

8
zej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA
EPILEPTOGENESIS CORTICAL PRODUCIDA POR
LA SUSPENSION DE INFUSIONES DE GABA DE
DIFERENTE DURACION

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

JOSE DANIEL ALMEIDA MONTES DE OCA

Ciudad Univesitaria, mayo de 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO

RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
1. LAS EPILEPSIAS	5
1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS	5
1.2. DEFINICION Y CLASIFICACION	7
1.3. LA NEOCORTEZA CEREBRAL	9
1.3.1. COMPOSICION CELULAR, NEUROTRANSMISORES Y LAMINACION NEOCORTICAL	9
1.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA Y MECANISMOS ELECTROFISIOLOGICOS RELACIONADOS	10
1.5. EL ACIDO γ -AMINOBUTIRICO (GABA)	14
1.5.1. RECEPTORES GABAERGICOS	15
1.5.2. METABOLISMO	21
1.5.2.1. SINTESIS. LA DECARBOXILASA DEL ACIDO GLUTAMICO (GAD). 21	
1.5.2.2. CATABOLISMO: LA TRANSAMINASA DEL GABA (GABA-T) ...	23
1.5.3. EL SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA	26
2. OBJETIVO	31

3. METODO GENERAL	32
3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES Y CONTROL	32
3.2. CIRUGIAS	32
3.3. INFUSION	33
3.3.1. REGISTRO EEG Y TIEMPOS DE INFUSION	33
3.4. HISTOLOGIA	35
4. RESULTADOS	36
4.1. TIEMPOS DE INFUSION	36
4.2. EVOLUCION TEMPORAL DEL SAG Y OBSERVACIONES EEG	39
4.3. OBSERVACIONES HISTOLOGICAS	42
5. DISCUSION	50
5.1. RESUMEN DE RESULTADOS.	50
5.2. TIEMPO MINIMO DE INFUSION Y EVOLUCION TEMPORAL DEL SAG. ..	50
5.3. OBSERVACIONES HISTOLOGICAS	52
5.4. CONCENTRACION DE GABA Y VELOCIDAD DE INFUSION PARA GENERAR EL SAG.	53
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	55
7. REFERENCIAS	58

RESUMEN

El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG) constituye un modelo de epilepsia focal inducido por la suspensión de la infusión intracortical de GABA en el cerebro de ratas y monos. En estudios realizados con anterioridad (Brailowsky et al, 1990) y en el laboratorio observamos que la infusión crónica intracortical de GABA con diferentes duraciones (2 horas a 14 días), produce el SAG caracterizado por espigas electroencefalográficas localizadas en el área cortical previamente infundida. Con base en estas observaciones, se propuso determinar los tiempos mínimos de administración del GABA para inducir el SAG a una concentración del aminoácido de $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y a la velocidad de $3\mu\text{l}/\text{hr}$, así como el análisis histológico con tinción de Nissl y GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial) en los sitios cerebrales relacionados con la actividad paroxística. Se ensayaron tres tiempos de infusión del aminoácido: 15, 30 y 60 minutos.

Los resultados obtenidos indican que la infusión intracortical del aminoácido por 30 minutos es suficiente para producir un SAG con características similares de latencia de aparición que el producido por infusiones más prolongadas.

Así mismo, las observaciones histológicas mostraron que el SAG inducido por infusiones de 30 y 60 minutos producen efectos locales a nivel cortical (Tinción de Nissl) y a distancia en los núcleos talámicos reticular y ventrolateral ipsilaterales, demostrados por inmunoreactividad a la proteína GFAP en tales sitios.

Se concluye que el SAG, por su forma de inducción y sus características electroclínicas, constituye un modelo de plasticidad cerebral cuya fisiopatología pudiera relacionarse con procesos caracterizados por hiperexcitabilidad neuronal consecutivos a isquemia o daño cerebral.

INTRODUCCION

1. LAS EPILEPSIAS

1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

En el sistema nervioso central del hombre, los procesos de transmisión y de regulación de la información ya sea química o eléctrica, entre las células nerviosas son muy importantes porque sustentan la función normal cerebral y su alteración origina desajustes en las capacidades psíquicas y motoras del cerebro (Koslow y Silver, 1989; Martín, 1991).

La epilepsia es uno de los padecimientos más antiguos de la humanidad. Hipócrates (400 años aC) señaló que la epilepsia "... no es ni más sagrada, ni más divina y tiene la misma naturaleza que las otras enfermedades, el desconocimiento de ella, hace que se le considere así y tiene su asiento en el cerebro..." (Sec. Salud, 1990).

El conocimiento moderno de la epilepsia comenzó a desarrollarse en el siglo pasado, cuando se realizó por vez primera la distinción entre los ataques locales o parciales y las crisis generalizadas. Hasta ese tiempo los ataques epilépticos se agrupaban en ataques de epilepsia genuina o bien como ataques sintomáticos epiléptiformes (Jasper, 1990).

En 1870, John Hughlings Jackson (Jasper, 1990) introdujo el concepto de ataque focal en la terminología clínica y propuso que las crisis epilépticas eran debidas a "descargas excesivas neuronales hipsincrónicas". Jackson realizó observaciones que señalaban a un area local de la sustancia gris del cerebro como origen de dichas descargas. Tales observaciones lo llevaron a sugerir que las descargas estaban relacionadas con distintas areas de la corteza y no solamente del tallo cerebral, como se pensaba en aquel tiempo.

El punto de vista de Jackson acerca del caracter paroxístico o de excitación neuronal extrema de la epilepsia fue confirmado posteriormente por el registro electroencefalográfico (EEG) de la actividad cerebral (Jasper, 1990).

En 1929 Hans Berger desarrolló el electroencefalógrafo, un instrumento para medir y registrar la actividad eléctrica del cerebro y fue el primero en realizar el EEG

del cerebro humano (Adrian, 1971; Rémond, 1971). La electroencefalografía es una técnica que permite registrar la actividad de conjuntos de neuronas a través de electrodos colocados en el cuero cabelludo o el interior del tejido nervioso (Martin, 1991). Dichos registros corresponden a las oscilaciones eléctricas extracelulares provocadas por la actividad postsináptica de las neuronas que se encuentran cercanas a los electrodos (Martin, 1991; Oakley y Schafer, 1978).

Uno de los signos característicos de la actividad eléctrica anormal lo constituyen las espigas electroencefalográficas (Martin, 1991). En un ataque epiléptico dichas espigas se identifican por su frecuencia y amplitud, en relación a las señales normales registradas en el EEG (Fisher, 1989).

En 1935, Gibbs, Davis y Lennox (Jasper, 1990) realizaron experimentos en los que observaron que era la forma de la espiga EEG la que determinaba el patrón del ataque y en cierta medida la patogénesis del mismo, lo que contribuyó a definir y clasificar a las crisis epilépticas. De igual forma propusieron que las mismas áreas de la corteza cerebral podrían intervenir en diferentes formas o patrones de disritmia que producen diversos tipos de ataques.

A finales de la década de 1950, Jasper y Penfield (Bancaud, 1992) desarrollaron una técnica neuroquirúrgica que posibilitó la estimulación eléctrica de lugares específicos de la corteza cerebral en el humano. El objetivo fue el de producir los síntomas característicos previos a un ataque generalizado (auras), así como otros aspectos de la actividad paroxística, para facilitar la localización exacta del área afectada.

Actualmente existen identificados diversos tipos de trastornos epilépticos que por su sintomatología, etiología, estructuras cerebrales relacionadas y otros criterios de diagnóstico y clasificación se les denomina en conjunto EPILEPSIAS (Brailowsky et al, 1989).

Las epilepsias pueden presentarse como complicación de accidentes infecciosos o tumorales; de alteraciones sistémicas, como el lupus; de desajustes metabólicos, como la hipocalcemia o la hiponatremia o por toxicidad por fármacos o bien por síndromes hereditarios (Brailowsky et al, 1989).

1.2 DEFINICION Y CLASIFICACION

La epilepsia es una afección crónica cerebral, de etiologías diversas, caracterizada por la repetición de crisis resultantes de una descarga excesiva de las neuronas cerebrales independientemente de los síntomas clínicos y paraclínicos eventualmente asociados (OMS, 1973).

En 1989 la Liga Internacional Contra la Epilepsia publica una clasificación en la que se agrupan a las crisis y síndromes epilépticos en dos categorías generales: crisis parciales y generalizadas (Crill, 1991) (Tabla I).

En los ataques generalizados toman parte varias regiones de ambos hemisferios cerebrales en forma simultánea y se manifiestan por la pérdida del conocimiento o conciencia (Dreifuss et al, 1985; Kolb y Tees, 1990; Martin, 1991).

Los ataques parciales o focales se denominan así porque están restringidos únicamente al sitio en donde se originaron, sin embargo, pueden extenderse a zonas adyacentes y desarrollarse en crisis generalizadas (Crill, 1991; Dreifuss et al, 1985; Kolb y Tees, 1990). De acuerdo al área en donde se origine el foco epiléptico sus manifestaciones son motoras (mioclonías) y/o sensoriales (sensaciones visuales, auditivas, olfativas, gustativas o viscerales) (Bradford, 1986; Fisher, 1989).

TABLA I

CLASIFICACION INTERNACIONAL DE LAS EPILEPSIAS *

Parcial

Simple

Motora

Sensitiva

Sensitivo-motora

Autonómica-visceral

Cognitiva

Compleja (Psicomotora)

Con y sin aura

Con y sin automatismo

Secundariamente generalizada

Generalizada

Ausencia (petit mal)

Tónico-clónica (grand mal)

Mioclónica

Tónica

Clónica

Atónica

Sin clasificar

*(Tomado de Fisher, 1989).

1.3 LA NEOCORTEZA CEREBRAL

La epilepsia focal se ha propuesto como una condición de estructuras corticales telencefálicas (Prince y Connors, 1986). En dicha estructura existe una relativa uniformidad en su composición celular y se distinguen diferentes regiones con base en sus características anatómicas (corteza frontal, parietal, temporal y occipital) y funcionales (corteza visual, auditiva, somatosensitiva y motora) (Kolb y Tees, 1990).

1.3.1 COMPOSICION CELULAR, NEUROTRANSMISORES Y LAMINACION NEOCORTICAL.

Anatómicamente, en la neocorteza cerebral se diferencian principalmente dos tipos de neuronas: las piramidales y las no piramidales (Martín, 1991). Ambos tipos celulares se organizan en seis capas o láminas neuronales numeradas secuencialmente desde la superficie próxima de la piamadre a la sustancia blanca que subyace a ella. Dicha disposición es característica de toda la neocorteza, sin embargo el patrón laminar varía en diferentes regiones (Martín, 1991).

Respecto a los neurotransmisores corticales, se han reportado sistemas de transmisión mediados por acetilcolina (ACh), el GABA, el glutamato (Glu), y por neuropéptidos tales como el VIP (Polipéptido Intestinal Vasoactivo), la somatostatina y la proencefalina, entre otros, como sistemas importantes de neurotransmisión en las vías nerviosas corticales (Kolb y Tees, 1990; Krnjevic, 1984).

Las neuronas piramidales tienen cuerpo cónico y están presentes principalmente en las laminas III y V de la neocorteza. Sus dendritas están cubiertas por numerosas espinas en las cuales se reciben aferencias de otras células y cruzan diferente número de capas corticales en forma perpendicular. Sus axones descienden a otras áreas del cerebro, a la médula espinal y a la corteza misma (Kolb y Tees, 1990; Martín, 1991; Peters, 1987).

La ACh y el Glu son dos neurotransmisores contenidos en las células piramidales y distribuidos en todas las láminas de la neocorteza cerebral; sin embargo, la mayoría de este tipo celular contienen al glutamato como neurotransmisor, por lo que se les considera neuronas de tipo excitador principalmente (Kolb y Tees, 1990).

Las neuronas no piramidales mantienen sus ramificaciones dendríticas y axónicas solamente en una o dos capas corticales y contienen principalmente la enzima de síntesis del GABA (decarboxilasa del ácido glutámico), por lo que se les considera neuronas inhibitorias. Este tipo de neuronas también contienen al VIP y a la colecistoquinina como neurotransmisores peptidérgicos y a la ACh como sustancia neurotransmisora (Kolb y Tees, 1990; Kuffler et al, 1984; Martin, 1991; Peters, 1987).

Las células no piramidales están distribuidas ampliamente desde la lámina II a la VI en la corteza cerebral y poseen dendritas finas y espinosas así como axones muy ramificados. Dichas neuronas se clasifican con base en la forma del árbol dendrítico y de los patrones de distribución axonal que presentan en: neuronas estrelladas, neuronas multipolares, neuronas en ramillete, células en canasta, en candelero y bipolares, cuyas dendritas penetran diferentes láminas y alcanzan largas distancias (Kolb y Tees, 1990; Kuffler et al, 1984; Martin, 1991; Peters, 1987).

1.4 MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA Y MECANISMOS ELECTROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS.

La investigación de los mecanismos que están relacionados con el desarrollo de ataques epilépticos, requiere de modelos experimentales que se asemejen al trastorno humano y de los que se obtenga información acerca de los mecanismos celulares y moleculares que sustentan la actividad anormal (Bradford, 1986; Dichter y Ayala, 1987; Fisher, 1989; Rubio-Donnadieu, 1991).

Existe gran variedad de modelos de epilepsia. La Tabla II muestra una de las clasificaciones de los modelos con base en la categoría de ataque que reproducen: modelos de epilepsia generalizada y de epilepsia parcial (Fisher, 1989; Purpura et al, 1972).

De estos dos tipos de modelos de epilepsia, los modelos de actividad epileptógena localizada son frecuentemente utilizados en la investigación porque posibilitan la comparación directa de las propiedades de membrana y de la función

TABLA II. MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA

(Adaptado de Brailowsky, 1990).

A. MODELOS DE ACTIVIDAD EPILEPTOGENA GENERALIZADA.

1. MODELOS GENETICOS: Gallina, ratón (cepa DBA/2, Tottering), ciertas ratas Wistar y Fisher, Mandril senegalés Papio papio.
2. CRISIS INDUCIDAS POR ESTIMULACION ELECTRICA: Electrochoque, Kindling.
3. MODELOS FARMACOLOGICOS.
 - 3.1 AGONISTAS DE LA EXCITACION. Glutamato, Aspartato, Homocisteinato, NMDA*, kainato, Pentilentetrazol, fluorotil, etc.
 - 3.2 AGONISTAS DE LA INHIBICION: THIP**, Muscimol, γ -hidroxibutirato.
 - 3.3 ANTAGONISTAS DE LA INHIBICION GABAERGICA: ailglicina, ácido 3-mercaptopropiónico, bicuculina, picrotoxina, penicilina, β -carbolinas, etc.
 - 3.4 CONVULSIVANTES METABOLICOS: Metionina sulfoximina, ácido-monofluoroacético, deoxiglucosa.
 - 3.5 INHALANTES: fluorotil, tolueno, benzeno.
 - 3.6 CRISIS INDUCIDAS POR PRIVACION: barbitúricos, benzodiazepinas, alcohol, bromuros, etc.

B. MODELOS DE ACTIVIDAD EPILEPTOGENA PARCIAL.

1. Metales convulsivantes: cobalto, tungsteno, fierro, crema de aluminio, etc.
2. Congelación.
3. Estimulación eléctrica focal: kindling.
4. Fármacos aplicados localmente: bicuculina, picrotoxina, penicilina, baclofén, ouabaina, estricnina, kainato, toxina tetánica, estrógenos conjugados, acetilcarnítina, etc.
5. Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG).

C. MODELOS IN VITRO.

1. Tejido epiléptico.
2. Estimulación eléctrica.
3. Manipulación del ambiente iónico: alto potasio, cero magnesio, bajo calcio.
4. Aplicación de Fármacos: bicuculina, picrotoxina, penicilina, 4-aminopiridina, etc.
5. Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG).

*N-metil-D-Aspartato

** 4.5.6.7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c] piridin-3-ol

sináptica en condiciones normales y anormales en el mismo tejido o célula (Brailowsky et al, 1989; Fisher, 1989; Purpura et al, 1972).

De entre los modelos mencionados, el modelo en que se utiliza penicilina como agente epileptógeno es el que más ha contribuido a responder varias de las preguntas acerca de las características neuronales de las descargas epilépticas (Fisher, 1989). En este modelo se observa, a nivel unitario, que al tiempo de aparición de una espiga electroencefalográfica el potencial de reposo de la membrana neuronal se depolariza ampliamente. Esta depolarización paroxística gigante (DPG) ha sido considerada como una marca de la actividad epiléptica y tiene características semejantes a los potenciales postsinápticos excitatorios (PPE), por lo que se le ha considerado como un PPE gigante (Brailowsky et al, 1989; Dichter y Ayala, 1987; Fisher, 1989; Martin, 1991).

De manera similar, el análisis de las respuestas monosinápticas posteriores a la administración iontoforética de penicilina en corteza visual y a la estimulación luminosa ha mostrado que los DPGs resultantes se encuentran inicialmente en la lámina IV; de ahí, la actividad excitatoria se propaga a las capas más superficiales (II y III) y finalmente, la actividad anormal se propaga a las láminas V y VI (Brailowsky et al, 1989; Ebersole y Chatt, 1986).

Los signos EEG de las descargas epilépticas se subdividen en dos periodos: el primero denominado periodo ictal, registrado solamente durante una crisis, se caracteriza por la presencia de espigas asociadas con un DPG; el segundo denominado interictal se presenta entre ataques, en él se puede observar una inhibición de la depolarización sostenida y de la post-hiperpolarización de la crisis. En este periodo la concentración de Ca^{2+} extracelular disminuye y los niveles de K^+ se elevan, debido probablemente a la salida de K^+ y la entrada de Ca^{2+} en el periodo ictal (Crill, 1991). Así mismo, al interior de una crisis generalizada de tipo Gran Mal, se puede distinguir una fase tónica, una clónica y una de depresión post-crítica (Figura 1).

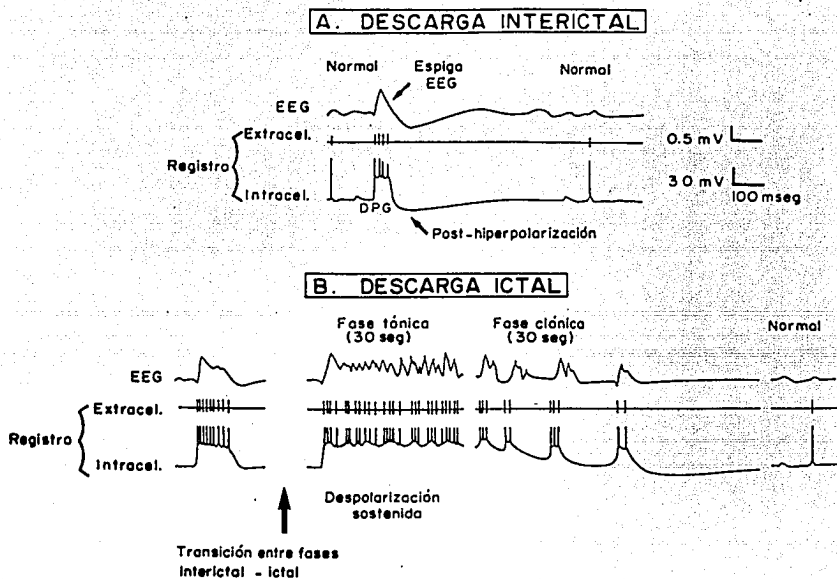


Figura 1. Las descargas interictales se caracterizan por anomalías en el EEG de corta duración, tales como espigas de gran amplitud o espigas punta-onda, en tanto que las descargas ictales son más variadas, pero generalmente consisten de una anomalía rítmica del patrón de ondas EEG. (Modificado de Crill, 1991).

1.5 EL ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA)

Durante la epilepsia el balance normal de la excitación e inhibición está alterado de lo que resulta una condición en la cual la excitación está favorecida (Martin, 1991). Uno de los sistemas de transmisión sináptica predominante en el mantenimiento del equilibrio mencionado, sin que esto quiera decir que no participa ningún otro neuromediador u otros mecanismos, es la transmisión inhibitoria mediada por el GABA (Dichter y Ayala, 1987; Krnjevic, 1991; Tapia, 1991).

El GABA se reconoce actualmente como el neurotransmisor inhibitorio predominante, particularmente en la corteza cerebral (Krnjevic, 1984). En 1957 se obtuvo la primera sugerencia de que el GABA era un neurotransmisor inhibitorio. Bazemore y colaboradores (Krnjevic, 1984) identificaron al GABA como la sustancia endógena o Factor I responsable de la acción inhibitoria de los extractos de tejido nervioso sobre neuronas de langostino. En esta fecha también se realizaron estudios en los cuales se encontró que la aplicación directa del GABA ejercía efectos inhibitorios sobre la actividad eléctrica cerebral y se obtuvo evidencia de que era un compuesto importante que intervenía en el movimiento iónico en las neuronas (Houser et al, 1984).

Fue hasta 1966 cuando se obtuvieron pruebas convincentes del carácter inhibitorio del GABA, al estudiar la placa neuromuscular de crustáceo (Houser et al, 1984; Kuffler et al, 1984). Los experimentos realizados por los grupos de E. Kravitz y de E. Roberts mostraron que las vías metabólicas del GABA son similares en crustáceos y en el cerebro de mamíferos (Kandel, 1991; Kuffler et al, 1984). Ambos grupos demostraron que los efectos de la aplicación postsináptica directa del GABA se comparaba a la inhibición causada por la estimulación de los nervios inhibitorios y se concluyó que el GABA se libera de la terminal presináptica en cantidades proporcionales al número y frecuencia del estímulo que se le aplique y que no es liberado al estimular nervios excitatorios (Houser et al, 1984; Krnjevic, 1991; Kuffler et al, 1984).

Las observaciones hechas en preparaciones inmunohistoquímicas en las que se han utilizado anticuerpos dirigidos contra GAD o GABA ha permitido detallar el análisis de las células gabaérgicas en la neocorteza y establecer que todas las láminas las contienen. El mayor número de neuronas gabaérgicas se encuentran en las

láminas II, III y IV (Kolb y Tees, 1990) y se ha reportado que las concentraciones más altas de receptores GABA_A se localizan en las láminas I y IV así como que los receptores GABA_B (ver abajo) están concentrados en las láminas superficiales I, II y III (Bowery et al, 1990; Kolb y Tees, 1990).

1.5.1 RECEPTORES GABAERGICOS

Las sinápsis inhibitorias pueden operar en dos formas generales: ya sea al reducir la liberación de transmisores excitadores a través de acción presináptica o bien, al disminuir la excitabilidad de células postsinápticas (Krnjevic, 1991). Ambos tipos de efectos inhibitorios son regulados por los receptores GABA_A y GABA_B.

Los receptores GABA_A y GABA_B son proteínas integrales de membrana asociadas a canales iónicos que difieren principalmente en sus propiedades electrofisiológicas, bioquímicas y farmacológicas (Bowery et al, 1990; Kandel, 1991) (Tabla III). El receptor GABA_A unido a su ligando activa directamente canales de cloro (Cl⁻) en tanto que los receptores GABA_B activan indirectamente canales de calcio (Ca²⁺) y/o potasio (K⁺) por activación de proteínas G y tal vez otros mecanismos intracelulares (Bowery et al, 1990; Simmonds, 1987).

Otra diferencia entre los receptores del GABA es la presencia en el receptor tipo A de sitios de unión propios para el GABA y la picrotoxina, así como para compuestos moduladores como las benzodiazepinas y los barbitúricos. En el sitio de reconocimiento para el GABA pueden unirse sustancias agonistas tales como el muscimol, la isoguvacina y el THIP, las cuales activan de manera similar al GABA la apertura del canal de Cl⁻ asociado al receptor (Bowery et al, 1987; Simmonds, 1987). En el caso de sustancias antagonistas del GABA, existen dos tipos de compuestos: "antagonistas competitivos" por el sitio de reconocimiento para el neurotransmisor (tales como la bicuculina y la penicilina) y "no competitivos" tales como el pentilentetrazol y la picrotoxina, la cual posee un sitio de reconocimiento específico en el receptor (Bowery et al, 1987; Simmonds, 1987) (Figura 2).

Tabla III. Principales diferencias entre los receptores GABA_A y GABA_B.
(Tomado de Bowery, 1990).

	GABA _A	GABA _B
<p>1) Consecuencias de la activación del receptor:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En canales - En la adenilato ciclasa 	<p>Apertura del canal de Cl⁻</p> <p>Ningun efecto</p>	<p>-Aumento en la conductancia al K⁺</p> <p>-Disminución en la conductancia al Ca²⁺</p> <p>Activación o inhibición</p>
2) Activación sináptica	Potenciales postsinápticos inhibitorios rápidos	Potenciales postsinápticos inhibitorios lentos
3) Influencia de iones o agentes químicos		
-Dependencia de Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Ninguna	Completa
-Benzodiazepinas	Respuesta funcional y unión al ligando elevadas	Ningún efecto
-Barbitúricos	Respuesta funcional alta	Ningún efecto
4) Agonista selectivo	Isoguvacina	Baclofen
5) Antagonista selectivo	Bicuculina	Saclofen

Respecto a los sitios de reconocimiento para las benzodiazepinas (diazepam y lorazepam) y los barbitúricos (pentobarbital) se conoce que los compuestos que actúan en estos sitios interactúan alostéricamente con el sitio de unión de GABA, es decir, dichos moduladores originan un cambio de conformación en el receptor lo cual produce modificaciones en la afinidad por el GABA y en la capacidad de apertura del canal de Cl⁻ asociado. Las benzodiazepinas incrementan la frecuencia de apertura del canal asociado al receptor, en tanto que la ocupación del sitio para barbitúricos prolonga la duración de apertura del canal de Cl⁻ (Bowery et al, 1987; Bradford, 1986; Enna, 1983; Matsumoto, 1989; Simmonds, 1987).

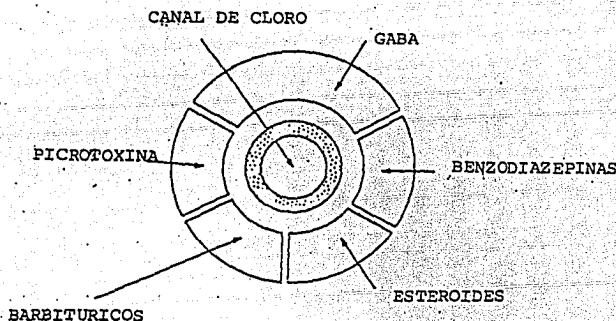


Figura 2. Representación del receptor GABA_A y de los sitios moduladores asociados al mismo.

(Tomado de Olsen, 1991)

Otros compuestos también interactúan específicamente y con una alta afinidad con los receptores GABA_A. Por ejemplo, los esteroides pueden potenciar la captura de Cl⁻ que se encuentra mediada por este receptor en la corteza cerebral (Morrow et al, 1989). Así mismo, el etanol tiene la capacidad de incrementar la corriente entrante de Cl⁻ que propicia el GABA en las neuronas de la corteza cerebral y del ganglio de la raíz dorsal (Aguayo, 1990; Nishio y Narahashi, 1990). Sin embargo, para estos compuestos no se ha podido determinar con exactitud el mecanismo por el que ejercen dichos efectos fisiológicos (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).

Por otro lado, estudios sobre la estructura molecular del receptor GABA_A han permitido identificar varios subtipos de este receptor (Olsen et al, 1991). Inicialmente se describió que este receptor estaba conformado por únicamente dos subunidades polipeptídicas principales (α y β) que formaban una estructura tetramérica (α_2, β_2) la cual rodeaba al canal de Cl⁻ (Barnard et al, 1987; Mamalaki et al, 1987; Schwartz, 1988). Posteriormente se identificaron otras subunidades (γ, δ y ρ) y además diferentes subtipos de cada una de ellas (Lüddens y Wisden, 1991). A pesar de esta diversidad, las subunidades α y β son las necesarias para reconstituir a los canales de Cl⁻ que se activan con el GABA y por lo tanto, para que los receptores GABA_A tengan una actividad completa (Olsen y Tobin, 1990; Knapp et al, 1990; Lolait y col, 1989; Puia et al, 1989).

Con base en la amplia diversidad de subunidades identificadas se propuso que por lo menos 4 o 5 subunidades dan lugar al complejo protéico que constituye al receptor GABA_A. Las diferentes subunidades tienen en común la característica de que pueden ser glicosiladas en los residuos de asparaginas que se encuentran orientados hacia sus extremos amino (NH₂) terminal extracelulares, y contiene 4 regiones hidrofóbicas que cruzan la membrana y que se han reconocido como los dominios M₁, M₂, M₃ y M₄ (Fig. 3).

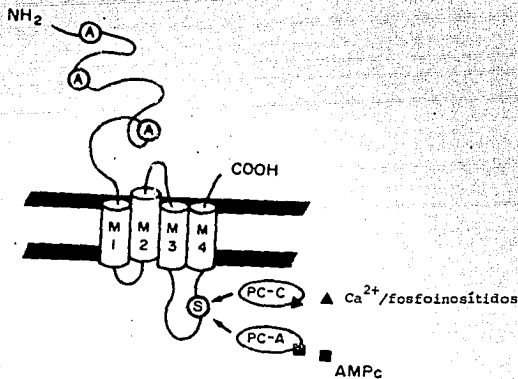
El dominio M₂ participa en la formación del revestimiento del canal de Cl⁻ de este receptor (Barnard et al, 1987; Mohler et al, 1990; Olsen y Tobin, 1990). Por otro lado, sobre cada subunidad se han localizado dos anillos que están orientados hacia el citoplasma (Barnard et al, 1987; Olsen y Tobin, 1990). El anillo principal que conecta a los dominios M₃ y M₄ de la subunidad β contiene algunos residuos de

serina que pueden ser fosforilados por protein-cinasas que son activados por segundos mensajeros como el 3' 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) o el Ca^{2+} /fosfoinosítidos (Browning et al, 1990; Leidenheimer et al, 1991) (Fig. 3).

La fosforilación del receptor GABA_A tiende a regular su actividad ya que a través de este proceso los receptores pueden volverse menos sensibles al GABA (Stelzer et al, 1988; Tehrani et al, 1989). Los subtipos de cada una de las subunidades tienen una semejanza en sus secuencias de aminoácidos de aproximadamente el 70%, mientras que entre cada una de las subunidades se ha identificado una homología del 35 al 40% (Mohler et al, 1990). Además, las variantes de cada una de las subunidades se pueden combinar con variantes diferentes de las otras subunidades para producir, teóricamente, cerca de 10 000 subtipos distintos del receptor GABA_A (Costa 1992).

Los receptores GABA_B no se han logrado caracterizar por completo y hasta ahora únicamente se han podido purificar parcialmente (Ohmori y Kuriyama, 1990,1991). Estos receptores son activados selectivamente por el baclofen y susceptibles a agentes antagonistas como el flaclofen y el saclofen (Bowery et al, 1990).

Los receptores GABA_B al igual que el receptor del GABA tipo A también contienen sitios de glicosilación que se representan en el extremo amino terminal extracelular, así como regiones que son fosforiladas por una o más cinasas citosólicas (Gasic y Holmann, 1991; Kobilka, 1992). Dado que dicha estructura se conserva en los diferentes receptores acoplados a proteínas G se puede suponer que esta conformación probablemente también prevalece en el receptor GABA_B (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).



B

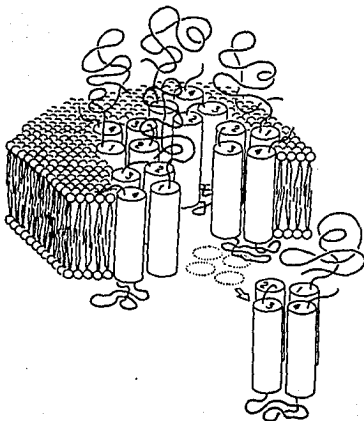


Figura 3. A) Estructura de la subunidad del receptor GABA_A. Los cilindros representan los cuatro dominios transmembranales de la subunidad. Las asparaginas (A) susceptibles de ser glicosiladas que se presentan en el extremo amino terminal (NH₂) se indican dentro de los círculos. En el anillo citoplásmico largo de la subunidad se señala que los residuos de serinas (S) y tirosinas (T) son fosforilados por proteínas cinasas (PC). B) Modelo del complejo proteico que conforma al receptor GABA_A. Se propone que el canal iónico acoplado a este receptor es un oligómero compuesto por 4 o 5 subunidades semejantes a la mostrada en A. (Modificado de Olsen, 1990).

1.5.2 METABOLISMO

1.5.2.1 SINTESIS. LA DECARBOXILASA DEL ACIDO GLUTAMICO (GAD)

La decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es la enzima responsable de la producción del GABA en el cerebro y utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal (FP) para su funcionamiento. Dicha enzima también se localiza, aunque en menor proporción, en órganos como el corazón, el hígado, las células β del páncreas y el riñón (Bradford, 1986; Siegel et al, 1989; Tapia, 1991).

La síntesis del GABA se lleva a cabo a través de una sola reacción en la que se utiliza el glutamato producido por el ciclo de Krebs y en la cual, la GAD remueve el grupo γ -carboxil del glutamato para producir GABA y CO_2 (Figura 4a).

En 1985 Denner y Wu (Martin, 1987) reportan que en el cerebro de rata existen dos formas diferentes de la GAD con base en las observaciones de su desplazamiento en electroforesis: una de las formas está presente como apoenzima (enzima disociada del cofactor) y el segundo tipo de GAD se encuentra como holoenzima (enzima unida al cofactor).

Posteriormente, en 1991, Kaufman y colaboradores reportan la existencia de dos formas de GAD que tienen diferente distribución neuronal e interacciones con su cofactor (Kaufman et al, 1991). Uno de los tipos de GAD es un polipéptido de 65 kd (GAD_{65}) que se presenta en forma saturada y no saturada por el FP en cantidades equivalentes y se encuentra principalmente en las terminales axónicas. El segundo tipo de GAD es un polipéptido de 67 kd (GAD_{67}) que corresponde a la holoenzima independiente del cofactor y se encuentra distribuida ampliamente en la neurona (Kaufman et al, 1991). En ese mismo año, Erlander y colaboradores (Martin y Rimvall, 1993) reportan que las dos formas de GAD son producto de dos genes diferentes y que difieren en la secuencia de aminoácidos que las constituyen, en su expresión en diferentes regiones cerebrales y durante el desarrollo.

Ambos tipos de GAD intervienen en un ciclo de interconversión, en el que toman parte varios compuestos regulatorios probables, entre los que se incluyen al mismo fosfato de piridoxal y al fósforo inorgánico como promotores de la formación de la holoenzima (GAD_{67}) y al ATP, GABA, glutamato y aspartato como compuestos que favorecen la disociación de la holoenzima (Martin, 1987).

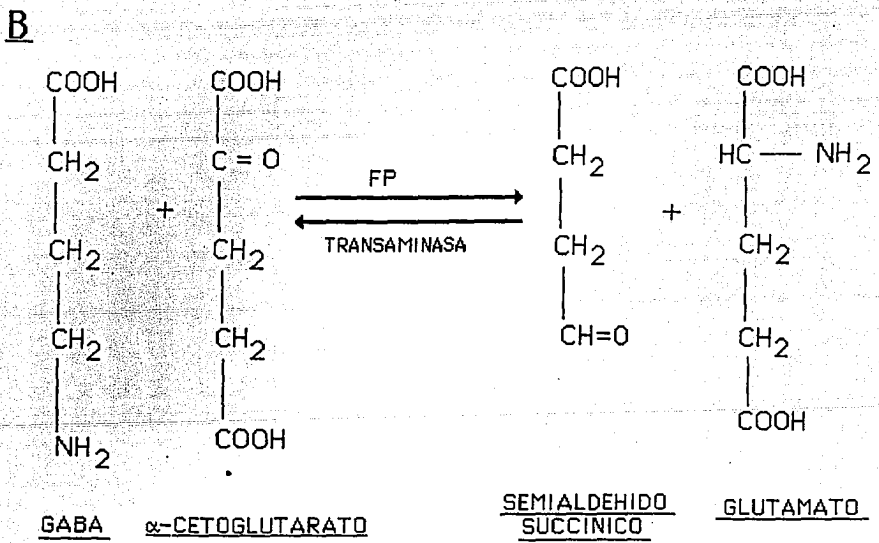
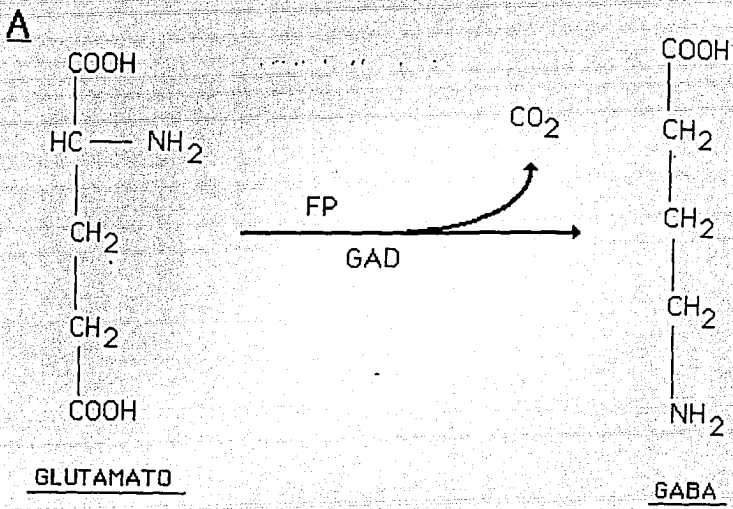


Figura 4. Vías metabólicas de síntesis (A) y degradación (B) del ácido gamma-aminobutírico (Tomado de Tapia, 1991).

La GAD se utiliza como un marcador bioquímico importante para la localización inmunohistológica de células GABAérgicas, lo que posibilita detectar áreas en las que se encuentran ambas formas de la enzima o en las que predomina una de ellas (Kaufman et al, 1991).

1.5.2.2 CATABOLISMO: LA TRANSAMINASA DEL GABA (GABA-T)

El catabolismo del GABA se efectúa por acción de una aminotransferasa mitocondrial, la GABA-T, que utiliza al α -cetoglutarato como sustrato para formar semialdehído succínico y ácido glutámico (Figura 4b). En esta reacción el α -cetoglutarato es el aceptor obligado del grupo amino de la transaminación. Al igual que la GAD, la aminotransferasa requiere del fosfato de piridoxal como cofactor y se diferencia de la descarboxilasa en que la transaminasa se encuentra firmemente unida y saturada por el cofactor (Bradford, 1986; Kuffler et al, 1984; Siegel et al, 1989).

El semialdehído succínico formado a partir del GABA, es rápidamente oxigenado por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSADH) mitocondrial a ácido succínico que se integra al ciclo de Krebs (Bradford, 1986; Kuffler et al, 1984; Siegel et al, 1989).

Las concentraciones normales de GABA en diversas áreas cerebrales generalmente están gobernadas por la actividad de la GAD más que por la actividad de la transaminasa. La distribución de ambas enzimas en las neuronas es homogénea, aunque la GAD está más concentrada en las terminales presinápticas (Roberts, 1987).

El GABA liberado al espacio sináptico es capturado por mecanismos de transporte de alta afinidad de neuronas y/o células gliales donde experimenta transaminación por la GABA-T mitocondrial glial y se forma finalmente glutamina, por acción de la glutamina sintetasa citoplásmica. La glutamina es liberada para ingresar a la terminal presináptica donde es convertida a glutamato por acción de la enzima citoplásmica glutaminasa (Bradford, 1986; Kuffler et al, 1984; Siegel et al, 1989). (Figura 5).

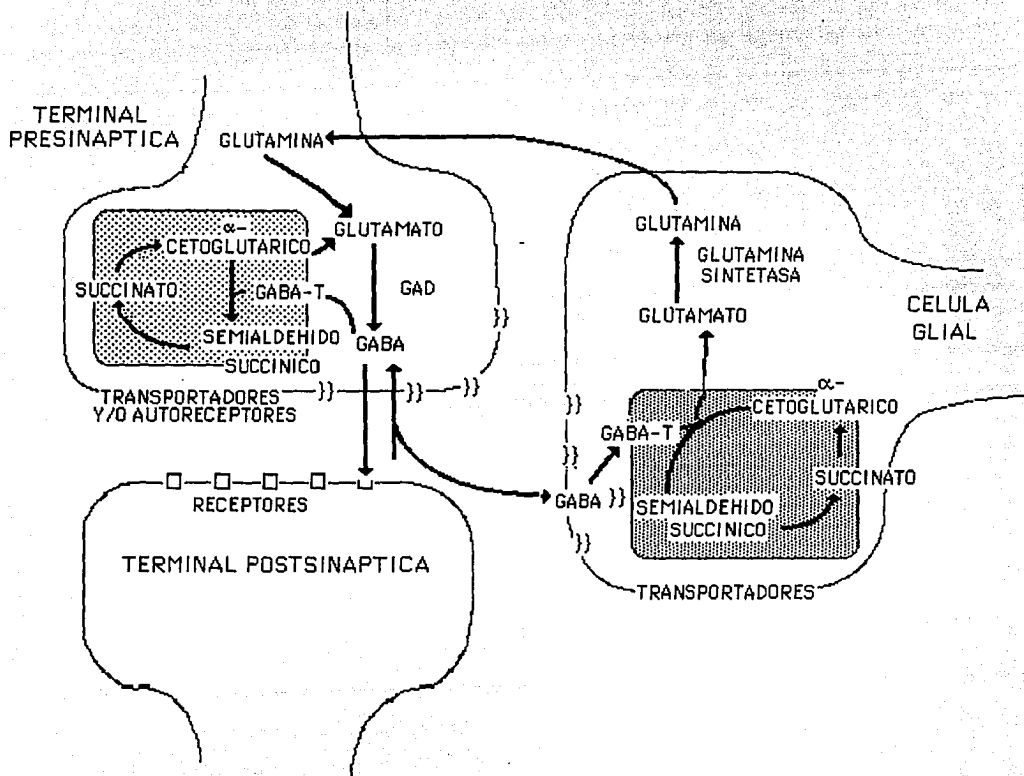


FIGURA 5. Compartimientos metabólicos del GABA en la sinápsis y en las células gliales. (Tomado de Tapia, 1991).

Respecto a los mecanismos de transporte de alta afinidad o recaptura mencionados, se ha reportado que para el GABA existen transportadores que constituyen una familia de proteínas con una diversidad molecular considerable (Guastella et al, 1990). Así mismo, se ha reportado que los neurotransportadores del GABA regulan además el cotransporte de Na^+ y Cl^- y que requieren de la energía suministrada por gradientes electroquímicos para su funcionamiento (Kanner, 1978; Kanner, 1992; Kanner y Bendahan, 1990; Keynan y Kanner, 1988).

En el cerebro de rata existen identificados dos tipos de transportadores para el GABA, cuya diferencia principal es su localización neuronal y glial respectivamente: el transportador tipo GABA_A inhibido principalmente por el ácido carboxílico cis-3-aminociclohexano y el transportador tipo GABA_B inhibido por la β -alanina. (Kanner y Bendahan, 1990; Schousboe et al, 1983).

1.5.3 EL SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA

El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG) se ha propuesto como un modelo experimental de epilepsia focal (Brailowsky et al, 1988) y como un modelo importante de disfunción gabaérgica debido a que se origina en una situación experimental en la cual se aumenta la concentración del GABA en el espacio extracelular (Champagnat et al, 1990).

En 1967, Killam y colaboradores (Brailowsky et al, 1987; Champagnat et al, 1990), reportan un modelo primate de epilepsia: el mandril senegalés Papio papio, en el cual la estimulación luminosa intermitente (ELI) con destellos a una frecuencia vecina a los 25 Hz , induce la aparición de descargas paroxísticas y mioclonías bilaterales con inicio en regiones fronto-rolándicas en ambos hemisferios cerebrales y con extensión eventual a otros territorios .

Con objeto de investigar el papel del GABA a nivel de la corteza fronto-rolándica, se realizaron experimentos, en mandriles fotosensibles y no fotosensibles, en los que se elevó la concentración extracelular del GABA en forma circunscrita en cuatro regiones diferentes de la corteza cerebral: la corteza occipital, la corteza motora, el área premotora y la corteza pre-frontal (Brailowsky et al, 1989).

Los resultados obtenidos mostraron que en animales fotosensibles sólo las infusiones de GABA en la corteza occipital (visual) y en la corteza motora (área 4) tuvieron efectos de bloqueo completo del síndrome fotosensible, en tanto que las infusiones en el área premotora (área 6), mostraron efectos anticonvulsivos parciales y las infusiones en el área prefrontal no tuvieron ningún efecto antiepiléptico (Brailowsky et al, 1989).

Estos experimentos revelaron la aparición de focos de actividad paroxística a nivel de los sitios de infusión en todos los animales (fotosensibles o no), después de haber suspendido el tratamiento con el GABA. La fotosensibilidad comenzó a reaparecer en los animales fotosensibles de 2 a 4 días después del fin del tratamiento con el GABA, de tal manera que coexistían en el mismo animal 2 variedades de epilepsia completamente independientes: una epilepsia generalizada (la fotosensible) con una parcial (Brailowsky et al, 1987, 1988; Champagnat et al, 1990; Silva-Barrat et al, 1988).

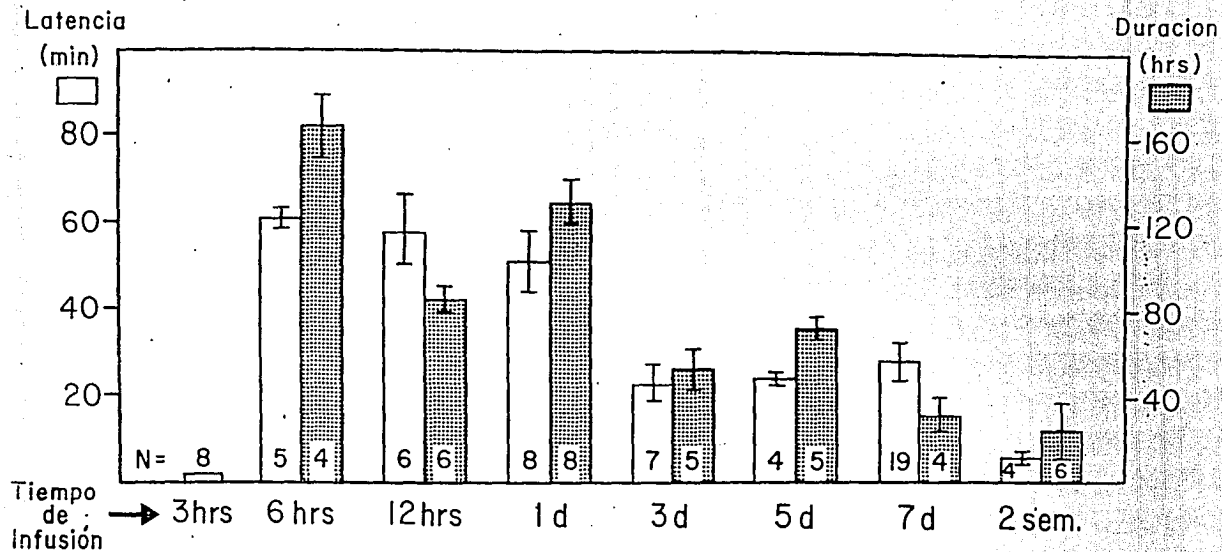
La actividad paroxística focal nunca ocurrió durante la infusión del GABA. Las observaciones realizadas de dicha actividad paroxística mostraba una marcada similitud en las características espaciotemporales de este fenómeno en todas las regiones corticales estudiadas, lo que indica, primero, que la actividad epileptogénica efectivamente se origina en la región infundida y segunda, que la circuiteria básica necesaria para la generación de la actividad paroxística puede estar presente en pequeñas áreas de tejido cortical (Brailowsky et al, 1987, 1988; Champagnat et al, 1990; Silva-Barrat et al, 1988)

Dicho fenómeno de actividad epiléptica parcial recibió el nombre de Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG) ya que corresponde a la definición dada por Nutt : "la abstinencia es un estado de función alterada debido a la suspensión de un tratamiento con alguna droga" (Nutt, 1986; Menini et al, 1992).

El SAG no se relacionó con la predisposición epileptogénica de los mandriles debido a que apareció en territorios corticales que no participan en la fotosensibilidad, además de que se presentó en animales no fotosensibles. El SAG se reprodujo posteriormente en ratas no epilépticas tanto a nivel de la corteza cerebral como del sistema límbico (Brailowsky et al, 1988, 1989; Le Gal La Salle et al, 1988; Champagnat et al, 1990; Menini et al, 1992).

Posteriormente, se inició un estudio en ratas enfocado específicamente a investigar la relación entre el tiempo de infusión del GABA y la latencia y la duración del fenómeno paroxístico. Para ello se realizaron infusiones intracorticales que iban desde tres horas hasta dos semanas, con una dosis de GABA de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, a la velocidad de 1 $\mu\text{l}/\text{hr}$, y se observó que para aquellas infusiones que duraban entre 6 y 24 horas, la latencia de aparición del SAG fue de entre 50 y 60 minutos en promedio, mientras que la duración de las espigas epilépticas fue de entre 90 y 170 horas. En 8 animales en los que se infundió GABA a la misma dosis durante tres horas no se observó ningún SAG. En grupos de ratas en los que se administró GABA durante 3,5,7 y 14 días, la latencia de inicio de la actividad epiléptica fue de entre 10 y 25 minutos, mientras que la duración del SAG fue de entre 10 y 40 horas (Gráfica 1). De esta manera, los resultados indicaron que, bajo las condiciones experimentales mencionadas, era necesario un periodo de infusión del GABA mayor de tres horas y cercano a las 6 horas,

SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA



Gráfica 1. Relación entre tiempo de infusión intracortical del GABA (absisas en horas, días o semanas) la latencia (eje izquierdo indicando minutos) y la duración (eje derecho indicando horas) del SAG. Cada barra indica la media + error estándar y el número de animales.

para la inducción de un SAG. Se observó también que existía una relación inversa entre el tiempo de infusión de GABA y la latencia y la duración del SAG: a tiempos de infusión más cortos correspondía un SAG de latencia y duración largas (Brailowsky et al, 1988).

Más recientemente se observó que el aumento de la velocidad de infusión del GABA a 3 $\mu\text{l/hr}$ y la reducción de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, era suficiente para inducir la aparición de un SAG con sólo dos horas de infusión: se trata de un SAG de inducción más rápida que en estudios anteriores (Brailowsky, 1991).

Las manifestaciones electrográficas del SAG se han clasificado en tres tipos de patrones (figura 6): el patrón I, constituido por actividad en forma de espiga-onda única de 200 a 700 μV de amplitud y a una frecuencia de 0.5 a 3 espigas por segundo; el patrón II, constituido por elementos en forma de espiga-onda seguidos de poliespigas de alta frecuencia. En sus fases iniciales, estos dos patrones pueden acompañarse de mioclonías contralaterales al sitio de infusión. Por último, el patrón III formado por espigas que se propagaron a las áreas homólogas del hemisferio contralateral, en forma de crisis de varios segundos de duración, acompañadas de inmovilidad del animal y, ocasionalmente, de las llamadas "sacudidas de perro mojado" (Brailowsky et al, 1990).

En la mayoría de los casos, el SAG se inicia con el patrón I, el cual predomina durante el desarrollo del SAG y hasta su término, que se anuncia con la desaparición de la actividad electrográfica anormal durante la vigilia aunque sus manifestaciones son observables en la fase de sueño de ondas lentas (Brailowsky et al, 1990).

Por otro lado, en reportes previos se observó, al utilizar la técnica histológica del violeta de cresilo, que las infusiones del GABA producen despoblación neuronal, cercana al foco epileptogénico y en algunos casos, vacuolas en el neuropilo de la región del núcleo ventral lateral talámico ipsilateral al hemisferio epileptogénico (Brailowsky et al, 1988).

Así mismo, al medir el consumo de glucosa cerebral con objeto de conocer las regiones corticales y subcorticales que participan en el SAG, Menini y colaboradores (1991), observaron que las áreas metabólicamente más activas eran las cercanas al foco epiléptico donde todas las láminas corticales se encontraban afectadas. De igual forma, se observó que algunos núcleos talámicos ipsilaterales al foco epiléptico (posterior oral, ventral posterior lateral, central lateral, lateral ventral y reticular) se encontraban metabólicamente más activos que cualquier otra región subcortical del cerebro (Menini et al, 1991).

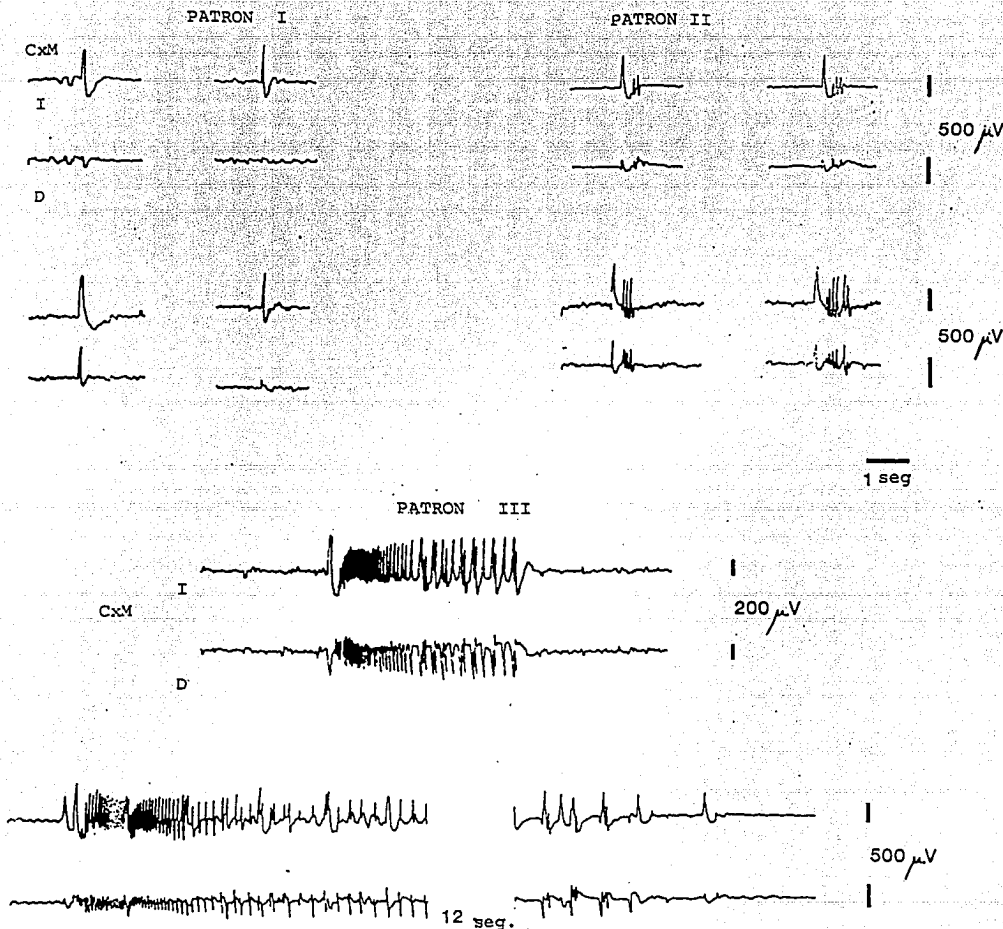


Figura 5. Los tres patrones electroencefalográficos del SAG en rata. En estadios iniciales, las descargas epileptiformes pueden tener una expresión bilateral aunque siempre predominan en el sitio de infusión. CxMI: Corteza Motora Izquierda; CxMD: Corteza Motora Derecha.- (Tomado de Brailowsky, 1990).

2. OBJETIVO

Interesados en el SAG de inducción rápida y en explorar la relación aparente entre los tiempos de infusión del GABA y la latencia de aparición y duración de la actividad epiléptica del SAG, se planteó como un objetivo importante para la caracterización del mismo, determinar los tiempos de infusión mínimos requeridos para producir un SAG a una concentración del aminoácido de $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y a una velocidad de infusión de $3\mu\text{l}/\text{hr}$, así como profundizar en los cambios histológicos a través de la tinción de Nissl e inmunohistológicos de la GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial) de los sitios cerebrales relacionados con la actividad paroxística del SAG producido por los diferentes tiempos evaluados.

La GFAP es uno de los componentes principales de los filamentos que se encuentran específicamente en los astrocitos que la expresan en condiciones de activación debida a procesos inflamatorios y cicatriciales, por lo que es uno de los marcadores de más uso en la identificación de estas células en condiciones normales y patológicas (Haber y Perez-Polo,1987).

3. METODO GENERAL

3.1 GRUPOS EXPERIMENTALES Y CONTROL

Los grupos experimentales se formaron en función del tiempo en que se suspendió la administración de la solución del GABA. Inicialmente, las infusiones se suspendieron a los 60 minutos por ser este el tiempo que corresponde a la mitad del tiempo anterior (2 horas) en que se observó la generación del SAG (Brailowsky et al, 1990).

Los grupos control se formaron con sujetos cuyo tratamiento consistió de la suspensión de infusiones de solución salina a los mismos tiempos que los grupos tratados con GABA.

3.2 CIRUGIAS

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial en el intervalo de 250 a 300 gramos. La cirugía que se practicó a todos los sujetos, bajo anestesia general con halotano y montados en un aparato estereotáxico, consistió en implantar bilateralmente cánulas de infusión de acero inoxidable (10 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno) en la región correspondiente a la corteza motora: -2 mm antero-posterior y 2 mm lateral respecto al punto β formado por las suturas fronto-parietales del cráneo, y a 1.5 mm de profundidad (Paxinos, 1986; Zilles, 1985). Las cánulas de infusión tuvieron también la función de electrodos de registro de la actividad eléctrica de la región de implantación (Figura 7).

Se soldó un conector para registro EEG a los tres electrodos (tornillos de acero inoxidable de 8 mm aproximadamente de longitud) colocados en la superficie del cráneo y a las cánulas de infusión. Posteriormente, se procedió a cubrir los electrodos de registro con acrílico dental y colocar un protector para las cánulas.

Después de la cirugía, los sujetos se mantuvieron separados en cajas de acrílico individuales con libre acceso al agua y comida. Siete días después de implantados se confirmó la ausencia de anomalías electrocorticales por medio de un registro EEG control de 30 minutos.

3.3 INFUSION

La solución de GABA se preparó a la concentración de 50 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$ en solución salina como vehículo (NaCl 0.9%) pH 7.3. Para la infusión de dicha solución se utilizaron microjeringas de 10 μl acopladas a una bomba programable de infusión. A las microjeringas se les colocó un cateter de polietileno con una cánula de inyección de 11 mm de longitud. Cada cánula de inyección se colocó dentro de las cánulas guía de infusión implantadas previamente en el cerebro de los sujetos. La infusión del GABA se llevó a cabo a una velocidad de 3 $\mu\text{l}/\text{hr}$.

Todas las soluciones contenían azul directo (1mg/5ml), colorante que servía para indicar si la inyección intracerebral se había realizado efectivamente. Los animales en que no se observó la marca de dicho colorante no se incluyeron en el estudio.

3.3.1 REGISTRO EEG Y TIEMPOS DE INFUSION

Todos los sujetos se habituaron en cubos individuales de madera y acrílico transparente durante el periodo de tratamiento con GABA y durante los periodos de registro EEG. Dichos registros se obtuvieron de un polígrafo (filtros = 1-300 Hz) para evaluar el efecto electrográfico de la infusión con GABA en corteza cerebral en cada sujeto después de infundido y diariamente hasta la desaparición completa de la actividad paroxística en los casos en que ésta se presentó.

Las infusiones de GABA sujetas a evaluación estuvieron determinadas por la mitad del tiempo anterior que fue suficiente para la aparición del fenómeno paroxístico. El primer tiempo evaluado fue de 60 minutos de infusión. En los casos del tiempo en que se produjo un SAG, se procedió a la evaluación de la suspensión del tratamiento con GABA a la mitad del último tiempo empleado y así sucesivamente hasta encontrar el tiempo en el cual no hubiera evidencias EEG y/o conductuales del SAG.

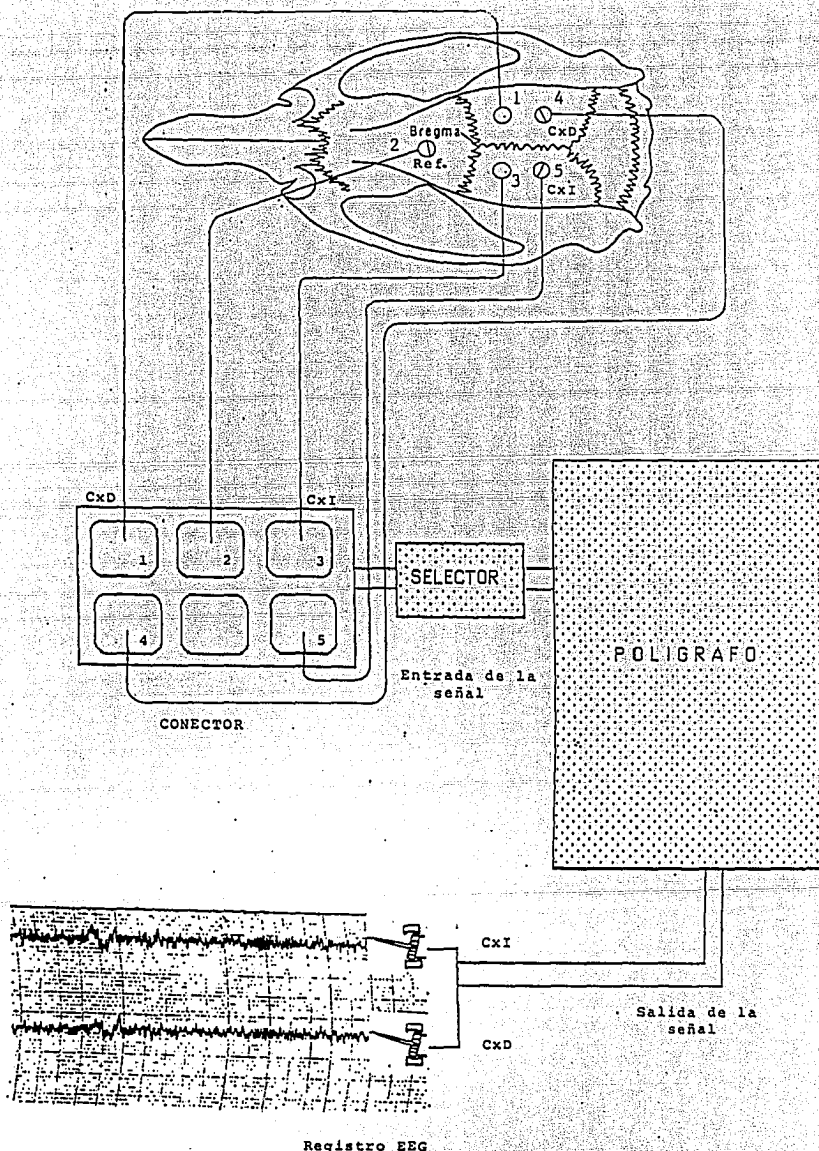


Figura 6. Sitios de implante de electrodos en corteza somatomotora y sistema de registro EEG. Las diferencias de potencial eléctrico en la corteza son registradas por las cánulas de infusión (1 y 3) y por los electrodos de registro (2, 4 y 5) acoplados a un conector y al tablero de entrada del polígrafo. La señal que es filtrada sale del amplificador en el polígrafo y es escrita en papel de registro en movimiento. (Abrev.: Ref.: Referencia; CxD: Corteza Hemisferio Derecho; - CxI: Corteza Hemisferio Izquierdo)

3.4 HISTOLOGIA

En el momento en que los sujetos no mostraron actividad epiléptica alguna se esperaron 10 días para comenzar el estudio histológico de los cerebros. Transcurrido dicho tiempo, los animales fueron anestesiados y después perfundidos por vía cardiaca con ayuda de una bomba peristáltica, primero con 250 ml de solución salina y posteriormente con solución fijadora PLP (solución de amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M pH=7.3, lisina, metaperiodato de sodio y paraformaldehído). Los cerebros se obtuvieron por decapitación del animal y cada cerebro fué entonces sometido a un periodo de post-fijación de 24 horas en el fijador de perfusión.

Posteriormente, se mantuvo el tejido en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1M pH 7.3, con concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30 %) por 24 horas en cada solución. A continuación se realizó el corte del cerebro por congelación en un crióstato, cada corte con un grosor de 40 μ m. Las observaciones de los cerebros que evidenciaban lesiones debajo de la lámina V cortical que no corresponden a las áreas de interés no se incluyeron en el estudio.

Los cortes fueron colectados en dos series independientes. Una serie de cada cerebro se procesó por medio de la tinción de Nissl y en la restante se siguió el protocolo para la técnica inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Hsu et al, 1981), la cual se utiliza para revelar sitios de proliferación de astrocitos que fagocitan restos de neuronas lesionadas (Coyle y Schwarcz, 1983).

4. RESULTADOS

4.1 TIEMPOS DE INFUSION

Los datos obtenidos se resumen en la Tabla IV. Los resultados permitieron formar dos grupos de animales con SAG producido por la suspensión de la infusión del GABA ($50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a dos diferentes tiempos a la velocidad de $3 \mu\text{l}/\text{hora}$: grupo 1 ($n=13$) constituido por sujetos infundidos por 60 minutos; grupo 2 ($n=12$) constituido por sujetos tratados con GABA por 30 minutos, y un tercer grupo ($n=8$) formado por animales que no presentaron el SAG después de la suspensión de la administración del aminoácido por 15 minutos.

En los controles de cada grupo, no se observó en ningún caso la aparición de la actividad paroxística característica del SAG.

La proporción de animales con SAG del grupo 1 fué del 84.61% (11 de 13) y para el grupo 2 fue de 58.33% (7 de 12).

Respecto a los efectos conductuales (mioclonías del miembro contralateral posterior o contracciones ocasionales en algún sitio del cuerpo) no se observó ningún tipo de manifestación o modificación conductual en los sujetos que presentaron actividad epiléptica.

La prueba de X^2 que se aplicó para conocer la similitud entre los tres grupos en términos de proporción de sujetos con SAG, reveló que los grupos 1 y 2 son similares, en tanto que existen diferencias significativas entre los grupos que presentaron actividad epiléptica y el tercer grupo (Tabla V). El análisis de normalidad efectuado entre los grupos 1 y 2 no reveló una distribución normal de los sujetos con SAG.

TABLA IV. Resultados de la suspensión de la administración del GABA
(50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 3 $\mu\text{l}/\text{hr}$) en corteza cerebral a tres diferentes
tiempos: 15, 30 y 60 minutos.

GRUPO	%SUJETOS CON SAG	LATENCIA (minutos)				DURACION (Días)			
		Promedio	Desviación Estandar	Error Estandar	Varianza	Promedio	Desviación Estandar	Error Estandar	Varianza
1 60 min. n=13	84.61%	115.8	23.63	7.12	558.56	3.27	3.06	0.92	9.41
2 30 min n=12	58.33%	99.57	31.27	11.82	977.95	7.0	5.5	2.08	30.33
3 15 min. n=8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla V. Prueba de χ^2 para los grupos 1 y 2 infundidos por 60 min. y 30 min. respectivamente y el grupo 3 que no presentó SAG.

sujeto grupo	CON SAG	SIN SAG
1	11	2
2	7	4
3	0	8

A) χ^2 para los tres grupos experimentales.

$$\chi^2_{\text{exp.}} = 14.780 \text{ (2 grados de libertad)}; \quad p(\chi^2_{\text{exp.}} > \chi^2_{\text{tab.}}) = 0.001$$

B) χ^2 para los grupos 1 y 2

$$\chi^2_{\text{exp.}} = 1.399 \text{ (1 grado de libertad)}; \quad p(\chi^2_{\text{exp.}} > \chi^2_{\text{tab.}}) = 0.239$$

C) χ^2 para los grupos 1 y 3

$$\chi^2_{\text{exp.}} = 14.215 \text{ (1 grado de libertad)}; \quad p(\chi^2_{\text{exp.}} > \chi^2_{\text{tab.}}) = 0.00$$

D) χ^2 para los grupos 2 y 3

$$\chi^2_{\text{exp.}} = 8.061 \text{ (1 grado de libertad)}; \quad p(\chi^2_{\text{exp.}} > \chi^2_{\text{tab.}}) = 0.007$$

4.2 EVOLUCION TEMPORAL DEL SAG Y OBSERVACIONES EEG.

Respecto a los tiempos de aparición del SAG y su duración, el intervalo de latencia de la actividad paroxística del grupo 1 fue de 93 a 163 minutos y su duración de 1 a 11 días, en tanto que el intervalo de latencia del grupo 2 fué de 60 a 155 minutos con una duración de 1 a 15 días.

En los registros EEG de los animales con SAG de los grupos 1 y 2 se observaron los tres tipos de patrones que se han caracterizado para el SAG a otros tiempos de infusión.

En todos los casos el patrón I fue con el que se inició el SAG (100% de los sujetos) el cual fue predominante en todo el transcurso de su actividad (ver figuras 8 y 9: recuadros de latencia).

El patrón II solamente se presentó en 3 casos del grupo 1 (23% de los sujetos; ver figura 8: recuadro SAG + 1 hora) y en 4 casos del grupo 2 (33 % de los sujetos; ver figura 9: recuadro SAG + 2 horas), en el cual en un sujeto predominó este patrón.

El patrón III fue el patrón de descarga que se presentó en cinco casos del grupo 1 (38 % de los sujetos; figura no mostrada) y en tres casos del grupo 2 (25 % de los sujetos; ver figura 9: recuadro SAG + 30 minutos). Dicho patrón solamente se presentó en las primeras horas de manifestación de la actividad epiléptica a excepción de un sujeto del grupo 1 en el que se manifestó hasta el segundo día de actividad del SAG.

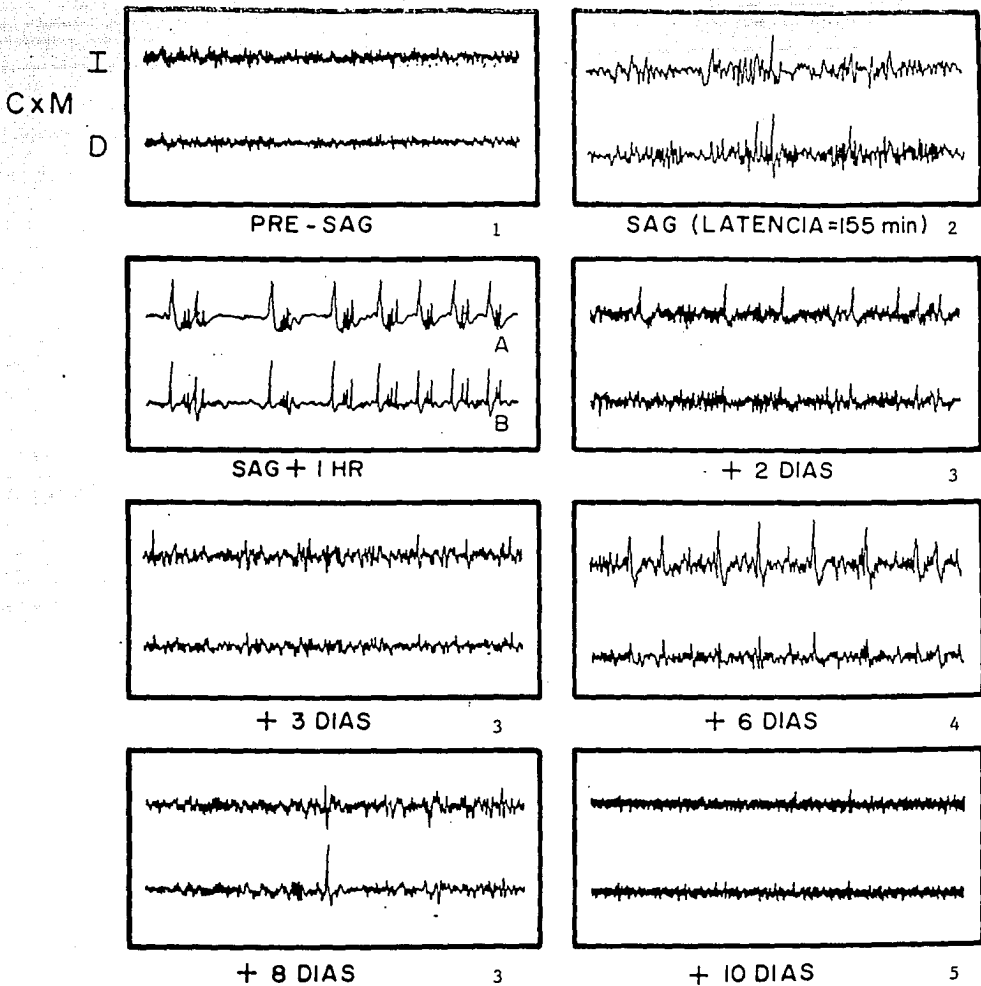
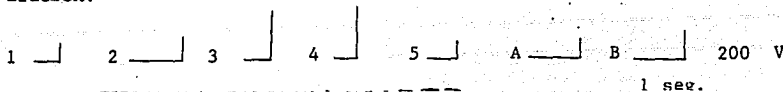


Figura 8 . Registros EEG que ejemplifican los patrones característicos del SAG y la propagación al hemisferio contralateral de la actividad paroxística producida por la suspensión de la infusión unilateral del GABA por 60 minutos, en la corteza motora. Trazos superiores: Corteza Motora Izquierda (CxMI); Trazos inferiores: Corteza Motora Derecha (CxMD). Barras de calibración:



1 seg.

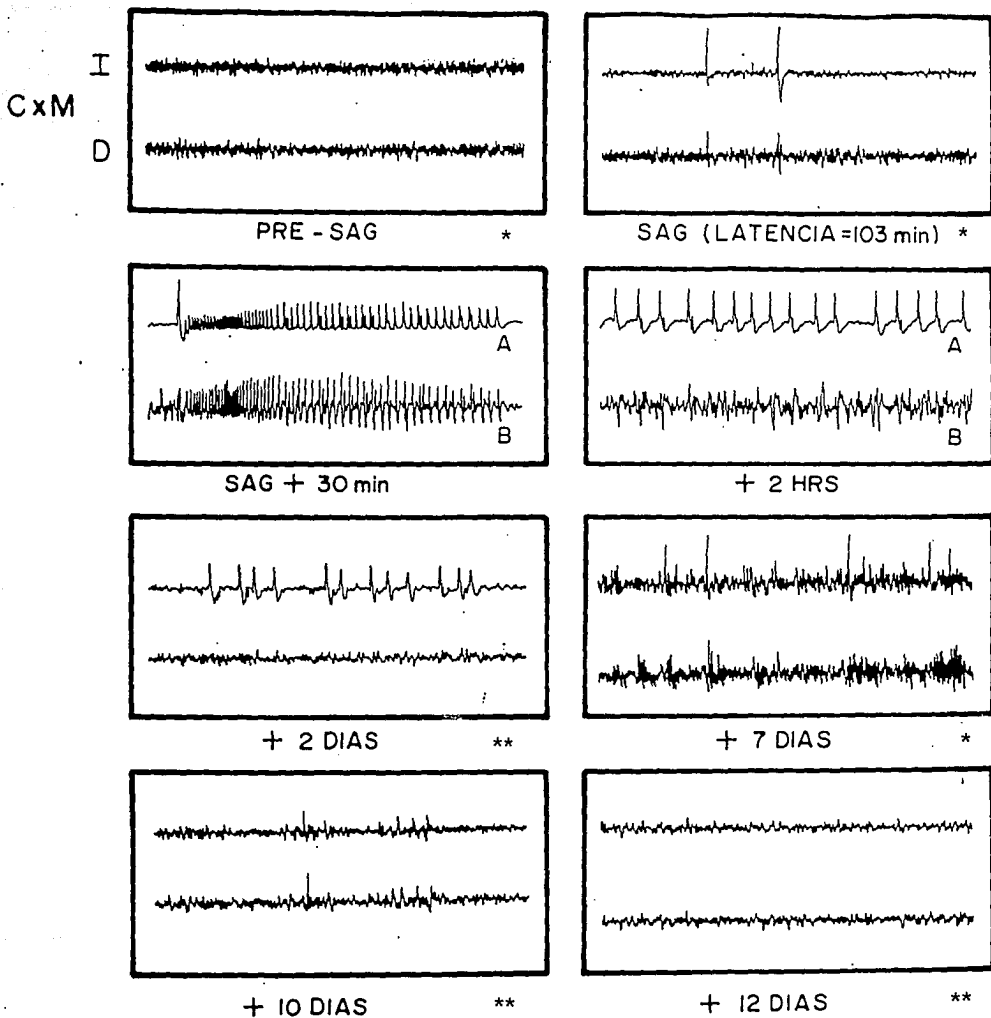


Figura 9. Registros EEG que ejemplifican los patrones característicos del SAG y la propagación al hemisferio contralateral de la actividad paroxística producida por la suspensión de la infusión unilateral del GABA por 30 minutos en la corteza motora. Trazos superiores: Corteza Motora izquierda (CxMI); Trazos inferiores: Corteza Motora Derecha (CxMD). Barras de calibración:

* ** A B 200 V

1 seg.

En las figuras 8 y 9 se muestra que la actividad del SAG en algunos casos se propagó al hemisferio contrario del sitio de infusión. Dicha propagación de la actividad epiléptica en los casos que se manifestó (tres sujetos en cada uno de los grupos 1 y 2) fue de menor amplitud que la actividad del SAG en el hemisferio infundido y desapareció gradualmente (dos días máximo en el grupo 1 y tres días máximo en el grupo 2).

Las gráficas 2A y 2B muestran los valores promedio entre los grupos 1 y 2 respecto a los tiempos de latencia y duración de la manifestación EEG del SAG.

La prueba de U de Mann-Whitney que se aplicó a los parámetros de latencia y duración del SAG para comparar grado de similitud entre los grupos 1 y 2 mostró que ambos grupos no presentan diferencias significativas (Tabla VI). Al respecto y con base en la observación de las diferencias en términos absolutos de la duración de la actividad epiléptica del SAG en ambos grupos, se estudió un grupo adicional infundido por 60 minutos (n=4). Dicho grupo tuvo un promedio en duración del SAG semejante al promedio de duración del grupo 1 inicial, lo que indica que el SAG producido por supresión de infusiones de 60 minutos del GABA tiene una duración menor que el SAG producido a otros tiempos de administración del aminoácido.

4.3 OBSERVACIONES HISTOLOGICAS

El análisis histológico con tinción de Nissl de los cerebros de los animales del grupo 1 y el grupo 2 mostró lesiones producidas por el implante de las cánulas de infusión (Figura 10). La comparación cualitativa de tales lesiones mostró semejanzas en todos los casos: siempre comprendió la corteza somatomotora y las láminas superficiales y medias I a V.

El análisis de inmunoreactividad a la GFAP reveló cambios glióticos alrededor de las lesiones corticales en ambos grupos, así como la aparición de gliosis reactiva en los núcleos talámicos reticular y ventrolateral correspondientes el hemisferio de infusión en todos los cerebros de los grupos 1 y 2 analizados con esta técnica (Figura 11).

En los animales control se observó la aparición de glía reactiva a la GFAP en las regiones corticales relacionadas con el sitio de implante de las cánulas de infusión. Ningún tipo de cambio gliótico se observó en la región talámica de los cerebros de los animales que recibieron solución salina o en aquellos que no presentaron actividad paroxística.

Los astrocitos reactivos revelados por la GFAP y observados a nivel talámico en el tejido cerebral de los animales que forman los grupos 1 y 2, presentaron diferencias cualitativas en términos de intensidad de la tinción: el grupo 1 mostró mayor inmunoreactividad que el grupo 2 en el cual se observaron con menor claridad las zonas inmunoreactivas (Figuras 12 y 13).

Tabla VI. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney aplicada a los grupos 1 y 2 infundidos por 60 min. y 30 min. respectivamente que desarrollaron un SAG.

A) LATENCIA

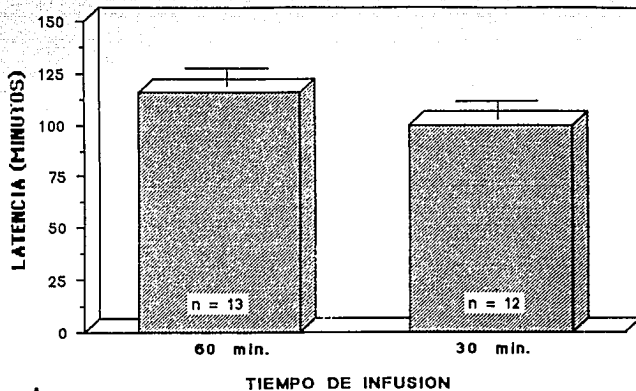
$$\text{Grupos 1 y 2} \quad U = -1.359$$

$$p (/ U_{\text{exp.}} / \geq U_{\text{tab.}}) = 0.1753$$

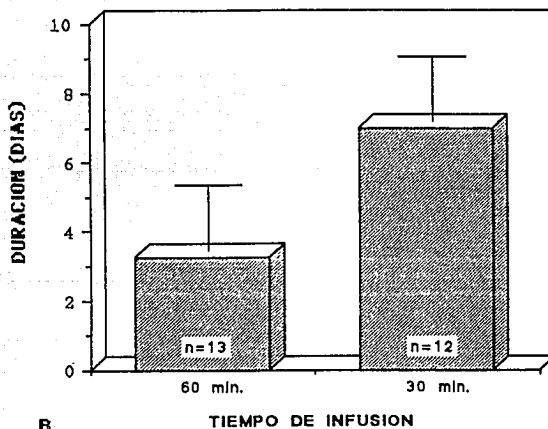
B) DURACION

$$\text{Grupos 1 y 2} \quad U = -1.494$$

$$p (/ U_{\text{exp.}} / \geq U_{\text{tab.}}) = 0.1351$$



A



B

Gráfica 2. Promedios de latencia (A) y duración (B) del SAG de los grupos infundidos con GABA por 60 y 30 minutos respectivamente. Cada barra indica la media \pm el error estándar y el número de animales.



Figura 10. Observación histológica que muestra los sitios de implante de las cánulas de infusión (flechas) y el hemisferio derecho infundido (Tinción de Nissl; aumento 2x).



Figura 11. Apariencia de astrocitos en una sección de cerebro de un sujeto que recibió 60 minutos de infusión de GABA en el hemisferio derecho. Notar la tinción de la GFAP de astrocitos (flechas) cercanos al sitio de implante de la cánula de infusión en corteza cerebral y en las áreas de proyección talámica relacionadas (Aumento 2x).

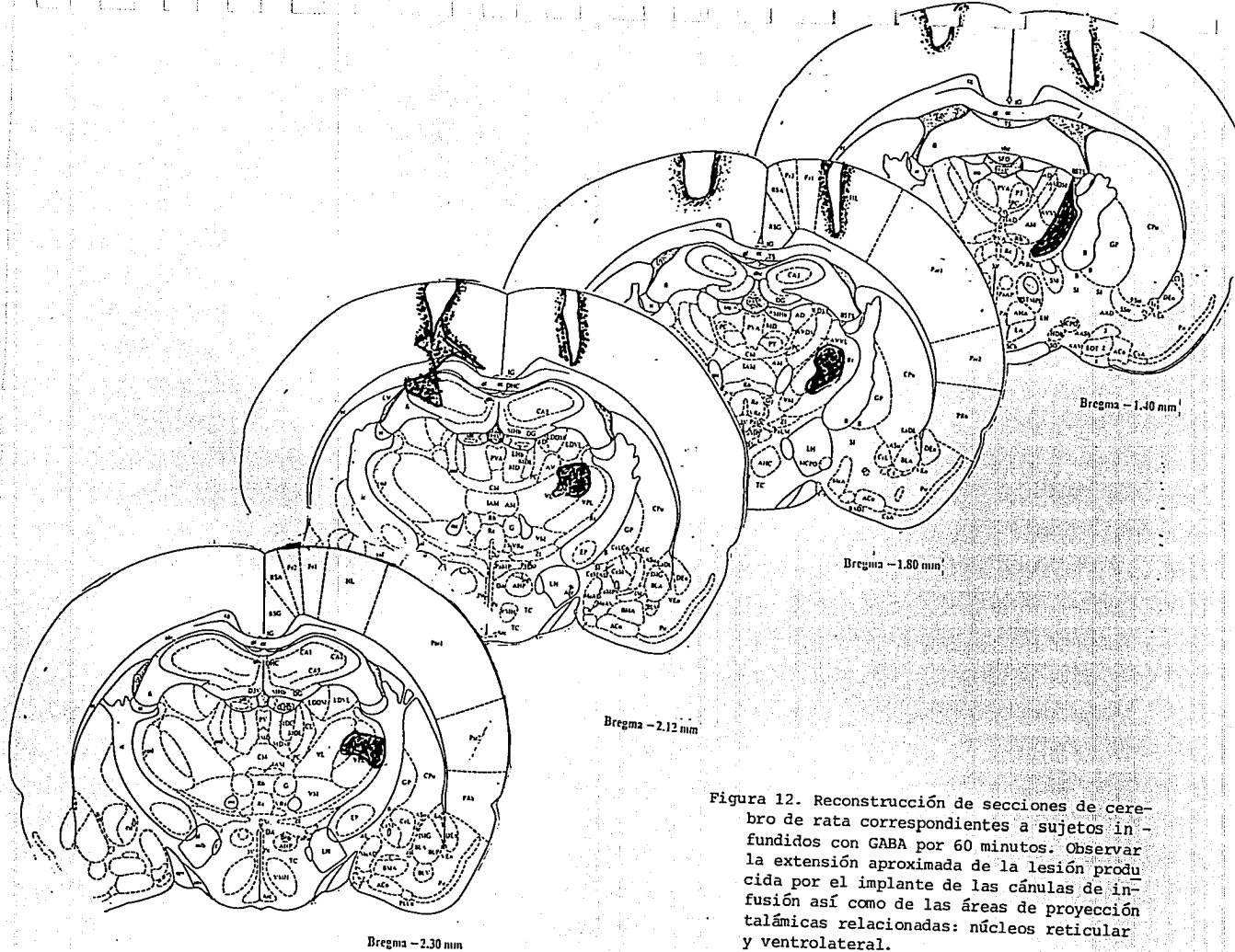


Figura 12. Reconstrucción de secciones de cerebro de rata correspondientes a sujetos in-
fundidos con GABA por 60 minutos. Observar
la extensión aproximada de la lesión produ-
cida por el implante de las cánulas de in-
fusión así como de las áreas de proyección
talámicas relacionadas: núcleos reticular
y ventrolateral.

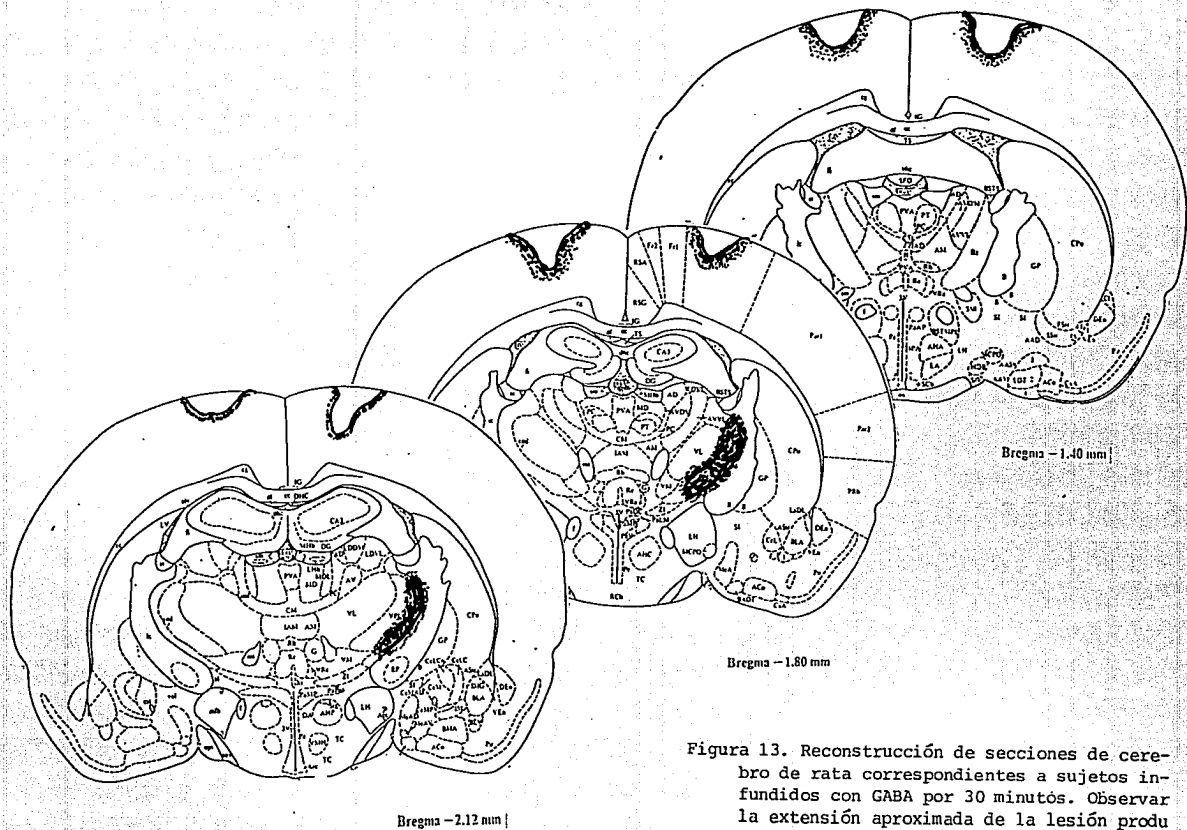


Figura 13. Reconstrucción de secciones de cerebro de rata correspondientes a sujetos infundidos con GABA por 30 minutos. Observar la extensión aproximada de la lesión producida por el implante de las cánulas de infusión así como de las áreas de proyección talámicas relacionadas: Núcleos reticular y ventrolateral.

5. DISCUSION

5.1 RESUMEN DE RESULTADOS.

1) Son suficientes 30 minutos de infusión continua de GABA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a razón de 3 $\mu\text{l}/\text{hr}$ para generar el SAG, mientras que 15 minutos de infusión son insuficientes para producir este efecto.

2) Este SAG presenta latencias y duraciones comparables a los obtenidos con infusiones de GABA más prolongadas.

3) Dicho SAG de inducción rápida produce efectos locales a nivel cortical y a distancia en los núcleos talámicos reticular y ventrolateral ipsilaterales, demostrados por inmunoreactividad a la proteína GFAP en tales sitios.

5.2 TIEMPO MINIMO DE INFUSION Y EVOLUCION TEMPORAL DEL SAG.

El SAG constituye un modelo de epilepsia focal inducido por la infusión intracortical del GABA en el cerebro de ratas y monos (Brailowsky et al, 1990). Champagnat y cols. (1990) observan que los efectos de la infusión prolongada del GABA en corteza cerebral origina la producción de ataques epilépticos focales y que dichos efectos pueden ser extrapolados a los efectos de propagación de la liberación anormal de GABA a través de la corteza cerebral.

Las observaciones electrográficas realizadas en el presente trabajo muestran que el tiempo mínimo de infusión para producir un SAG se encuentra entre 15 y 30 minutos de administración intracortical de GABA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a una velocidad de 3 $\mu\text{l}/\text{hr}$ y que la administración del aminoácido por periodos breves de tiempo, cercanos a los 30 minutos, son suficientes para generar actividad epiléptica en corteza cerebral.

En la introducción se mencionó que en estudios relacionados con el tiempo y la velocidad de infusión del GABA, se observaron diferencias en la latencia de aparición y la duración de la actividad paroxística lo que indicó que con tiempos de infusión cortos, se obtiene un SAG de latencia y duración largas.

Los resultados del presente trabajo apoyan tal hecho. Estadísticamente los grupo 1 y 2 no mostraron diferencias significativas respecto a latencia y duración del SAG, sin embargo, en términos absolutos, la duración de las manifestaciones EEG del SAG del grupo 1 (60 minutos de infusión), mostró tener una duración considerablemente menor que el grupo 2 (30 minutos de infusión).

El porqué de este comportamiento respecto a la duración del SAG es difícil de explicar. Al respecto, podría pensarse que tal modificación funcional es una consecuencia del desequilibrio de los niveles normales del neurotransmisor en el sitio infundido y que las diferencias que se observan en duración del SAG producido por distintos tiempos de infusión del GABA sean un reflejo de los fenómenos plásticos que pueden ocurrir en el cerebro bajo ciertas condiciones.

En el caso del SAG y refiriéndonos específicamente a la variable duración, el grupo "discordante" es el infundido con GABA por 60 minutos. La duración del fenómeno paroxístico de dicho grupo fue comparable al SAG producido por infusiones de 2 horas, a la velocidad y concentración utilizadas en este trabajo, e incluso mayores de 1 día (ver introducción), mientras que la duración del SAG del grupo 2 (infundido por 30 minutos) es similar a la observada previamente en grupos con SAG producido por tratamientos de menos de 24 horas en condiciones diferentes de velocidad y concentración del aminoácido. Se hubiera esperado que la duración del SAG del primer grupo (60 minutos) fuera comparable o intermedio entre los grupos de 120 y 30 minutos .

Al respecto, se podría conjeturar sobre la expresión de un factor local de inhibición que se manifestara alrededor de 60 minutos después del inicio de la infusión con el GABA pero que se inactivara por la presencia continua del aminoácido por tiempos más largos. Esta hipótesis podría someterse a prueba determinando el tipo de proteínas que se expresan a estos tiempos de infusión. Llama la atención, sin embargo, que independientemente de su duración, todos los SAG inducidos eran cualitativamente similares.

Respecto a los patrones caracterizados en el SAG, se han reportado observaciones de la evolución de éstos durante la actividad neuronal anormal (ver introducción). Los resultados obtenidos con infusiones de 30 y 60 minutos mostraron que ocurre lo mismo con el patrón I que a otros tiempos de infusión: el patrón I es el tipo de patrón con el cual se inicia el SAG. A diferencia de otros tiempos, el patrón II puede presentarse durante toda la actividad del SAG e incluso predominar sobre el patrón I. El patrón III se observó también en las primeras horas del SAG e incluso se manifestó al segundo día de la actividad paroxística.

De lo anterior es claro que existen diferencias en la evolución temporal del SAG que es producido por infusiones prolongadas y cortas del GABA. Tales diferencias se manifiestan por una parte, en su duración y por otra, en sus manifestaciones EEG respecto a los patrones característicos del SAG.

5.3 OBSERVACIONES HISTOLOGICAS

Los resultados del análisis histológico con tinción de Nissl de los grupos 1 y 2 mostraron lesiones producidas por el implante de las cánulas a nivel cortical exclusivamente. No se observó otro tipo de modificación histológica en ninguna otra región cerebral.

Lo anterior confirma junto con los registros EEG correspondientes en cada grupo, que la suspensión de infusiones intracorticales del GABA producen actividad epiléptica y que tales lesiones no intervienen en la epileptogénesis observada.

En trabajos anteriores se ha reportado que en ratas, las infusiones crónicas locales del GABA en corteza somatomotora tienen efectos locales y extendidos en la corteza ipsilateral al sitio de infusión, donde el metabolismo de la glucosa disminuye al tiempo de la administración del aminoácido y aumenta durante el SAG, así como efectos a distancia a nivel del tálamo ipsilateral al foco epiléptico cortical, donde el nivel de consumo de glucosa más elevado y la presencia de gliosis visible con la técnica de la GFAP se localiza en los núcleos del grupo ventromedial talámicos (Brailowsky et al, 1988; Menini et al, 1991).

Los resultados del análisis histológico obtenidos con la GFAP de los grupos 1 y 2 mostraron el mismo tipo y localización de la inmunoreactividad glial que las reportadas con anterioridad, lo que confirma, con esta técnica, que existen

proyecciones cortico-talámicas específicas que participan en la actividad paroxística del SAG.

Respecto a tales diferencias es importante señalar que la técnica de marcaje de la GFAP se utilizó en proceso de estandarización en las fases iniciales del trabajo, por lo cual solamente proporcionó, en estas condiciones, información cualitativa de las características inmunohistológicas del tejido cerebral analizado. En estas condiciones, es difícil establecer y/o cuantificar si existen o no diferencias importantes en la aparición de glía reactiva a nivel talámico producida por la actividad epiléptica que se induce por infusiones del GABA de diferente duración.

5.4 CONCENTRACION DE GABA Y VELOCIDAD DE INFUSION PARA GENERAR EL SAG.

Respecto a la velocidad de infusión y la concentración de GABA utilizados en el presente trabajo, es importante resaltar que se realizaron infusiones a una velocidad mayor y a una concentración del aminoácido menor que en trabajos reportados con anterioridad.

Con dichas modificaciones se generó actividad epiléptica semejante a la producida en otros estudios del SAG, en condiciones experimentales diferentes, lo que indica que el tiempo, la velocidad y la concentración son variables experimentales importantes que favorecen en condiciones específicas la sobreexcitación neuronal característica del SAG.

Es interesante observar que con la concentración del GABA de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ administrado a la velocidad de 1 $\mu\text{l}/\text{hr}$ durante 3 horas (ver introducción), no se produce ningún tipo de manifestación epiléptica, lo que pudiera indicar que dichas condiciones de tratamiento no fueron suficientes para activar los mecanismos responsables de la epileptogénesis del SAG.

En el presente trabajo pudiera ocurrir algo semejante. El límite de tiempo para generar el fenómeno de abstinencia está cercano a los 30 minutos de infusión a la velocidad de 3 $\mu\text{l}/\text{hr}$ y a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tal vez si la velocidad de infusión se incrementara fuera posible inducir las condiciones de abstinencia requeridas para que se genere el SAG a tiempos de infusión y/o concentraciones más bajas que las utilizadas aquí.

Respecto a las modificaciones en la concentración del GABA utilizado para producir el SAG, con anterioridad se realizaron observaciones de la desaparición de la actividad epileptiforme del SAG al reiniciar la infusión del GABA con las mismas condiciones de inducción en los animales que presentaban el SAG, y por otro lado, en experimentos en rebanadas cerebrales de animales con actividad epiléptica *in vivo* se observó que los receptores GABA_A eran tolerantes a la isoguvacina (agonista GABAérgico) lo que apoyaba la idea de una disminución en la eficacia del receptor como factor importante en la generación del SAG. Dichos resultados podrían indicar que aunque existiera desensibilización, los receptores restantes siguen siendo susceptibles al agonista, o bien, que las concentraciones usadas que inducen el SAG son supramáximas.

Otra explicación que se ha propuesto para la pérdida de la inhibición en el SAG es la internalización de receptores GABAérgicos. García-Ugalde y cols. (1992) reportan que es posible la inducción del SAG en rebanadas de hipocampo y que en dicha preparación se produce la pérdida de la inhibición en las células piramidales de la región CA₁ y el aumento de la amplitud de la espiga poblacional registrada en dichas células, después de la estimulación de las fibras comisurales colaterales de Schaffer.

El mecanismo probable que se sugiere para explicar tales observaciones es la disminución en el número o afinidad de los receptores al GABA semejante a la internalización de receptores que se observa en cultivo neuronal después de la aplicación continúa de GABA en el medio (Maloteaux et al, 1987; Tehrani y Barnes, 1988).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1) La suspensión de infusiones de GABA en corteza somatomotora por periodos cercanos a los 30 minutos a razón de $3 \mu\text{l/hr}$ y a la concentración de $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ generan actividad electrográfica epileptiforme.

2) La actividad epiléptica generada por la suspensión de infusiones intracorticales del GABA por 60 y 30 minutos producen los mismos patrones EEG que el SAG generado por infusiones de tiempos mayores.

3) La suspensión de infusiones intracorticales breves del GABA generan actividad EEG epileptiforme de larga duración.

4) La epileptogénesis generada por la suspensión de infusiones del GABA intracorticales de 60 y 30 minutos producen despoblación neuronoglia revelada por la GFAP en las áreas más próximas a las cánulas de infusión y la aparición del mismo tipo de actividad glial en zonas talámicas ipsilaterales (núcleos reticular y ventrolateral), que la actividad epiléptica generada por tiempos mayores de infusión.

5) Las manifestaciones EEG anormales producidas por la suspensión de infusiones intracorticales del GABA de diferente duración reflejan cambios plásticos interesantes que pueden ocurrir en el cerebro bajo condiciones de isquemia o de trauma.

En casi todos los modelos animales de epilepsia existe evidencia directa o indirecta de anomalías en la neurotransmisión mediada por el GABA (Horton, 1991). En el SAG, como modelo de epilepsia focal, es clara la intervención del neurotransmisor como factor epileptogénico, por lo cual es un modelo que brinda la oportunidad de estudio a distintos niveles de los mecanismos relacionados con las anomalías en la capacidad inhibitoria del sistema nervioso en tal condición.

Respecto a las observaciones histológicas realizadas con la técnica de $[^{14}\text{C}]$ 2-deoxi-D-glucosa y GFAP ya discutidas, se piensa que las modificaciones a nivel talámico se deben a la liberación de aminoácidos excitadores a partir de terminales córtico-talámicas (Brailowsky, 1991). En otros modelos de epilepsia cortical focal se han descrito lesiones a nivel talámico (Collins y Olney, 1982) semejante a las

observadas en el SAG y se conocen efectos protectores de tales cambios neurodegenerativos por medio de antagonistas del receptor al NMDA (N-metil-D-aspartato), tales como la Ketamina y el MK-801 (Clifford et al, 1989).

Si los cambios glióticos que encontramos en el SAG se producen por efecto de la liberación de aminoácidos excitadores como se propone, sería posible verificar la intervención de dichas terminales en la actividad paroxística del SAG en áreas de proyección córtico-talámica al evaluar, en este modelo, la aplicación de antagonistas como los mencionados.

Por otro lado, con objeto de conocer la manera en que el GABA participa en la actividad epileptógena del SAG, es importante conocer la naturaleza y condiciones fisiopatológicas de las áreas relacionadas con el desajuste. Hay que recordar que el aumento en la concentración extracelular del GABA podría inducir cambios plásticos a tres niveles:

- 1) del receptor, al producir una disminución en el número de receptores o cambios en su afinidad por el GABA;
- 2) en la síntesis del aminoácido, al inducir una reducción de la actividad de la GAD, o bien,
- 3) al generar un aumento de la actividad catabólica de la GABA-T en el ciclo metabólico del neurotransmisor.

Al respecto, dos líneas de investigación serían las de medir las condiciones fisiológicas que predominan en el foco epiléptico y áreas de proyección relacionadas en términos por un lado, de la función de los receptores y por otro, de la actividad principalmente de la GAD.

Al tomar en cuenta los descubrimientos recientes de múltiples tipos de subunidades del receptor GABA_A y de la probable regionalización de combinaciones de subunidades específicas (Twyman y Macdonald, 1991) es importante conocer la cantidad y modificaciones que presenta tal tipo de receptor en las condiciones de sobreexcitación característica del SAG. Para tal efecto, deberán diseñarse experimentos de cuantificación de la unión al receptor GABAérgico a nivel del foco epiléptico como en otras áreas relacionadas.

Como ya se ha mencionado, uno de los mecanismos relacionados con la fisiopatología del SAG y en general con las modificaciones en el sistema GABAérgico en el cerebro epileptogénico, es la alteración en la actividad enzimática de la GAD. Feldblum y colaboradores (1990) realizaron experimentos en los cuales observaron incremento en la producción de RNAm de la GAD en hipocampo, corteza parietal y tálamo del cerebro de ratas con epilepsia de lóbulo temporal. Al respecto, sería importante realizar experimentos para conocer los niveles de la actividad de la GAD en el SAG, tanto para cuantificar los niveles de RNAm de dicha enzima (como por ejemplo, por la técnica denominada Northern blot) en ratas que presenten un SAG inducido por diferentes tiempos de infusión, como para conocer la actividad enzimática de dicha enzima en diferentes estados de la epileptogénesis de la actividad paroxística en el modelo.

7. REFERENCIAS

- Adrian, E. D. (1971). The discovery of Berger. En: W.A.Cobb eds., Appraisal and perspective of the functional exploration of the nervous system Vol. 1, Ed. Elsevier, Paris, Francia, pp. 1A5-1A24.
- Aguayo, L.G. (1990). Ethanol potentiates the GABA_A-activated Cl⁻ current in mouse hippocampal and cortical neurons. Eur. J. Pharmacol, 187, pp.127-130.
- Bancaud, J. y Talairach, J. (1992). Clinical Semiology of Frontal Lobe Seizures. En: A. V. Delgado-Escueta, Chauvel P., Halgren E. y Bancaud J. eds., Frontal lobe seizures and epilepsies Vol. 57, Ed. Raven Press, New York, U.S.A., pp. 3-58.
- Barnard, E.A., Darlison M.G. y Seeburg, P. (1987). Molecular biology of the GABA_A receptor: the receptor/channel superfamily. Trends Neurosci., 10, pp.502-509.
- Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C. y Florey, E. (1957), Isolation of Factor I. J. Neurochem., 1, pp.334-339.
- Bowery, N. G., Hudson, A. L., y Price, G. W. (1987). GABA_A and GABA_B receptor site distribution on the rat central nervous system. Neuroscience, 20(2), pp 365-383.
- Bowery, N.G. (1990). GABA transporter protein cloned from rat brain. Trends Pharmacol. Sci, 11, pp. 435-437.
- Bowery, N. G., Pratt, G. D., y Knott, C. (1990). GABA_B Receptors: Past, Present and Future. En: S. J. Enna eds., GABA_B Receptors in Mammalian Function. Ed. John Wiley y Sons Ltd., New York, U.S.A., pp. 1-23.
- Bradford, H. F. (1986), Chemical neurobiology: an introduction to neurochemistry. Ed. W.H. Freeman, Co., New York, U.S.A., pp. 442-443; 470-477
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C., y Naquet, R. (1987). Epileptogenic gamma-aminobutyric acid withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. Neuroscience letters, 74, pp. 75-80.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D., y Naquet, R. (1988). The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. Brain Research, 442, pp. 175-179.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Menini, C., Riche, D., y Naquet, R. (1989). Effects of localized, chronic GABA infusion into different cortical areas of the photosensitive baboon Papio papio. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 72, pp.147-156.

- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., y Naquet, R. (1989). Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. Salud Mental, 12(1), pp. 53-62.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C., y Naquet, R. (1990). An electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in the rat. Epilepsia, 31, pp. 369-377.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Ménini, C., Riche, D., y Naquet, R. (1990). Anticonvulsant Effects of Intracortical Chronic Infusion of GABA in Generalized Epilepsy. En: M. Avoli, P. Gloor, G. Kostopoulos, y R. Naquet eds., Generalized Epilepsy. Neurobiological Approaches. Ed. Birkhäuser, Inc., Boston, U.S.A., pp. 126-136.
- Brailowsky, S. (1991). El Síndrome de Abstinencia a GABA: un modelo de epileptogénesis focal. En: S. Brailowsky y E. Otero-Siliceo eds., Epilepsia Experimental Vol. 2, Ed. Academia Mexicana de Neurología, A.C. y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C., México, D.F., pp. 121-129.
- Browning, M.D., Bureau, M. Dudek, E.M. y Olsen, R.W., (1990). Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase phosphorylate the β subunit of the purified γ -aminobutyric acid A receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 87, pp. 1315-1318.
- Champagnat, J., Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., y Menini, C. (1990). Possible epileptogenic consequences of misused GABAergic relationships. En: M. Avoli, P. Gloor, G. Kostopoulos, y R. Naquet eds., Generalized Epilepsy. Neurobiological Approaches. Ed. Birkhäuser, Inc., Boston, U.S.A., pp. 118-125.
- Clifford, D.B., Zorumski C.F. y Olney, J. W. (1989), Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures, Exp. Neurol, 105, 272-279.
- Collins, R.C. y Olney, J.W. (1982). Focal Cortical Seizures cause distant thalamic lesions. Science, 218, pp177-179.
- Coyle, J.T. y Schwarcz, R. (1983). The Use of Excitatory Amino Acids as Selective Neurotoxins. En: A. Björklund y T. Hökfelt eds., Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 1, Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 508-527.
- Crill, W. E. (1991). Neurophysiologic basis of convulsive disorders. En: G. Tunnickliff y B. U. Raess eds., GABA mechanisms in epilepsy. Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, U.S.A., pp. 31-46.
- Dichter, M. A., y Ayala, G. F. (1987). Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. Science, 237, pp.157-164.

- Dreifuss, F. E., Martinez Lage, M., Roger, J., Seino, M., Wolf, P., y Dam, M. (1985). Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia, 26(3), pp. 268-278.
- Ebersole, J. S. y A. B. Chatt (1986). Spread And Arrest of Seizures: the importance of layer 4 in laminar interactions during neocortical epileptogenesis. En: Delgado-Escueta, A.V., Ward A.A. Jr, Woodbury D.M. y Porter R.J. eds., Basic Mechanisms of the Epilepsies: Molecular and Cellular Approaches Vol. 44, Ed. Raven Press, New York, pp. 515-558.
- Enna, S. J. (1983). The GABA Receptors. En: S. J. Enna eds., The GABA Receptors Ed. The Humana Press, New Jersey, pp. 1-23.
- Feldblum, S., R.F. Ackermann y Tobin, A.J., (1990), Long-Term Increase of Glutamate Decarboxylase mRNA in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy, Neuron, 5, pp. 361-371.
- Fisher, R. S. (1989). Animal models of epilepsies. Brain Research Reviews, 14, pp. 245-278.
- García-Ugalde, G., Galarraga, E., Bargas, J. y Brailowsky, K. (1992). Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. Neurosci. Lett., 147, pp. 229-232.
- García-Ugalde, G. y Brailowsky, K. (1993). Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. Ciencia, 44 (2). En prensa.
- Gasic, G.P. y Hollmann, M. (1992). Molecular Neurobiology of Glutamate receptors, Annu. Rev. Physiol., 54, pp. 507-536.
- Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., y Czyzyk, L. (1990). Cloning and Expression of a Rat Brain GABA transporter. Science, 249, pp.1303-1306.
- Haber, B. y Perez-Polo, J. R., (1987), Glial Cells, Astrocytes. En: G. Adelman ed., Encyclopedia of Neuroscience, Vol. 1, Ed. Birkhäuser Inc., Boston, U.S.A., pp. 463-464.
- Horton, R. W. (1991). GABA dysfunction in animal models of epilepsy. En: G. Tunnicliff y B. U. Raess eds., GABA mechanisms in epilepsy, Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, U.S.A., pp. 121-147.
- Houser, C. R., Vaughn, J. E., Hendry, S. H. C., Jones, E. G., y A.Peters (1984). GABA Neurons in the Cerebral Cortex. En: E.G. Jones y A. Peters eds., Functional properties of Cortical Cells Vol. 2, Ed. Plenum Press, New York, U.S.A., pp. 63-89.

- Hsu, S.M., Raine, L. y Fanger H. (1981). Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29, (4), pp. 577-580.
- Jasper, H. H. (1990). Historical Introduction. En: M. Avoli, P. Gloor, G. Kostopoulos, y R. Naquet eds., Generalized Epilepsy. Neurobiological Approaches. Ed. Birkhäuser, Inc., Boston, U.S.A., pp. 1-15.
- Kandel, E.R., y J. H. Schwartz (1991), Directed gated transmission at central nervous synapses. En: E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell eds., Principles of neural science. Ed. Elsevier, New York, pp. 153-172.
- Kanner, B.I. (1978). Active Transport of gamma-aminobutyric acid membrane vesicles isolated from rat brain. Biochemistry, 17 (7). pp. 49-50.
- Kanner, I.B. y Bendahan, A. (1990) Two pharmacologically distinct sodium- and chloride-coupled high-affinity γ -aminobutyric acid transporters are present in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, pp.2550-2554.
- Kanner, B.I. (1992). The GABA_A Transporter. Neuroscience Facts, 3, pp. 49-50.
- Kaufman, D. L., Houser, C. R., y Tobin, A. (1991). Two forms of the γ -aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. Journal of Neurochemistry, 56(2), pp. 720-723.
- Keynan, S., y Kanner, B. I. (1988). γ -Aminobutyric Acid transport in reconstituted preparations from rat brain: coupled sodium and chloride fluxes. Biochemistry, 27, pp. 12-17.
- Knapp, R.J., Malatynska, E. y Yamamura H.I. (1990). From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. Neurochem. Res., 15 (2), pp. 105-112.
- Kobilka, B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. Annu. Rev. Neurosci., 15, pp. 87-114.
- Kolb, B., y Tees, R. C. (1990), The cerebral cortex of the rat. Ed. Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, U.S.A., pp. 3-17; 77-112; 129-131.
- Koslow, S. H., y Silver, L. B. (1989). Neurotransmission: Biological and pharmacological Aspects. En: Koslow, S. H., y Silver, L. B. eds. The Neuroscience of Mental Health. Ed. U.S. Department of Health and Human Services, Maryland, U.S.A., pp. 23-45.
- Krnjevic, K. (1984). Neurotransmitters in Cerebral Cortex: A General Account. En: E.G. Jones y A. Peters eds., Functional properties of Cortical Cells, Vol. 2, Ed. Plenum Press, New York, U.S.A., pp. 39-61.

- Krnjevic, K. (1991). Significance of GABA in brain function. En: G. Tunnicliff y B. U. Raess eds., GABA mechanisms in epilepsy, Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, U.S.A., pp. 47-88.
- Kuffler, S. W., Nicholls, J. G., y Martin, A. R. (1984), From neuron to brain 2a. ed. Massachusetts, Ed. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., pp. 298-309
- Le Gal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, Ch. y Naquet, R. (1988). Local Asymptomatic Status Epilepticus Induced by Whithdrawal of GABA infusion into Limbic Structures. Experimental Neurology, 101, pp. 411-417.
- Leidenheimer, N.J., Browning M.D. y Harris, R.A. (1991). GABAA receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. Trends Pharmacol. Sci., 12, pp. 84-87.
- Lolait, S.J., O'Carrol, A-M., Kusano, K. y Mahan, L.C. (1989). Pharmacological characterization and region-specific expression in brain of the β 2- and β 3-subunits of the rat GABA_A receptor. FEBS Lett., 258, pp. 17-21.
- Lüddens, H. Y Wisden, W. (1991). Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. Trends Pharmacol. Sci., 12, pp. 49-51.
- Maloteaux, J.M., Octave, J.N., Goussuin, A., Laterre, C., y Trouet, A. (1987). GABA induces down-regulation of the benzodiazepine-GABA receptor complex in the rat cultured neurons. European Journal Pharmacology, 144, pp.173-183.
- Mamalaki, C., Stephenson, F.A. y Barnard E.A. (1987). The GABA_A/benzodiazepine receptotr is a heterotetramer of homologous α and β subunits. EMBO. J., 6, pp. 561-565.
- Martin, D. L. (1987). Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase. Cellular and molecular neurobiology, 7(3), pp. 237-253.
- Martin, J. H. (1991). The collective electrical behavior of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanisms of epilepsy. En: E. R. Kandel, J. H. Schwartz, y T. M. Jessell eds., Principles of Neural Science, Ed. Elsevier, New York, U.S.A., pp. 777-791.
- Martin, D.L. y Rimvall, M. K. (1993). Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. J. Neurochem., 60(2), pp. 395-407.
- Matsumoto, R. R. (1989). GABA receptors: are cellular differences reflected in function? Brain Reserch Review, 14, pp. 203-225.
- Menini, C., Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Riche, D., y Naquet, R. (1992). Cortical GABAergic Control of Epilepsy in Photosensitive Baboons. En: P. Chauvel, A. V.

Delgado-Escueta, E. Halgren, y J. Bancaud eds., Frontal Lobe Seizures and Epilepsies Vol. 57, Ed. Raven Press Ltd., New York, U.S.A., pp. 571-578.

Menini, C., Mraovitch, S., Calando, Y., De la Sayette, V., Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., y Seylaz, J. (1991). Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat. Neuroscience, 41, pp. 607-615.

Mohler, H., Malherbe, P., Draguhn, A. y Richards, J.G. (1990). GABA_A-receptors: structural requirements and sites of gene expression in mammalian brain. Neurochem. Res., 15, pp.199-207.

Morrow, A.L., Pace, J.R., Purdy, R.H. y Paul, S.M. (1989). Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. Mol. Pharmacol., 37, pp.263-270.

Nishio, M. y Narahashi, T. (1990). Ethanol enhancement of GABA-activated chloride current in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Res., 518, pp.283-286.

Nutt, D. (1986). Benzodiazepine dependence in the clinic: reason for anxiety? TIPS, 9: pp. 457-460.

Oakley, B., y Schafer, R. (1978), Experimental neurobiology: a laboratory manual. Ed. The University of Michigan Press, Michigan, U.S.A., pp. 256-260.

Ohmori, Y. y K. Kuriyama. (1990). Solubilization and partial purification of GABA_B receptor from bovine brain. Biochem. Biophys. Res Comm., 172, pp. 22-27.

Ohmori, Y. y K. Kuriyama. (1991). Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA_B receptor. Neurochem. Res., 16, pp. 357-362.

Olney, J. W., Ho, O. L., y Rhee, V. (1971). Cytotoxic effects of acid and sulfur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system. Experimental Brain Research, 14, pp. 61-76.

Olsen, R.W. y Tobin, A.J. (1990). Molecular biology of GABA_A receptors, FASEB J., 4, pp. 1469-1480.

Olsen, R.W., Bureau, M.H., Endo, S. y G. Smith. (1991). The GABA_A receptor family in the mammalian brain. Neurochem. Res., 16, pp. 317-325.

Organización Mundial de la Salud (1973) Dictionnaire de l'épilepsie. Parte 1, Ed. OMS, Ginebra, Suiza, pp. 11-78.

Paxinos, G. y C. W. (1986), The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Ed. Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, Cal., U.S.A., pp. 130.

- Peters, A. (1987). Cortical neurons. En: G. Adelman eds., Encyclopedia of Neuroscience Vol. 1, Ed. Raven Press, New York, pp. 282-284.
- Prince, D. A., y B. W. Connors. (1986). Mechanisms of Interictal Epileptogenesis. En: eds., Basic Mechanisms of the Epilepsies Vol. 44, Ed. Raven Press, New York, pp. 275-299.
- Puía, G., Santi, M.R., Vicini, S., Pritchett, D.B. Seeburg, P.H. y Costa, E. (1989). Differences in the negative allosteric modulation of γ -aminobutyric acid receptors elicited by 4'-chlorodiazepam and by a β -carboline-3-carboxylate ester: a study with natural and reconstituted receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, pp.7275-7279.
- Purpura, D. P., Penry, J. K., Tower, D., Woodbury, D. M., y Walter, R. (1972), Experimental Models of Epilepsy. Ed. Raven Press, Publishers, New York, U.S.A., pp. 51-83.
- Rémond, A. (1971), Handbook of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. Ed. Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp. 1A-5 - 1A-38.
- Roberts, E. (1987). Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). En: G. Adelman eds., Encyclopedia of Neuroscience Vol. 1, Ed. Birkhauser, Boston, U.S.A., pp. 441-444.
- Rubio-Donnadieu, F. (1991). Aplicabilidad de modelos experimentales de epilepsia a la clínica. En: E. Otero-Siliceo y S. Brailowsky eds., Epilepsia Experimental Vol. 2, Ed. Academia Mexicana de Neurología, A.C. y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C., México, D.F., pp. 17-26.
- Secretaría de Salud (1990), Conceptos de Epilepsia. Ed. Secretaría de Salud, México, pp. 1-15
- Schousboe, A., Larson, O. M., Woos, J. D., y Krosggaard-Larsen, P. (1983). Transport and Metabolism of γ -Aminobutyric Acid in Neurons and Glia: Implications for Epilepsy. Epilepsia, 24, pp. 531-538.
- Schwartz, R. D. (1988). The GABA_A receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function. Biochem. Pharmacol., 37, (18), pp. 3369-3375.
- Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R. W., y Molinoff, P. Eds. (1989). Basich Neurochemistry, 4a. ed., Ed. Raven Press, New York, U.S.A. pp. 312-320.
- Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., Riche, D., y Menini, C. (1988). Anticonvulsant effects of localized chronic infusions of GABA in cortical and reticular structures in baboons. Experimental Neurology, 101, pp. 418-427.
- Simmonds, M. A. (1987). GABA receptors. En: G. Adelman eds., Encyclopedia of Neuroscience Vol. 1, Ed. Birkhauser, Boston, U.S.A., pp. 444-445.

- Stelzer, A., Kay, A.R. y Wong, R.K.S. (1988). GABA_A-receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. Science, 241, pp. 339-341.
- Tapia, R. (1991). Alteraciones neuroquímicas asociadas a las epilepsias. En: E. Otero-Siliceo y S. Brailowsky eds., Epilepsia Experimental Vol. 2, Ed. Academia Mexicana de Neurología, A.C. y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C., Mééxico, D.F., pp. 37-45.
- Tehrani, M. H. J., y Barnes, E. M. (1988). GABA down-regulates the GABA/benzodiazepine receptor complex in developing cerebral neurons. Neuroscience Letters, 87, pp. 288-292.
- Tehrani, M. H. J., Hablitz, J.J. y Barnes E.M. (1989). cAMP increases the rate of GABA_A receptor desensitization in chick cortical neurons. Synapse, 4, pp. 126-131.
- Ticku, M.K. (1991), Mechanisms of GABA agonists and Modulators of GABAergic Transmission in anticonvulsant Activity, En: G. Tunnicliff y V.U. Raess eds, GABA Mechanisms in Epilepsy, Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, U.S.A., pp. 149-164.
- Twyman, R.E. y Macdonald, R.L. (1991), Antiepileptic Drug Regulation of GABA_A Receptor Channels, En: G. Tunnicliff y V.U. Raess eds, GABA Mechanisms in Epilepsy, Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, U.S.A., pp. 89-104.
- Varon, S. (1987), Glial Cell Markers. En: G. Adelman ed., Encyclopedia of Neuroscience, Vol. 1, Ed. Birkhäuser Inc., Boston, U.S.A., pp.462-463.
- Zilles, K. (1985), The Cortex of the Rat. A Stereotaxic Atlas. Tokio, Ed. Berlin Heidelberg Inc., pp. 121.