácido kaínico, en cerebros de ratas de diferentes edades.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los niveles de unión a receptores μ en cerebro de ratas de diferentes edades.
2. Analizar los niveles de receptores μ en ratas jóvenes a las 72 horas y 40 días después del tratamiento con ácido kaínico.
3. Evaluar los cambios en los niveles de receptores μ en ratas adultas 24 horas y 40 días después del *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.
4. Cuantificar las variaciones en los niveles de receptores μ en ratas viejas a las 24 horas y a los 40 días después de presentar el *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.

HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de receptores μ en el cerebro de la rata, difieren durante la ontogenia. Así mismo, la actividad epiléptica inducida por el ácido kaínico está asociada a cambios en los receptores μ , los cuales son diferentes según el tiempo transcurrido después del *status epilepticus*, así como de la edad del sujeto experimental.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de receptores μ en condiciones normales, así como a corto y largo plazo después de presentar el *status epilepticus* inducido por ácido kaínico, en cerebros de ratas de diferentes edades.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los niveles de unión a receptores μ en cerebro de ratas de diferentes edades.
2. Analizar los niveles de receptores μ en ratas jóvenes a las 72 horas y 40 días después del tratamiento con ácido kaínico.
3. Evaluar los cambios en los niveles de receptores μ en ratas adultas 24 horas y 40 días después del *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.
4. Cuantificar las variaciones en los niveles de receptores μ en ratas viejas a las 24 horas y a los 40 días después de presentar el *status epilepticus* inducido por el ácido kaínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.16 Animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho de diferentes edades: Jóvenes (J, 15 días de edad, n= 24), Adolescentes (Ad, 2 ½ meses de edad, n=5), Adultas (A, 6 meses de edad, n= 23), Viejas (V, 12 meses de edad, n=16) y Muy viejas (MV, 20 meses de edad, n=6). Fueron alimentadas *ad libitum* y mantenidas en condiciones controladas de temperatura (20-22°C) y humedad (50-60%) en una habitación con aire acondicionado y ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs.

Las ratas fueron habituadas a las condiciones experimentales inyectándoles solución salina (ss) intraperitoneal de 0.1ml/1kg a ratas J durante 3 días o 1ml/kg durante 7 días a las ratas de los demás grupos experimentales.

Las ratas J después de cada inyección regresaron a las cajas con sus madres. A los 30 días de edad pasaron a cajas individuales. Los animales de los grupos A, Ad, V y MV se mantuvieron en cajas individuales.

1.17 Tratamiento con Acido Káínico.

AK (Sigma Chemical Co.) fue disuelto en ss con un pH ajustado a 7.2. Los animales fueron tratados crónicamente con ss como se describió arriba y 24 horas después de la última administración recibieron una dosis de AK. Para las ratas J se preparó una solución de con volumen de 0.7mg/ml para una dosis de 7mg/kg y fueron inyectadas intraperitonealmente con una proporción de 0.1ml/10g y observadas durante 3 horas, después de lo cual fueron regresadas a las cajas con sus madres. Una solución similar pero con un volumen de 10mg/ml fue preparada para inyectar una dosis de 10mg/kg a ratas A y V.

Sólo aquellas ratas que presentaron EE (caracterizado por crisis límbicas severas y convulsiones generalizadas), fueron utilizadas en el estudio (ver cambios conductuales en sección 3.10).

1.18 Grupos Experimentales.

En el presente trabajo se consideraron dos grupos experimentales; en el primero se estudiaron los cambios de los receptores μ durante la ontogenia (ratas J, Ad, A, V y MV) y en el segundo los cambios en receptores μ inducidos por la aplicación de ácido kaínico (ratas J, A y V).

1.18.1 Receptores μ y ontogenia

a) Ratas jóvenes. Ratas J tratadas con ss y sacrificadas 72 horas después de la última administración (JSS3d ;n= 6).

b) Ratas adolescentes. Ratas Ad tratadas con ss y sacrificadas 24 horas después de la última administración (Ad; n=6).

c) Ratas adultas. Ratas A tratadas con ss (ASS; n=9). Este grupo es la suma de las ratas que se sacrificaron 24 horas después de la última administración de ss y las que se sacrificaron 40 días después de la misma, debido a la n de cada grupo y lo parecido de los datos.

d) Ratas viejas. Ratas V tratadas con ss (V; n=6). Debido a la n resultante y lo similar de los datos, este grupo fue la suma de los grupos sacrificados a las 24 horas y los sacrificados 40 días después de la última administración de ss.

e) Ratas muy viejas. Ratas MV tratadas con ss (MV; n=5) y sacrificadas 24 horas después de la última administración (MV; n=5).

1.18.2 Receptores μ y Epilepsia.

a) Ratas jóvenes. Se utilizaron tres grupos experimentales.

1. Un grupo de ratas J (JAK3d; n=8) que fue tratado con AK y sacrificado 72 horas después de presentar el EE. Se utilizó el grupo JSS3d descrito en la sección 8.3.1a como su control.
2. Un grupo de animales J (JSS40d; n=10) que recibieron ss y se sacrificaron a los 40 días del tratamiento.
3. Un grupo de ratas J (JAK40d; n=4) tratadas con AK y sacrificadas 40 días después de presentar EE.

b) Ratas Adultas. Se utilizaron dos grupos experimentales.

1. Un grupo de animales A (AAK1d; n=8) recibió AK y fue sacrificado 24 horas después de su administración.
2. Un grupo de animales A (AAK40d; n=6) tratado con AK y sacrificado a los 40 días después del EE.

Se utilizó al grupo ASS descrito en la sección 8.3.1c como el control de los dos grupos anteriores.

c) Ratas Viejas. Se utilizaron dos grupos experimentales.

1. Un grupo de ratas V (VAK1d; n=6) tratadas con AK y sacrificadas 24 horas después de su administración. Se utilizó al grupo VSS1d descrito en la sección 8.3.1d como su control.
2. Un grupo de ratas V (VAK40d; n=4) tratadas con AK y sacrificadas 40 días después de presentar el EE. Se utilizó al grupo VSS40d descrito en la sección 8.3.1d como su control.

1.19 Técnica de Autorradiografía.

Esta técnica se utilizó para el análisis cuantitativo de receptores de opioides μ "in vitro". Los animales fueron sacrificados por decapitación después de los tratamientos antes mencionados y el cerebro fue extraído rápidamente y almacenado

en hielo seco a una temperatura de -70°C . Se obtuvieron secciones coronales de $20\mu\text{m}$ de grosor utilizando un Criostato (Leica modelo 1510-3). Las rebanadas fueron colocadas en laminillas previamente gelatinizadas. Las rebanadas se lavaron en una solución buffer de Tris-HCL a una concentración de 50mM, pH 7.4, durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) con el propósito de remover a los ligandos endógenos de los receptores. Posteriormente las rebanadas se incubaron durante 60 min a una temperatura de 25°C en una solución 2 nM de ^3H -DAGO (^3H -D-Ala²-N-metil-fe-glicol⁵)(tirosil 1-3-4- ^3H)encefalina (40.8 Ci/mmol; Amersham), un agonista μ , en buffer de Tris-HCL. Al terminar la incubación con el ligando marcado, las rebanadas se pasaron a un baño de solución buffer Tris-HCL durante 1 minuto dos veces a 4°C y por último, se enjuagaron en 250 ml de agua destilada durante 2 segundos. Se secaron rápidamente con aire frío. Los ligandos no específicos se evaluaron utilizando rebanadas de cada sujeto experimental, tratadas de manera similar a los descrito previamente y adicionando naloxona (Sigma) $1\mu\text{M}$ a la incubación con ^3H -DAGO.

Las rebanadas se expusieron a películas sensibles a tritio (^3H -Hiperfilm) en cassettes de rayos-X, durante 8 semanas en oscuridad y a temperatura ambiente. Se procesaron con revelador Kodak (D11) y fijador rápido. Las distintas regiones anatómicas del cerebro se identificaron en referencia al atlas de la rata de Paxinos y Watson (1986). Por último, los autoradiogramas se analizaron con un sistema de análisis de imágenes para determinar la densidad óptica (OD) (JAVA Jandel Software de Analisis de Video). Para cada estructura se tomaron 10 lecturas de OD de las secciones predeterminadas para el análisis y se promediaron. Las lecturas de OD de los estándares se utilizaron para determinar los valores de radioactividad del tejido en las laminillas adyacentes.

1.20 Estructuras analizadas.

A continuación se mencionan las estructuras analizadas en este estudio: Corteza frontal (cxfron), del cíngulo (cxcing), sensorimotora (cxsen), piriforme (cxpir), entorrinal (cxent) y temporal (cxtemp); caudado putamen (cauput); núcleos de la amígdala anterior (amga), basolateral (amgbas), medial (amgmed) y central

(amgcn); giro dentado (girden); hipocampo (región ca1,ca2 y ca3); sustancia nigra pars reticulata (snr) y pars compacta (snc); sustancia gris periacueductal (pag) y geniculado dorso-ventral (gen).

Los niveles de receptores μ fueron estudiados en estas estructuras ya que tienen un papel importante en la epileptogénesis o en la expresión del comportamiento interictal o postictal (Swann y Moshé, 1997; McNamara et al., 1994; Schwartzkroin y McIntyre, 1997; Proctor y Gale, 1997).

1.21 Análisis Estadístico.

Para el análisis de niveles de receptores en la ontogenia se utilizaron los promedios de cada estructura y se compararon entre las diferentes edades, utilizando un análisis ANOVA de una vía y un análisis *Post-hoc* para las diferencias significativas (Método de Dunnet, $p < 0.05$ o Método de Dunn, $p < 0.05$). Para comparar a los grupos tratados con ss y los que recibieron AK se utilizó una prueba t-Student ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1.22 Niveles de receptores μ en la ontogenia.

Los valores obtenidos muestran un patrón ontogenético similar en todas las estructuras, donde las ratas J tienen altos niveles de unión a receptores μ , que disminuyen en la adolescencia y vuelven a subir en las ratas A. Sin embargo, en las edades V y MV existe un decremento importante de receptores μ parecido a los valores de las ratas Ad. A continuación se muestran los resultados de los análisis estadísticos para cada edad.

(amgcn); giro dentado (girden); hipocampo (región ca1,ca2 y ca3); sustancia nigra pars reticulata (snr) y pars compacta (snc); sustancia gris periacueductal (pag) y geniculado dorso-ventral (gen).

Los niveles de receptores μ fueron estudiados en estas estructuras ya que tienen un papel importante en la epileptogénesis o en la expresión del comportamiento interictal o postictal (Swann y Moshé, 1997; McNamara et al., 1994; Schwartzkroin y McIntyre, 1997; Proctor y Gale, 1997).

1.21 Análisis Estadístico.

Para el análisis de niveles de receptores en la ontogenia se utilizaron los promedios de cada estructura y se compararon entre las diferentes edades, utilizando un análisis ANOVA de una vía y un análisis *Post-hoc* para las diferencias significativas (Método de Dunnet, $p < 0.05$ o Método de Dunn, $p < 0.05$). Para comparar a los grupos tratados con ss y los que recibieron AK se utilizó una prueba t-Student ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1.22 Niveles de receptores μ en la ontogenia.

Los valores obtenidos muestran un patrón ontogenético similar en todas las estructuras, donde las ratas J tienen altos niveles de unión a receptores μ , que disminuyen en la adolescencia y vuelven a subir en las ratas A. Sin embargo, en las edades V y MV existe un decremento importante de receptores μ parecido a los valores de las ratas Ad. A continuación se muestran los resultados de los análisis estadísticos para cada edad.

1.22.1 Ratas Jóvenes.

Las ratas J presentaron niveles altos de receptores μ comparado con las demás edades. Estos niveles fueron estadísticamente significativos al compararlos con las ratas Ad (Método Dunn, $p < 0.05$) en *cxfron*, *cxcing*, *cxent*, *cxtemp* y CA3. Con respecto a las ratas A, sólo en CA1 hubo diferencias (Método Dunnet, $p < 0.05$). También se obtuvieron cambios significativos con el grupo de ratas V (Método Dunn, $p < 0.05$) en *amga*, *amgmed*, *amgcen*, CA3, *snr* y *pag*, y además con el grupo MV (Método Dunn, $p < 0.05$) en *cxfron*, *cxsen*, *cxpir*, *cxent*, *cxtemp*, *amga*, *girden*, CA2, CA3, *snr*, *snc* y *pag* (Tabla 4 y Fig. 6-8).

1.22.2 Ratas Adolescentes.

Este grupo de ratas mostró una disminución de receptores μ comparado con las ratas A en todas las estructuras pero no fue significativa, además los valores son muy parecido a los grupo V y MV (Tabla 4). Las diferencias significativas que presentaron al compararse con las ratas J se describen en la sección 9.1.1 (Fig. 6-8).

1.22.3 Ratas Adultas.

Los datos obtenidos de las mediciones densitométricas de este grupo se muestran la tabla 4. Este grupo es del que más información se tienen y por ello se usará como punto de referencia para comparar a los demás grupos. La única estructura que mostró cambios significativos con otras edades fue la *cxsen* al compararlo con ratas MV (Método Dunnet, $p < 0.05$) (Fig. 6). En la Fig. 13 se puede observar un decremento importante de receptores μ entre una rata A y una rata MV.

1.22.4 Ratas Viejas.

Las ratas del grupo V mostraron bajos niveles de unión a $^3\text{H-DAGO}$ comparado con las demás edades, pero estos cambios fueron significativos

solamente al compararse con las ratas J como se describe en la sección 9.1.1 (Tabla 4, Fig. 6-8).

1.22.5 Ratas Muy Viejas.

Este grupo mostró valores bajos de receptores μ , muy parecidos a los del grupo anterior. Las diferencias significativas encontradas al compararse con el grupo J se describen en la sección 9.1.1 y las encontradas al compararse con el grupo A en la sección 9.1.3 (Tabla 4, Fig.6-8, 13).

Tabla 4 Valores de los niveles de unión con ³H-DAGO (fmol/mg de tejido) de cada estructura en los grupos de ontogenia.

Estructuras	J	Ad	A	V	MV
Corteza frontal	202±26	99±3*	104±2	103±5	94±4*
Corteza del cíngulo	171±8	117±3*	127±4	126±10	12051
Caudado putamen	195±24	149±11	153±24	153±22	12862
Corteza sensorim.	158±9	99±3	122±11	105±4	89±3* @
Corteza piriforme	150±7	101±5	120±9	99±6	95±13*
N.amg. anterior	258±28	118±5	131±4*	114±5*	108±5*
N.amg. medial	235±24	138±8	128±28*	121±11*	136±3
N.amg. basolateral	234±26	178±17	239±33	253±40	221±31
N.amg. central	187±35	95±5	104±6	77±16*	95±4
Giro dentado	169±20	98±3	113±7	91±9	91±2*
Reg. Hip. CA1	176±25	94±3	121±13*	91±10	89±4
Reg. Hip. CA2	204±25	102±4	114±25	100±6	93±5*
Reg. Hip. CA3	186±21	97±6*	133±13*	101±6*	93±4*
Corteza entorrinal	202±16	104±3*	118±8	111±3	101±4*
Corteza temporal	200±31	104±3*	123±9	119±1	102±5*
Sustancia nigra pr	279±28	116±6	127±10	107±28*	102±4*
Sustancia nigra pc	301±21	115±7	124±21	109±3	100±3*
Sustancia gp.	244±25	114±6	115±4	97±3*	99±3*
Geniculado	316±23	129±5	194±37	141±9	123±3

Estos datos son los valores promedio de las densidades ópticas ± E.E de cada estructura. (*) Muestra diferencia significativo comparado con el grupo, J (p<0.05). (@) Muestra diferencia significativa comparado con el grupo A. N.amg, núcleo amígdalino; Reg. Hip, región hipocámpal; pr, pars reticulata; pc, pars compacta; gp, gris periacueductal.

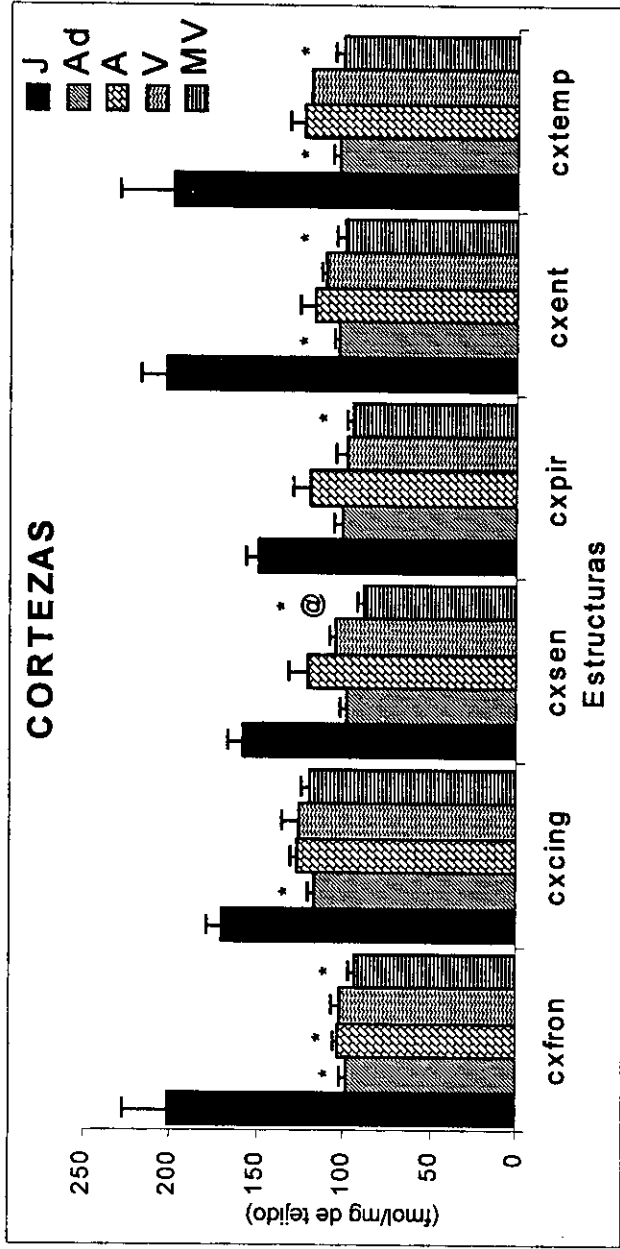


Figura 6. Niveles de unión a ^3H -DAGO (fmol/mg de tejido) en cortezas de ratas a diferentes edades. En esta gráfica se observan las diferencias significativas de Ad al compararas el grupo J (*) ($p < 0.05$) en cxcing, cxent y cxtemp, del grupo A en cxfron y del grupo MV en cxfron, cxsen, cxpir, cxent y cxtemp. Además el grupo MV también mostró diferencias significativas comparado con el grupo A (@) ($p < 0.05$) en cxsen. Cortezas frontal (cxfron), del cíngulo (cxcing), sensoriomotora (cxsen), entorrinal (cxent) y temporal (cxtemp). J (jóvenes), Ad (adolescentes), A (adultos), V (viejos), MV (muy viejos).

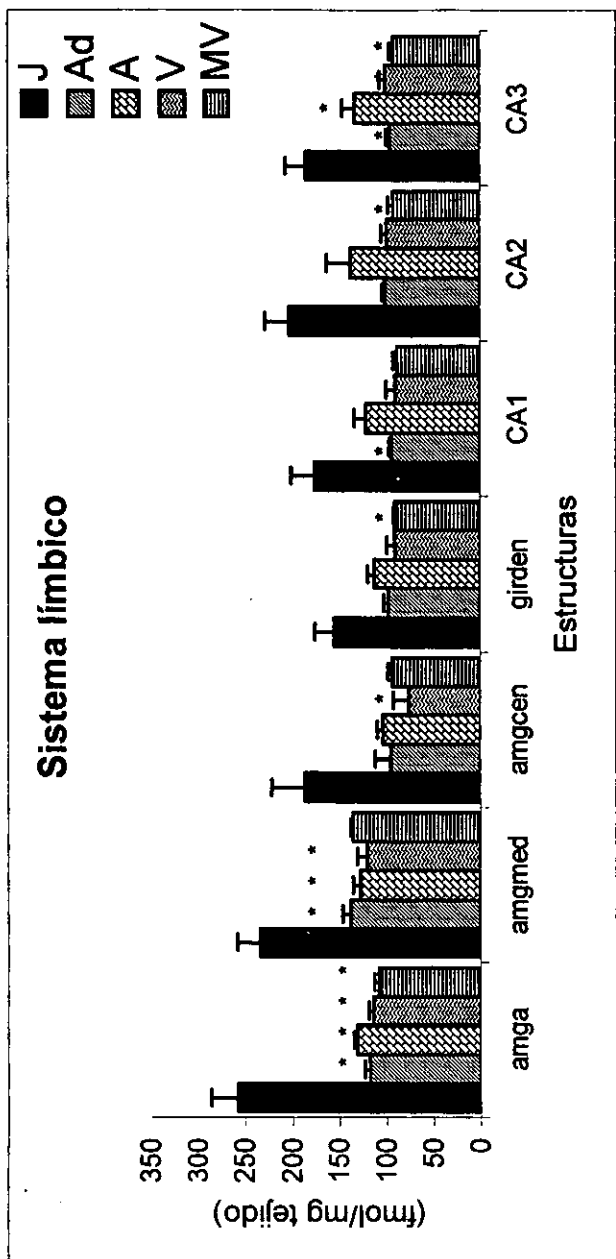


Figura 7. Niveles de unión a receptores μ en estructuras del Sistema Límbico de ratas a diferentes edades. Se muestran diferencias significativas del grupo J (*) ($p < 0.05$) comparado con el Ad en amga, amgmed, CA1 y CA3. El grupo A presentó diferencias significativas con el grupo J (*) ($p < 0.05$) en amga, amgmed y CA3, mientras que el grupo V en amga, amgmed, amgcn y CA3. Por último el grupo MV tuvo diferencias significativas con el grupo J (*) ($p < 0.05$) en amga, girden, CA2 y CA3. Núcleos amigdalinos anterior (amga), medial (amgmed), basolateral (amgbas) y central (amgcn); giro dentado (girden); regiones hipocámpicas CA1, CA2 y CA3. Ver anotaciones en Fig. 6.

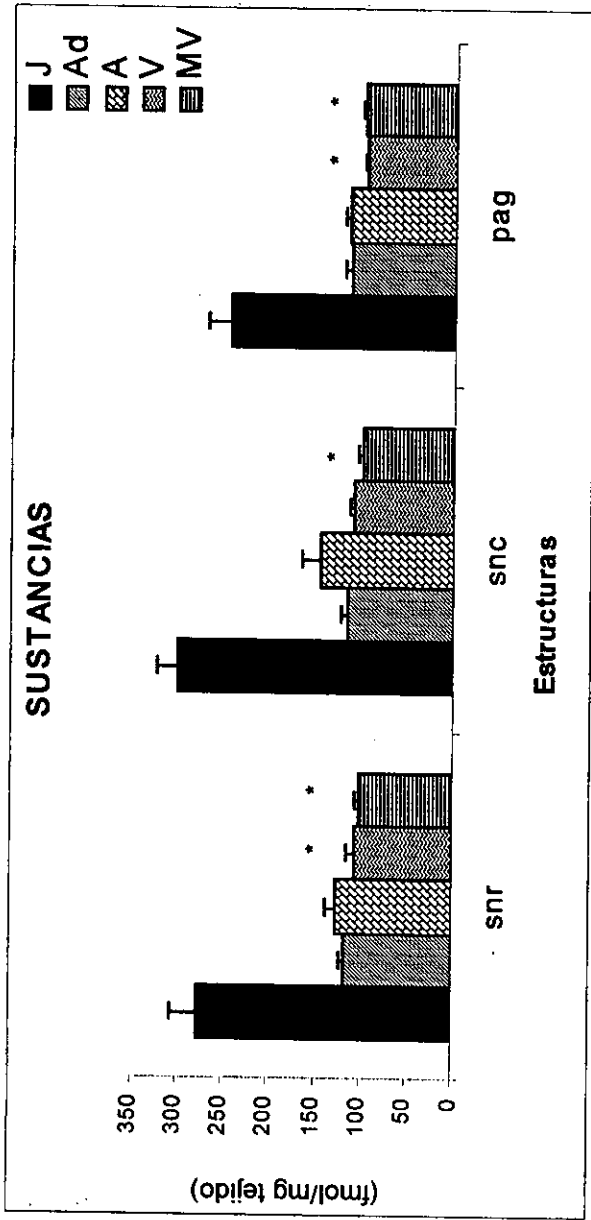


Figura 8. Los niveles de unión a receptores μ en otras estructuras cerebrales de ratas a diferentes edades. Los cambios observados indican que hay diferencias significativas del grupo J (*) ($p < 0.05$) comparado con V en snr y pag, y al compararlo con el grupo MV (*) ($p < 0.05$) en snr, snc y pag. Sustancia nigra pars reticulata (snr) y compacta (snc), sustancia gris periacueductal (pag). Ver anotaciones en Fig. 6.

1.23 Efecto del AK en los niveles de receptores μ .

1.23.1 Ratas Adultas

a) Ratas adultas 24 horas.

El análisis cuantitativo muestra que el grupo AAK1d comparado con el grupo ASS, presentó un incremento significativo de los niveles de receptores μ en cxfron (54%), cxcing (415%), cxtemp (54%), cauput (49%), girden (48%), CA2 (53%) y snr (56%). El resto de las estructuras no mostraron cambios significativos (Tabla 5 y Fig. 9). En la Fig. 14 se puede observar el aumento de receptores μ en un corte de una rata AAK1d en corteza temporal comparado con un cerebro de una rata ASS.

b) Ratas adultas 40 días.

El grupo AAK40d mostró un incremento significativo comparado con el grupo ASS en amga (39%), amgmed (64%), amgbas (202%), ambcen (32%), además en CA2 (80%), CA3 (49%), girden (80%) y cxsen (46%). El resto de las estructuras no mostraron diferencias significativas (Tabla 5 y Fig. 10). En la Fig. 15 se pueden observar los cambios en varios núcleos amigdalinos, giro dentado y varias regiones hipocampales.

1.23.2 Ratas Jóvenes

a) Ratas Jóvenes a las 72 horas

El grupo de ratas JAK3d presentó reducción de los niveles de receptores comparado con JSS3d, en snr (-26%) y hubo aumento en girden (40%). Las demás áreas analizadas no muestran cambios significativos (Tabla 5 y Fig. 11).

b) Ratas Jóvenes a los 40 días

Los niveles de receptores μ en los animales JAK40d comparado con el grupo JSS40d, disminuyeron en snr (-14%) y en cauput (-29%) pero el resto de las estructuras no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5 y Fig. 11).

1.23.3 Ratas Viejas

a) Ratas Viejas a las 24 horas

Las diferencias encontradas en las ratas VAK1d comparado con los animales VSS1d, muestran una tendencia a disminuir en todas las estructuras pero este decremento fue significativo en *cxsens* (-13%), *cxent* (-20%) y *amga* (-20%) (Tabla 5 y Fig. 12). La Fig. 16 muestra cambios en cerebro de una rata VAK1 en las regiones amigdalinas y corteza sensoriomotora comparado con una rata del grupo VSS1d.

b) Ratas Viejas a los 40 días.

Los animales VAK40d comparados con VSS40d mostraron incremento en *amgmed* (37%), *amgcn* (19%), *Ca1* (23%) y *girden* (17%). Sin embargo, el resto de las estructuras mantuvieron valores muy parecidos entre ambos grupos. (Tabla 5 y Fig. 12).

Tabla 5. Sitios de unión marcados con ³H-DAGO (fmol/mg de tejido) mostrados en los valores promedio de las densidades ópticas de los sujetos control (SS) y los tratados con ácido kaínico (AK).

	JÓVENES						ADULTOS						VIEJOS			
	JSS3d	JAK3d	JSS40d	JAK40d	ASS	AAK1d	AAK40	VSS1d	VAK1d	VSS40d	VAK40d					
Corteza frontal	202±24	202±15	96±3	89±6	104±2	159±14*	131±17	107±5	99±4	93±4	93±8					
Corteza cingulo	171±8	199±17	116±3	97±13	127±4	655±200*	134±8	138±9	137±4	102±12	117±5					
Caudado putamen	195±24	197±20	129±11	91±9@	153±25	228±40*	148±22	173±29	150±10	114±5	110±7					
Corteza sens.	158±9	180±11	95±3	97±4	122±12	142±13	178±27*	111±2	97±2@	95±1	92±4					
Corteza piriforme	150±7	184±21	93±5	94±1	120±10	128±6	152±18	111±9	85±3	95±5	107±4					
N.amg. anterior	258±27	235±18	112±4	106±1	131±4	133±3	182±25*	120±5	97±1@	102±10	123±6					
N.amg. medial	235±24	206±16	127±8	124±1	128±8	115±11	211±32*	130±14	103±6	104±2	143±2*					
N.amg. basolateral	234±26	278±21	156±17	153±10	239±33	243±11	723±222*	294±42	200±29	170±50	281±28					
N.amg. central	187±35	179±16	90±5	93±3	104±6	120±4	137±13*	74±25	85±3	82±4	94±3*					
Giro dentado	169±20	235±19*	95±3	94±3	113±7	167±22*	204±46*	96±14	98±2	81±1	98±4*					
Reg. Hip. Ca1	176±25	201±21	91±3	95±3	121±14	145±12	164±23	95±15	89±9	82±1	101±4*					
Reg. Hip. Ca2	204±25	213±14	98±4	98±2	114±8	175±19*	206±35*	105±8	94±5	89±2	96±3					
Reg. Hip. Ca3	186±21	208±16	92±6	92±5	133±14	151±12	198±31*	107±8	95±6	89±1	100±3					
Corteza entorrinal	202±16	187±321	101±3	90±8	118±9	124±10	119±6	111±3	91±5@	n.e.	107±7					
Corteza temporal	200±31	185±15	103±3	87±9	123±9	189±18*	142±9	119±1	108±7	n.e.	104±9					
Sustancia nigra pr	279±28	205±20@	109±6	86±4@	127±211	129±9	119±8	107±8	98±8	n.e.	87±3					
Sustancia nigra pc	301±21	242±20	110±7	95±6	124±7	194±28*	135±12	109±3	96±6	n.e.	87±6					
Sustancia gp	244±25	217±2	106±6	93±3	115±4	134±13	124±22	97±3	91±6	n.e.	104±5					
Geniculado	316±23	253±34	124±5	132±4	194±40	283±47	135±14	141±9	132±7	n.e.	107±4					

Grupo A control (ASS, n=9); A experimental (AAK1d, n=7 y AAK40d, n=6); Grupo J control (JSS3d, n=6 y JAK40d, n=10); Grupo J experimental (JAK3d, n=8 y JAK40d, n=4); Grupo V control (VSS1d, n=4 y VSS40d, n=2); Grupo V experimental (VAK1d, n=6 y VAK40d, n=4). n.e. = Valor no estimado. (*) Muestra aumento significativo comparado con el grupo control. (@) Muestra disminución significativa comparado con el control ($p < 0.05$). Ver anotaciones en Tabla 4.

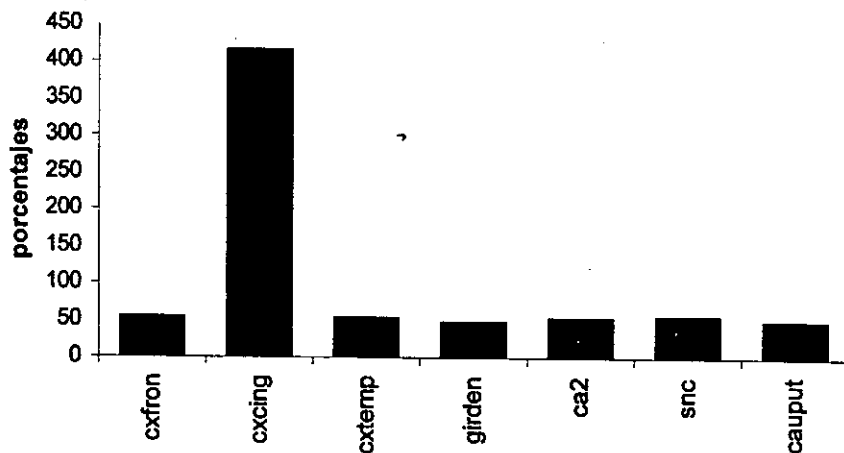


Figura 9. Porcentaje de unión de receptores μ del grupo AAK1d comparado con ASS. Se muestran solamente aquellas estructuras que mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). El grupo AAK1d presentó aumento en cxfron (54%), cxcing (415%), cxtemp (54%), girden (48%), CA2 (53%), snc (56%) y cauput (49%).

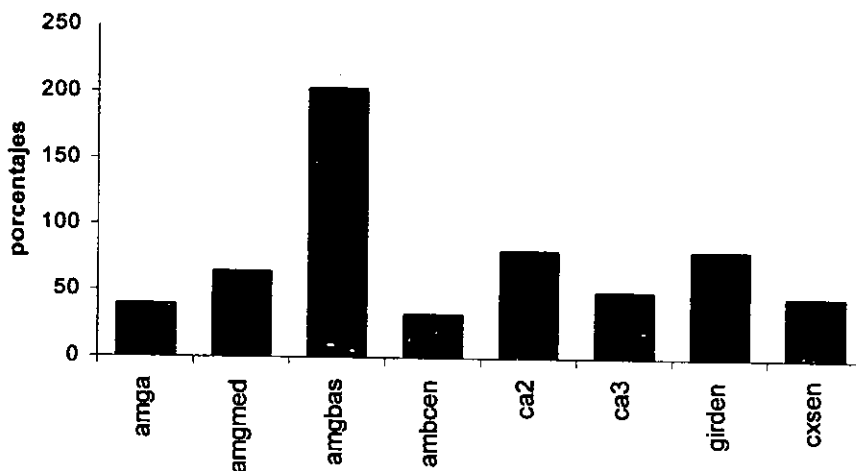


Figura 10. Cambios en porcentaje de receptores μ del grupo AAK40d comparado con ASS. En ésta gráfica se presentan las estructuras que tuvieron cambios significativos ($p > 0.05$), como en amga (39%), amgmed (64%), amgbas (202%), amgben (32%), CA2 (80%), Ca3 (49%), girden (80%) y cxsen (46%).

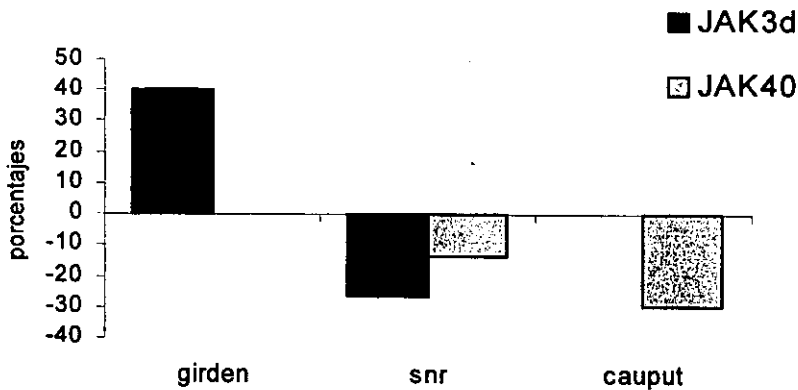


Figura 11. Cambios porcentuales de los niveles de receptores μ en las ratas del grupo JAK3d y JAK40d comparado con los grupos JSS3d y JSS40d respectivamente. El grupo JAK3d presentan un incremento significativo de receptores μ en girden3d (40%) y un decremento en snr3d (-26%). Mientras que en JAK40d hay disminución tanto en snr40d (-14%) como en cauput40d (-29%).

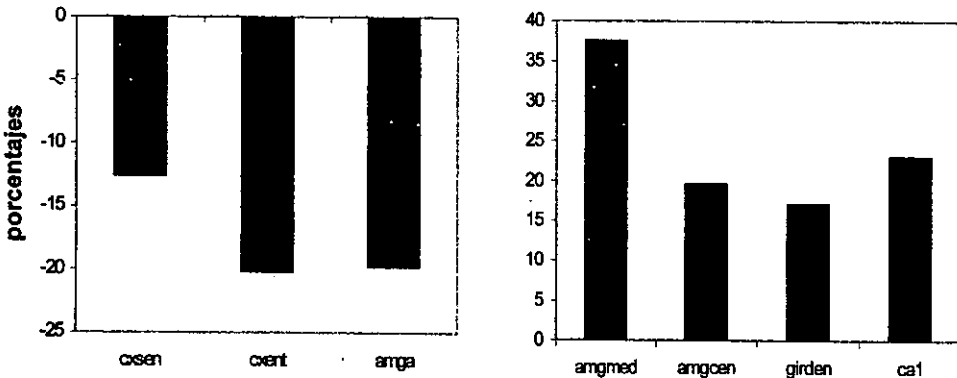


Figura 12. Niveles de receptores marcados con $^3\text{H-DAGO}$ en ratas de los grupos VAK1d y VAK40d comparado en porcentaje con los grupos VSS1d y VSS40d respectivamente. A la izquierda vemos que en el grupo VAK1d hay un decremento significativo de receptores μ en cxsen (-13%), cxent (-20%) y en amga (-20%). En el grupo VAK40d se encontró incremento en amgmed (37%), amgcen (19%), CA1 (23%) y girden (17%).

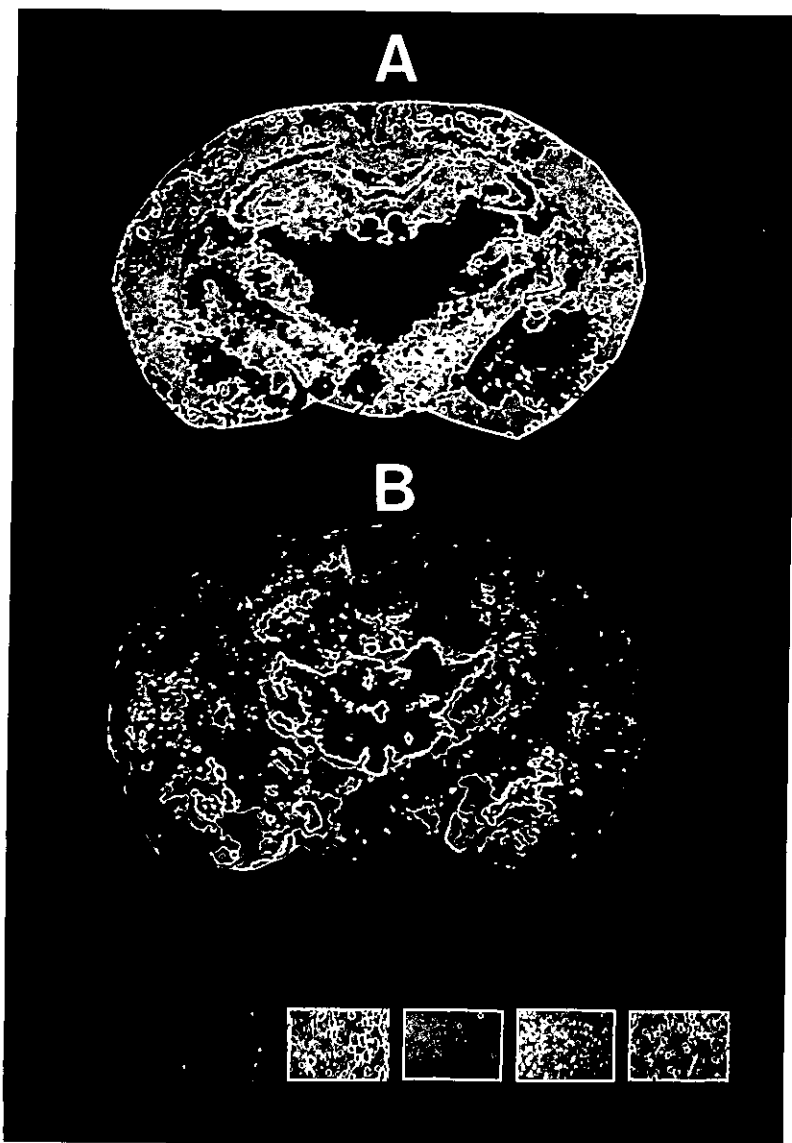


Figura 13. Distribución normal de receptores μ marcados con $^3\text{H-DAGO}$ en secciones coronales de cerebro de una rata adulta (A) y una rata vieja (B) a nivel de amígdala e hipocampo dorsal. Las barras de color muestran la calibración expresada en femtomolas por miligramo de tejido. Los colores negro y rojo indican niveles altos de receptores μ , mientras que el azul y blanco representa niveles bajos. Nótese que en B existe una importante reducción de los receptores μ en cortezas sensoriomotora y piriforme, hipocampo y núcleos amígdalinos.

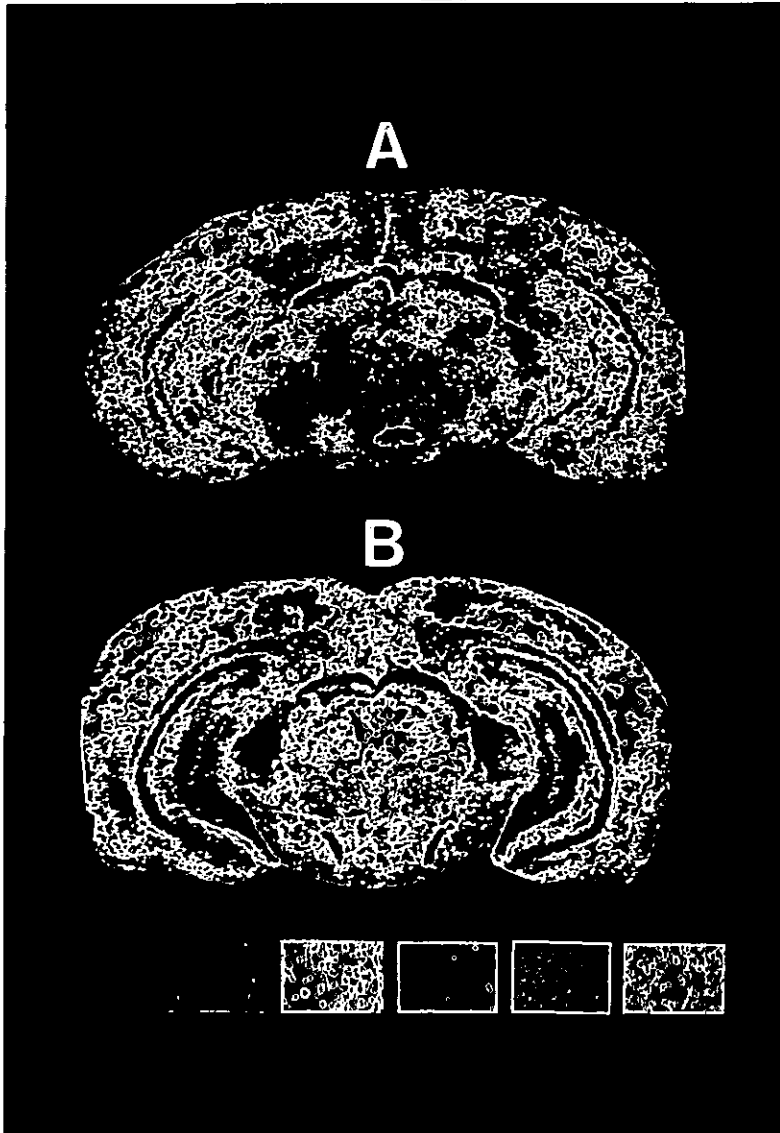


Figura 14. Receptores μ marcados con ^3H -DAGO en secciones coronales representativas del cerebro de una rata ASS (A) y una AAK1d (B) a nivel de sustancia nigra pars compacta y periacueductal. Nótese en AAK1d un incremento de receptores μ en cortezas entorrinal y temporal, así como en sustancia nigra pars compacta. Anotaciones iguales a la Fig.13.

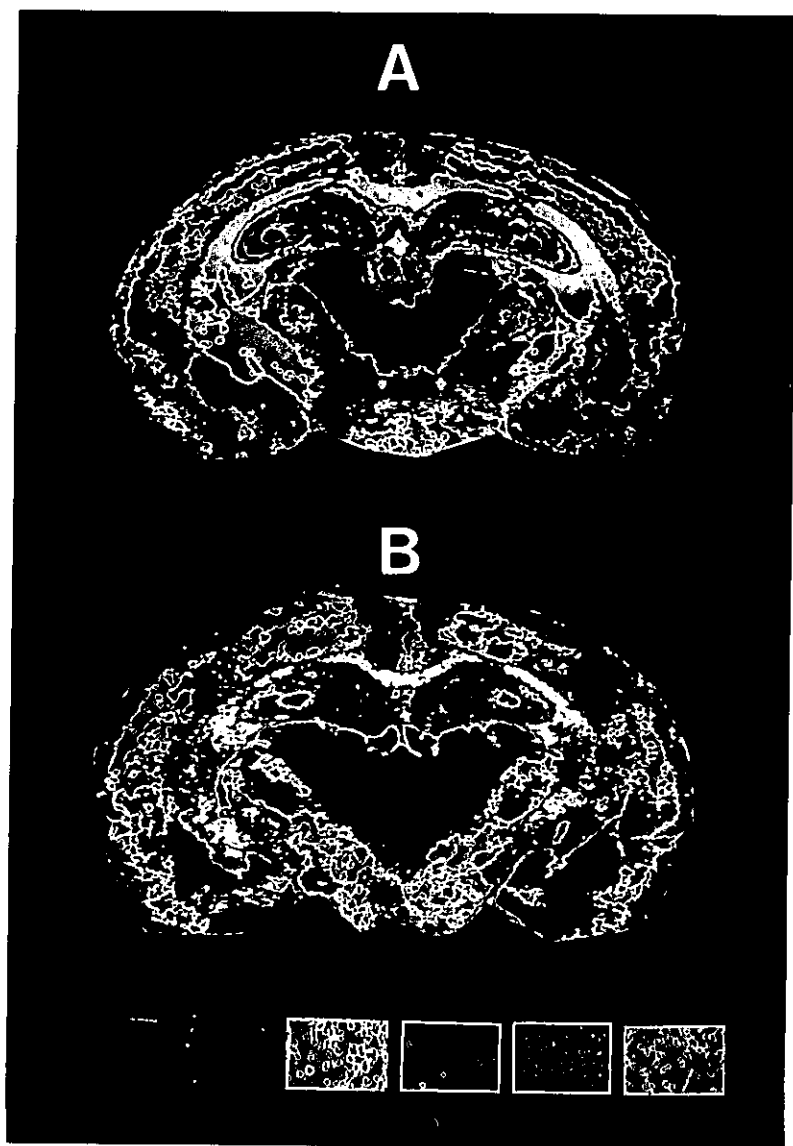


Figura 15. Distribución de receptores μ marcados con $^3\text{H-DAGO}$ en secciones coronales de cerebro de una rata del grupo ASS40d (A) y del grupo AAK40d (B) a nivel de amígdala e hipocampo dorsal. Nótese en AAK40d un incremento de los niveles de receptores μ en los núcleos amigdalinos. Anotaciones iguales a la Fig.13.

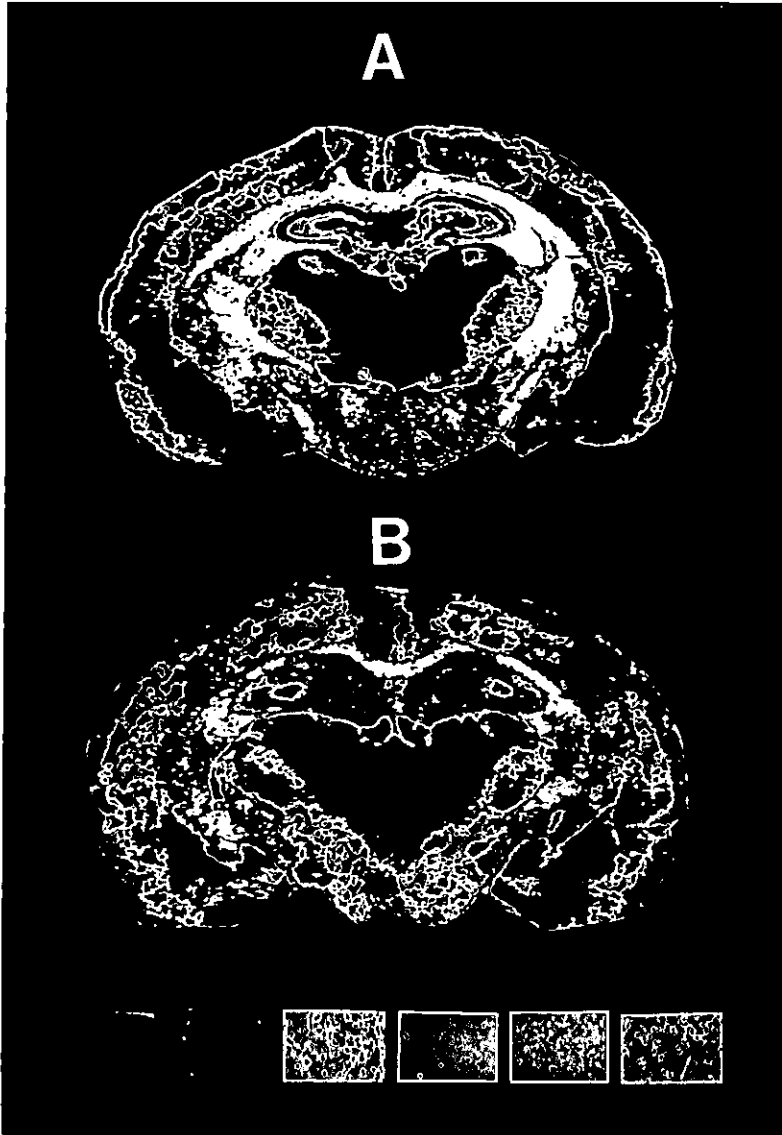


Figura 16. Receptores μ marcados con $^3\text{H-DAGO}$ en secciones coronales a nivel de amígdala e hipocampo dorsal de cerebro de una rata del grupo VSS1d (A) y una rata del grupo VAK1d (B). Nótese que B presenta disminución de receptores μ en cortezas sensoriomotora y piriforme, así como en los núcleos amigdalinos e hipocampo. Anotaciones iguales a la Fig.13.

DISCUSIÓN

Ontogenia y Receptores μ .

En este estudio se observó que los niveles de receptores μ presentan un patrón ontogenético similar en todas las estructuras analizadas. En la etapa juvenil y adulta de la rata, se tienen altos niveles de receptores μ , mientras que en la adolescencia y edades avanzadas estos valores son bajos.

La distribución de los receptores μ en cerebro de rata ha sido estudiada mediante la técnica autorradiografía por varios autores. Se ha descrito que en el complejo amigdalino existe una diferenciación regional en cuanto a los niveles de receptores μ en ratas adultas, ya que mientras en el núcleo central se presentan escasos niveles de receptores, el núcleo basolateral muestra una alta cantidad de estos (Mansour et al., 1986; Paden et al., 1987). En hipocampo se ha encontrado que los mayores niveles de unión a receptores μ se encuentran en la región hipocampal CA3 y los menores en CA2 (Crain et al., 1987). Nuestros resultados apoyan lo anterior.

El desarrollo ontogenético de los receptores μ en cerebro de rata descrito por Georges et al., (1998), indica que existe una alta expresión de RNAm en etapas prenatales del desarrollo (día 13 de gestación), con una tendencia posterior a disminuir en etapas postnatales, siendo el estado adulto el de menor intensidad de marcaje para RNAm. Se ha sugerido que los sistemas opioides juegan un papel importante en el desarrollo del SNC (Georges et al., 1998) lo cual podría explicar estos cambios ontogenéticos. Por otra parte, se sabe que en etapas tempranas del desarrollo los sistemas inhibidores están menos desarrollados que los excitadores y que el GABA puede tener una función excitadora más que inhibitoria (Luhmann and Prince, 1991). También se ha descrito una regulación del sistema gabaérgico sobre el sistema peptidérgico (Rocha et al., 1993; Ruzicka y Jhamadas, 1991). Por lo anterior, los altos niveles de receptores μ observados en ratas jóvenes podrían funcionar como un sistema inhibitorio para compensar la poca eficiencia en el sistema gabaérgico, manteniendo un equilibrio entre las señales inhibitoras y

excitadoras. Por otra parte, las ratas adolescentes (edad en donde se presentan influencias hormonales, cambios morfológicos y conductuales importantes) pueden ser vistas como un grupo de transición, ya que existe una disminución de arborizaciones excitadoras presentes en sujetos inmaduros (Pierson y Swann, 1999). Lo anterior pudiera sugerir que se requiere menos de la participación de receptores μ para regular la sobreexcitación presente en sujetos jóvenes.

Se ha reportado que con la edad hay un decremento en el número de receptores en SNC (Misra et al., 1980). Las ratas viejas, a pesar de presentar una disminución en el número de receptores a opioides, tienen una mayor afinidad por sus ligandos endógenos (Neisewander et al., 1989, Ueno et al., 1988). Lo anterior se podría entender como un mecanismo compensatorio a la disminución de receptores para mantener así su plasticidad. Una de las estructuras que tuvo disminución importante en los valores de unión a $^3\text{H-DAGO}$ en ratas de 20 meses fue el hipocampo, donde la degeneración de neuronas y fibras (como el caso de la vía perforante) se ha relacionado con las deficiencias de la memoria a edad avanzada (Thai et al., 1996).

Lo anterior nos puede sugerir que el papel de los receptores μ puede estar relacionado con el desarrollo del SNC, ya que los niveles mas altos se presentan en etapas importantes del crecimiento y disminuyen en edades avanzadas.

Epilepsia y receptores μ

En el presente estudio se evaluó la unión de los receptores μ después de la presentación del *status epilepticus* lo que mostró que existen patrones diferentes de cambio según la edad y el tiempo a los que fueron evaluados.

Se ha reportado en varios modelos experimentales aumento de los niveles tisulares y de las concentraciones cerebrales de péptidos opioides después de una crisis epiléptica, (Vindrola et al., 1981; Rocha et al., 1994; Rocha et al., 1997; Lee et al., 1989; Asai et al., 1995), lo cual se ha relacionado con cambios en los receptores μ en el periodo postictal (Crain et al., 1987; Rocha et al., 1993; Frost et al., 1988; Mayberg et al., 1991). Los cambios en receptores μ puede reflejar efectos proconvulsivos (Lee et al., 1989; Tortella et al., 1987) y anticonvulsivos (Tortella et

al., 1988). Se sabe que la infusión de un agonista μ intensifica el daño neuronal inducido por el AK (Lason et al., 1988) sin embargo, el pretratamiento crónico con morfina en ratas tratadas con AK, incrementa el número de receptores μ en el periodo postictal e interictal, disminuyendo la tasa de mortalidad y aumentando el periodo postictal (Cano-Martínez et al., 2001).

En el presente estudio se evaluó la unión a receptores μ en ratas de distintas edades y a diferentes tiempos ya que el AK es considerado como un modelo para generar *status epilepticus* (EE) y epilepsia del lóbulo temporal (ELT) tiempo después de su administración. A las 24 horas se observaron los cambios inducidos por el EE mientras que a los 40 días (inicio de la ELT) estos cambios mostrarían el papel que juegan los receptores μ en la subsecuente generación de crisis espontáneas.

Después de una crisis epiléptica existe un aumento de receptores μ en el neocortex de pacientes con ELT además de otras cortezas (Frost et al., 1988), probablemente como mecanismo para evitar la propagación crisis subsecuentes. Ridd y cols. (1998) encontraron un aumento en número y afinidad de receptores μ en corteza a las 4 horas del EE inducido por AK. Así mismo, en el presente estudio las ratas adultas 24 horas después de la administración de AK, tuvieron un aumento de receptores μ en varias cortezas (cxfron, cxcing y cxtemp), estructuras relacionadas con mecanismos inhibitorios (Púrpura, 1969) y detenimiento de las crisis (Mayber et al., 1991). Análisis posteriores para evaluar la expresión de receptores μ nos ayudaría a determinar si este aumento en los niveles de unión se debe al incremento en número de receptores o a la afinidad por su ligando.

El aumento observado receptores μ en sustancia nigra y caudado putamen podría estar relacionado con la inhibición de movimiento durante el periodo postictal. Este incremento en sustancia nigra (estructura relacionada con la actividad locomotora) se relaciona con un aumento en la liberación de dopamina (Di Chiara et al., 1981) y con la supresión de crisis epilépticas (Burke et al., 1990). Además, las proyecciones que caudado putamen manda a sustancia nigra son principalmente inhibitorias (Calvaheiro y Le Gall la Salle, 1982) sugiriendo una inhibición de las crisis convulsivas.

Se ha descrito que la aplicación local o sistémica de AK aumenta los niveles de Met-enkefalina y dinorfina pocas horas después, pero estos niveles disminuyen a tiempos largos (40 días) (Rocha y Maidment, en proceso). El hecho de que a las 24 horas de presentarse el EE en ratas adultas sean pocas las estructuras límbicas que muestran aumento de receptores μ como el giro dentado y CA2 (datos que coinciden con lo reportado por) (Ridd et al., 1998), puede deberse a una disminución en la liberación de péptidos opioides ya que ambas estructuras se han relacionado con la generación y propagación de las crisis (Dingledine, 1981).

Se ha reportado que los sitios de unión a μ en hipocampo disminuyen 24 horas después de una crisis inducida por "kindling"-amigdalino, pero no cambian 7 días después del tratamiento (Crain et al., 1987). Sin embargo, nosotros encontramos en las ratas adultas 40 días después del tratamiento con AK, un aumento generalizado de receptores μ en estructuras límbicas (núcleos amigdalinos, CA2, CA3 y giro dentado). Este aumento de receptores μ podría mediar el daño neuronal inducido por el AK y la actividad epileptogénica de la amígdala e hipocampo (Dingledine, 1981; Crain et al., 1987) y los datos podría diferir de los antes mencionados, debido a los diferentes modelos experimentales utilizados. Por otra parte, se ha reportado que los receptores a benzodiazepinas aumentan en giro dentado 40 días después del EE epiléptico inducido por AK, como mecanismo postictal para prevenir la generación de crisis subsecuentes al aumentar la acción del GABA (Rocha et al., 2000). El aumento de receptores μ observado por nosotros en esta estructura podría representar un papel similar, siendo esta estructura de suma importancia al servir como filtro para evitar la propagación de las crisis.

Como se mencionó anteriormente, los datos ontogenéticos muestran altos niveles de unión a receptores μ en ratas jóvenes, lo cual podría estar relacionado con la alta susceptibilidad a generar crisis epilépticas en esta edad. Sin embargo, se ha descrito que antes de la tercera semana de edad las células granulares del giro dentado no han madurado lo suficiente para propagar las señales excitadoras (Amaral y Dent, 1981), por lo que a esta edad la activación de los receptores μ en giro dentado podría ayudar a detener la crisis epilépticas. Por otra parte, se encontró disminución de receptores μ en sustancia nigra pars reticulata, estructura con efectos

proconvulsivos a esta edad (Moshé, 1981; Moshé et al., 1983; Veliskova, 1999). La disminución de receptores en esta estructura puede deberse a la liberación de péptidos en otras áreas cerebrales, cuya acción en sustancia nigra pars reticulata induce una regulación a la baja de sus receptores.

A los 40 días del EE inducido por AK en ratas jóvenes se ve disminución de receptores μ en caudado putamen y sustancia nigra pars reticulata. Se ha descrito que las ratas de 35 días de edad (adolescentes) son las más resistentes a generar crisis epilépticas comparado con otras edades (Moshé et al., 1983), y nuestros datos ontogénéticos muestran que esta edad presenta los niveles más bajos de unión a ^3H -DAGO comparado con los demás grupos. Se sugiere que los niveles basales de receptores μ en ratas adolescentes están relacionados con la baja susceptibilidad a generar crisis epilépticas. Por otro lado, la disminución de receptores μ tiempo después del EE puede deberse a una prolongada liberación de péptidos opioides, y podría explicar el bajo daño neuronal observado en ratas jóvenes (Schwob et al., 1980; Beni-Ari et al., 1984; Niteka et al., 1984). Se propone que el desarrollo tardío de las células del giro dentado (tercera semana de edad) evita el daño en circuitos hipocampales y la sobre-excitación recurrente (Sperber et al., 1992). Esto puede reflejar el hecho de que no existan cambios en los niveles de unión a receptores μ en sistema límbico.

A diferencia del patrón de activación en ratas adultas, en ratas jóvenes no existen cambios en los niveles de receptores μ en cortezas. El AK induce aumento en los niveles de receptores a BDZ en cortezas de cerebros inmaduros como un mecanismo inhibitorio (Rocha et al., 2000) lo que podría explicar que no hallan cambios en los receptores μ en estas regiones tomando en cuenta la regulación que existe entre ambos sistemas.

En las ratas viejas 24 horas después de la aplicación del AK existe un decremento importante en los niveles de receptores μ principalmente en las cortezas (cxsen y cxent) y núcleos amigdalinos. Se propone que la liberación de péptidos opioides es más lenta en sujetos viejos que en adultos o inmaduros ya que como se describió antes a las 24 horas de administrar el AK hay una regulación a la alta de receptores μ en ratas adultas, relacionado con una disminución en la liberación de

péptidos a estos tiempos. Lo anterior podría reflejar una activación retardada de los mecanismos inhibitorios en las ratas viejas. (Douglass et al., 1991; Rocha y Maidment, en proceso). Es necesario realizar estudios de los niveles de receptores a intervalos de tiempo más cortos y relacionarlo con estudios de los niveles de péptidos opioides para evaluar la regulación de los receptores μ en esta edad.

Por otra parte, a los 40 días de administrarse el AK en ratas viejas, este induce aumento de los receptores μ en sistema límbico (amígdala medial y central). A diferencia de las ratas adolescentes (con valores similares a los de las ratas viejas en condiciones normales) quienes presentan disminución de receptores μ después de la aplicación del AK, el aumento observado en las ratas viejas podría estar asociado a un mayor daño neuronal, debido a la activación de los receptores y el incremento de la neurotoxicidad del AK (Lason et al., 1988)

Algunos autores han reportado daño en corteza piriforme, complejo amigdalino e hipocampo en ratas adultas tratadas con AK (Schwob et al., 1980; Nitecka et al. 1984). Sin embargo, no se han realizado dichos estudios a diferentes edades, lo cual nos podría hablar mas de la relación que tienen los receptores μ y el daño neuronal.

Como un estudio a futuro se propone analizar los cambios en número y afinidad de los receptores μ en las estructuras relacionadas con la actividad epiléptica inducida por AK, como son giro dentado, núcleos amigdalinos y cortezas en diferentes etapas de desarrollo. Además, relacionar lo anterior con los niveles de péptidos endógenos y evaluar el daño neuronal inducido por el aumento de receptores μ a diferentes tiempos. Es importante señalar que muchos de estos cambios no se dan solamente a nivel de membrana celular, y la participación de segundos mensajeros nos puede ayudar a entender mejor los mecanismos que están actuando en la regulación de los receptores. Se requiere de estudios bioquímicos que faciliten este entendimiento, como la participación de AMPc o PKC en las regiones antes mencionadas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

Estos datos muestran que existen cambios en los receptores μ según el estado de desarrollo del organismo, tanto en condiciones normales, como a diferentes tiempos después de la administración de AK. Las ratas jóvenes presentan altos niveles de receptores μ en condiciones normales, lo que puede relacionarse con una alta susceptibilidad a generar crisis epilépticas después de la aplicación de AK. Sin embargo, existió una disminución de receptores μ en estructuras relacionadas con la propagación de las crisis lo que puede reflejar una rápida y prolongada activación de los sistemas inhibitorios para evitar daño neuronal. Por su parte, las ratas adultas presentan cambios en los receptores μ relacionados con mecanismos que logran evitar la propagación de las crisis, principalmente en cortezas. En cambio en ratas viejas, se presentaron bajos niveles de receptores μ en condiciones normales, que al poco tiempo de administrar el AK disminuyeron principalmente en cortezas y a largo plazo aumentaron en Sistema Límbico. Esto sugiere que existe una activación deficiente y retardada de los sistemas inhibitorios para evitar la propagación de las crisis epilépticas en sujetos viejos.

Lo anterior indica que existen mecanismos diferentes en la activación de los receptores μ que dependen de la edad, lo cual nos puede ayudar a entender las diferencias relacionadas con el desarrollo del Sistema Nervioso Central y la generación de crisis epilépticas, así como la regulación de sistemas inhibitorios que se activan después de un evento ictal.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, D. G. y J. A. Dent (1981). "Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions." J Comp Neurol **195** (1): 51-86.
- Annegers, J. F., L. R. Elveback, et al. (1975). "Epilepsy anticonvulsants and malformations." Birth Defects Orig Artic Ser **11** (5): 157-60.
- Ashok, K. S. y D. A. Turner (1999). "Vulnerability of the dentate gyrus to aging and intracerebroventricular administration of kainic acid" Exp.Neurol **158**:491-503.
- Asai, M., G. Matamoros-Trejo, et al. (1995). "Opioid peptides content in the rat brain during the ictal phase and after pentylenetetrazol-kindled rats." Comp Biochem Physiol A Physiol **112** (1): 241-5.
- Baucaud, J. y O. Henrinczan (1981). "Proposal for revised clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures." Epilepsia **22**: 489-501.
- Ben-Ari, Y., E. Tremblay, et al. (1980). "The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid." Brain Res **191**(1): 79-97.
- Ben-Ari, Y., A. Represa, et al., (1992). "Epileptogenesis and neuronal plasticity: studies on kainate receptor in the human and rat hippocampus." Epilepsy Res Suppl **8**, 369-73.
- Ben-Ari, Y., E. Tremblay, et al. (1984). "Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats." Brain Res **316** (2): 284-8.
- Berger, M. y Y. Ben-Ari (1983). "Autoradiographic visualization of [3H]kainic acid receptor subtypes in the rat hippocampus." Neurosci Lett **39**(3): 237-42.
- Berger, M. L., E. Tremblay, et al. (1984). "Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. III. Postnatal development of kainic acid binding sites in the limbic system." Neuroscience **13**(4): 1095-104.
- Biziere, K. y J. T. Coyle (1979). "Localization of receptors for kainic acid on neurons in the innernuclear layer of retina." Neuropharmacology **18** (4): 409-13.
- Böhme A.E. et al., (1987). "Effects of selective m and d opioid peptides on kindled amygdaloid seizures in rats". Neuroscience letters. **74**:227-231.
- Burke, K., C. J. Chandler, et al. (1990). "Seizure promotion and protection by D-1 and D-2 dopaminergic drugs in the mouse." Pharmacol Biochem Behav **36** (4): 729-33.
- Caldecott-Hazard, S., N. Yamagata, et al. (1983). "Changes in simple and complex behaviors following kindled seizures in rats: opioid and nonopioid medication." Epilepsia **24** (5): 539-47.
- Caldecott-Hazard, S. y Engel, J. (1987). "Limbic postictal events: anatomical substrates and opioid receptor involvement. Prog. Neuro-Psychopharmacol. And bio. Psychiat. **11**, 389-418.
- Calvaheiro, E.R. y Le Gal la ia Salle, G. (1982). Long term effects of intrahippocampal kainic acid in ratas: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. Electroenceph.clin. Neurophysiol. **53**,581-582.
- Cano-Martinez, L., Rocha, et al., (2001). "Effects of chronic morphine and N6-cyclopentyladenosine administration on kainic acid-induced *status epilepticus*. Epilepsy Research (en prensa).
- Campochiaro, P. y J. T. Coyle (1978). "Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation." Proc Natl Acad Sci U S A **75** (4): 2025-9.
- Cai Y., Y. Zhang., et al., (1996). "d opioid receptor in neuronal cells undergoes acute and homologous desensitization. Biochemical and biophysical research communications. **219**: 342-347.
- Chang, K.J. (1981). "Multiple opiate receptors and *in vitro* methodology for opioid peptides". Psychopharmacolo.Bull. **17**:108-111.

- Chang, K., P. Cuatrecasas et al., (1982) "Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and β -casomorphins: correlation with the morphine (μ) receptor binding affinity." Life Science 31: 1547-1551.
- Chang, K., P. (1986). "The Mu Receptor" In: Opioid Receptors, Vol. I. Academic Press, New York, pp. 546-580.
- Chavkin, C. y A. Goldstein (1982). "Reduction in opiate receptor reserve in morphine tolerant guinea pig ilea." Life Sci 31 (16-17): 1687-90.
- Chavkin, C. y M. Simmons (1996). "Endogenous opioid regulation of hippocampal function." International review of neurobiology 39: 146-196.
- Coyle, J. T. (1983). "Neurotoxic action of kainic acid." J Neurochem 41(1): 1-11.
- Crain, B. J., K. J. Chang, et al. (1987). "An in vitro autoradiographic analysis of mu and delta opioid binding in the hippocampal formation of kindled rats." Brain Res 412 (2): 343-51.
- Dawson R Jr. y DR. Wallace (1992) "Kainic acid-induced seizures in aged rats: neurochemical correlates." Brain Res Bull:29 (3-4):459-68.
- DiChiara, G.D., Morrell, M et al., (1981). "Effect of barbiturates and benzodiazepines on local kainate toxicity in the striatum and in the retina. In: Glutamate as a Neurotransmitter, pp.355-362. Eds G. Di Chiara and G.L. Gessa, Raven Press: New York.
- Dingledine, R. (1981). "Possible mechanisms of enkephalin action on hippocampal CA1 pyramidal neurons." J Neurosci 1(9): 1022-35.
- Douglass, J., L. Grimes, et al. (1991). "Systemic administration of kainic acid differentially regulates the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNA and peptides in the rat hippocampus." Brain Res Mol Brain Res 9(1-2): 79-86.
- DeToledo-Morell L, Geinisman Y, Morrell F., (1988) "Age-dependent alterations in hippocampal synaptic plasticity: relation to memory disorders" Neurobiol Aging:9(5-6):581-90
- Engel, J.R. (1989) "Seizures and Epilepsy" Davis Company Ed. USA. p.p: 247-249.
- Engel, J., R. Bandler, et al. (1991). "Neurobiological evidence for epilepsy-induced interictal disturbances". Advances in Neurology. D. Smith, D. Treiman and M. Trimble. New York, Raven Press. 55: 97-109.
- Engel, J., Jr. y Rocha, L. L. (1992). Interictal behavioral disturbances: a search for molecular substrates. Epilepsy Res Suppl 9, 341-9.
- Engel, J. (1995). "Concepts of epilepsy." Epilepsia 36: 523-529.
- Erdo, S. L. y J. R. Wolff (1989). "Transient increase in ligand binding to quisqualate and kainate sites in cerebral cortex of immature rats." Neurosci Lett 104(1-2): 161-6.
- Feria-Velazco, A. y A. Gonzalez-Angulo (1991). "Alteraciones anatómicas asociadas a la epilepsia". Epilepsia experimental. E. Otero-Siliceo. México, D.F., Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 1: 27-36.
- Fisher, A. (1989). Animal models of epilepsies. Brain Research Reviews 14:245-278.
- Foster G.A, y Roberts P.J. (1981). Kainic acid stimulation of cerebellar cyclic GMP levels: potentiation by glutamate and related amino acids. Neurosci Lett. 9:23(1):67-70.
- Frost, J. J., H. S. Mayberg, et al. (1988). "Mu-opiate receptors measured by positron emission tomography are increased in temporal lobe epilepsy." Ann Neurol 23(3): 231-7.
- Georges, F., E. Normand, et al. (1998). "Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study." Brain Res Dev Brain Res 109(2): 187-99.
- Goodman, R., R., Houghton et al., (1983). "Epsilon receptor sites: Autoradiographic and homogenate binding evidence for selective 3 H-b-endorfine binding sites in rat brain". Int. Narc. Res. Conf. Abst (155).
- Greenamyre, J. T., J. M. Olson, et al. (1985). "Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate-, quisqualate- and kainate-sensitive glutamate binding sites." J Pharmacol Exp Ther 233(1): 254-63.

- Guyton, A. (1997). "Vigilia, sueño, atención, ondas cerebrales, epilepsia y conducta" In: Fisiología Médica. A. Guyton. México, Editorial Interamericana: 246-252.
- Kandel, E., J. Schwartz, et al. (2000). Synaptic Integration. In: Principles of neural science. E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell. New York, McGraw-Hill: 208-228.
- Kesslak, J. P., D. Yuan, et al. (1995). "Vulnerability of the hippocampus to kainate excitotoxicity in the aged, mature and young adult rat." Neurosci Lett **188**(2): 117-20.
- Lason, W., J. N. Simpson, et al. (1988). "Mu but not delta opioid receptor stimulation intensifies kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus." Neuropeptides **12**(2): 89-94.
- Lee, P. H., J. Obie, et al. (1989). "Opioids induce convulsions and wet dog shakes in rats: mediation by hippocampal mu, but not delta or kappa opioid receptors." J Neurosci **9**(2): 692-7.
- Lodge D, Johnston GA, et al., (1979). Kainate neurotoxicity and glutamate inactivation. Neurosci Lett. **14**(2-3):343-8.
- Lothman, E. W. y R. C. Collins (1981). "Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates." Brain Res **218**(1-2): 299-318.
- Luhmann, H. J. y D. A. Prince (1991). "Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex." J Neurophysiol **65**(2): 247-63.
- Lupica, C. R., W. R. Proctor, et al. (1992). "Dissociation of mu and delta opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro." Brain Res **593**(2): 226-38.
- Madison, D. V. y R. A. Nicoll (1988). "Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus." J Physiol **398**: 123-30.
- Mansour, A., M. E. Lewis, et al. (1986). "Pharmacological and anatomical evidence of selective mu, delta, and kappa opioid receptor binding in rat brain." Brain Res **309**(1): 69-79.
- Massieu, L., A. Morales-Villagran, et al. (1995). "Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study." J Neurochem **64**(5): 2262-72.
- Mayberg, H. S., B. Sadzot, et al. (1991). "Quantification of mu and non-mu opiate receptors in temporal lobe epilepsy using positron emission tomography." Ann Neurol **30**(1): 3-11.
- McNamara, J. O. (1994). "Cellular and molecular basis of epilepsy." J Neurosci **14**(6): 3413-25.
- Misra, C. H., H. S. Shelat, et al. (1980). "Effect of age on adrenergic and dopaminergic receptor binding in rat brain." Life Sci **27**(6): 521-6.
- Moshé, S. L. (1981). "The effects of age on the kindling phenomenon." Dev Psychobiol **14**(1): 75-81.
- Moshé, S. L., B. J. Albala, et al. (1983). "Increased seizure susceptibility of the immature brain." Brain Res **283**(1): 81-5.
- Nadler J.V., Perry B.W., et al., (1978) "Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells". Nature **271**: 676-677.
- Nadler, J. V. y Cuthbertson, G. J. (1980). Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. Brain Res **195**, 47-56.
- Nadler, J. V. (1981). "Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy." Life Sci **29** (20): 2031-42
- Nakata Y, Chang KJ, et al., (1985) Repeated electroconvulsive shock downregulates the opioid receptors in rat brain. Brain Res, **28**:346(1):160-3
- Nehlig, A., A. Pereira de Vasconcelos, et al. (1999). "Age-related metabolic and circulatory changes during seizures" In: Childhood, epilepsies and brain development. A. Nehlig, J. Motte, S. L. Moshe and P. Plouin, Nehlig, A. P.: 221-236.

- Neisewander, J. L., A. J. Nonneman, et al. (1989). "Up-regulation of opiate receptors following chronic naloxone treatment in aged rats." *Neurobiol Aging* 10 (1): 55-8.
- Nitecka, L., E. Tremblay, et al. (1984). "Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae." *Neuroscience* 13 (4): 1073-94.
- Onley, J.W., Rhee F., et al., (1974) "Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate". *Brain Res.* 77, 507-512.
- Paden, C. M., S. Krall, et al. (1987). "Heterogeneous distribution and upregulation of mu, delta and kappa opioid receptors in the amygdala." *Brain Res* 418 (2): 349-55.
- Pasternak, G. W., A. R. Gintzler, et al. (1983). "Biochemical and pharmacological evidence for opioid receptor multiplicity in the central nervous system." *Life Sci* 33 (Suppl 1): 167-73.
- Pasternak, G. W. (1988). "The opiate receptors" *The Humana Press*, New Jersey. PP:497.
- Pasternak, G.W. y Standifer, K.M., (1997), "G proteins and opioid receptor-mediated signalling" *Cell Signal*;9 (3-4): 237-48
- Paxinos, G. y C. Watson (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates" Academic Press, London.
- Pérez, V.J. y Onley, J.W. (1972) "Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate". *J. Neurochem.* 19, 1777-1782
- Perry, D. C. y L. M. Grimes (1989). "Administration of kainic acid and colchicine alters mu and lambda opiate binding in rat hippocampus." *Brain Res* 477 (1-2): 100-8.
- Pierson, M. y J. W. Swann (1999). "The contribution of developmental plasticity of early-life seizures and chronic epilepsy. *Childhood, epilepsies and brain development*. A. Nehlig, J. Motte, S. L. Moshe and P. Plouin, Nehlig, A.P.:25-38.
- Proctor, M. y Gale, K. (1997). "Basal ganglia and brainstem anatomy and physiology. In *Epilepsy: a comprehensive textbook*, eds J. Engel and A. Pedley), pp. 253-368. Philadelphia: Lippincott-Raven Press.
- Purpura, D. P. (1969). "The interneuron. Summation." *UCLA Forum Med Sci* 11: 527-42.
- Rasmussen T, Schliemann T, et al, (1996), Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons *Neurobiol Aging* 1996 Jan-Feb;17(1):143-7
- Ridd, M. J., P. Fosbraey, et al. (1998). "The effect of acute kainic acid treatment on mu-opioid receptors in rat brain." *Brain Res* 814(1-2): 26-33.
- Rius, R. A., J. Barg, et al. (1991). "The prenatal development profile of expression of opioid peptides and receptors in the mouse brain." *Brain Res Dev Brain Res* 58(2): 237-41.
- Rocha, L., R. F. Ackermann, et al. (1993). "Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: an autoradiographic study." *Epilepsy Res* 14(3): 195-208.
- Rocha, L., N. T. Maidment, et al. (1994). "Microdialysis reveals changes in extracellular opioid peptide levels in the amygdala induced by amygdaloid kindling stimulation." *Exp Neurol* 126(2): 277-83.
- Rocha, L. L., C. J. Evans, et al. (1997). "Amygdala kindling modifies extracellular opioid peptide content in rat hippocampus measured by microdialysis." *J Neurochem* 68(2): 616-24.
- Rocha, L., M. E. Gonzalez-Trujano, et al. (2000). "Characterization of benzodiazepine receptor binding in immature rat brain after kainic acid administration." *Epilepsia* 41 (Suppl 6): S44-7.
- Rocha, A.L. y N.T. Maidment (2001). "Opioid peptide release in adult rats treated with kainic acid at 24 h and 40 days after *status epilepticus*." en proceso.
- Ruzicka, B. B. y K. Jhamandas (1991). "Met-enkephalin release from slices of the rat striatum and globus pallidus: stimulation by excitatory amino acids." *J Pharmacol Exp Ther* 257 (3): 1025-33.

- Schwob, J. E., T. Fuller, et al. (1980). "Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study." Neuroscience 5 (6): 991-1014.
- Shinozaki, H. y S. Konishi (1970). "Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones." Brain Res 24 (2): 368-71.
- Schwartzkroin, P. and D. McIntyre (1997). Limbic Anatomy and Physiology. Epilepsy: a comprehensive textbook. J. Engel and A. Pedley. Philadelphia, Lippincott-Raven Press: 223-340.
- Sloviter, R. S. (1991). "Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy." Hippocampus 1 (1): 41-66.
- Sloviter, R. S. (1992). "Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats." Neurosci Lett 137(1): 91-6.
- Spain, J. W., B. L. Roth, et al. (1985). "Differential ontogeny of multiple opioid receptors (mu, delta, and kappa)." J Neurosci 5 (3): 584-8.
- Spencer SS, Spencer DD, et al.(1992),"The localizing value of depth electroencephalography in 32 patients with refractory epilepsy". Ann Neurol.;12 (3): 248-53.
- Sperber, E. F., P. K. Stanton, et al. (1992). "Developmental differences in the neurobiology of epileptic brain damage." Epilepsy Res Suppl 9: 67-80.
- Sperk, G., H. Lassmann, et al. (1983). "Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes." Neuroscience 10(4): 1301-15.
- Sperk, G. (1994). "Kainic acid seizures in the rat." Prog Neurobiol 42 (1): 1-32.
- Stafstrom, C. E., J. L. Thompson, et al. (1992). "Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures." Brain Res Dev Brain Res 65 (2): 227-36.
- Swann, J. W., K. L. Smith, et al. (1992). "The ontogeny of hippocampal local circuits and focal epileptogenesis." Epilepsy Res Suppl 9: 115-25.
- Swann, J. W. y S. L. Moshe (1997). Developmental issues in animal models. Epilepsy: A comprehensive textbook. J. Engel and T. A. Petley. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1: 467-479.
- Thai, L., J. S. Hong, et al. (1996). "The regulation of hippocampal dynorphin by neural/neuroendocrine pathways: models for effects of aging on an opioid peptide system." Neuroscience 70 (3): 661-71.
- Tortella, F. C., L. Robles, et al. (1987). "Evidence for mu opioid receptor mediation of enkephalin-induced electroencephalographic seizures." J Pharmacol Exp Ther 240 (2): 571-7.
- Tortella, F. C., E. Echevarria, et al. (1988). "Anticonvulsant effects of mu (DAGO) and delta (DPDPE) enkephalins in rats." Peptides 9 (5): 1177-81.
- Tremblay, E. y Y. Ben-Ari (1984). "Usefulness of parenteral kainic acid as a model of temporal lobe epilepsy." Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin 14 (3): 241-6.
- Ueno, E., D. D. Liu, et al. (1988). "Opiate receptor characteristics in brains from young, mature and aged mice." Neurobiol Aging 9 (3): 279-83.
- Veliskova, J. (1999). Age-related mechanism involved in the control of seizures. In:Childhood epilepsies and brain development. A. Nehlig, J. Motte, S. L. Moshe and P. Plouin, John Libbey and co.ltd: 39-51.
- Vindrola, O., R. Briones, et al. (1981). "Brain content of leu5- and met5-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat." Neurosci Lett 26 (2): 125-30.
- Wasterlain, C. y A. Mazarati (1997). Neuromodulators and second messengers. Epilepsy: a comprehensive textbook. J. Engel and A. Pedley. Philadelphia, Lippincott-Raven Press: 227-287.

- Wolozin B., S., Nishimure et al., (1982) "The binding of κ and δ opiate in the rat brain" J. Neurosci. **2**:708-713.
- Young, A. B. y G. E. Fagg (1990). "Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches." Trends Pharmacol. Sci. **11**(3): 126-33.
- Zieglgansberger, W., E. D. French, et al. (1979). "Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons." Science **205** (4404): 415-7.
- Zukin, R. S., J. R. Sugarman, et al. (1982). "Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity." Brain Res **245** (2): 285-92.