

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LOS CANALES DE CLORURO EN

NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA CON EPILEPSIA

EXPERIMENTAL INDUCIDA POR KINDLING

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAÉSTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ÁREA FISIOLÓGÍA

P R E S E N T A

VÍCTOR MANUEL RODRÍGUEZ MOLINA

ASESOR: Dr MARIO VAZQUEZ GARCÍA.

MÉXICO D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS CANALES DE CLORURO EN
NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA CON EPILEPSIA
EXPERIMENTAL INDUCIDA POR KINDLING”**

ALUMNO: VÍCTOR MANUEL RODRÍGUEZ MOLINA

ASESOR DE TESIS



DR. MARIO VAZQUEZ GARCIA

**EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS FUE APOYADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL
DEL PERSONAL ACADÉMICO. PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE
INVESTIGACIÓN E INOVACIÓN TECNOLÓGICA; NÚMERO DE PROYECTO
IN2005594, 1994.**

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Modelos experimentales de epilepsia en animales	4
1.3. Modelos de epilepsia en animales y tipos de epilepsia en humanos	5
1.4. Kindling eléctrico (modelo experimental de epilepsia)	7
1.4.1. Kindling y aminoácidos excitatorios	8
1.4.2. Kindling y GABA	10
1.4.3. Kindling y iones de calcio	11
1.4.4. Kindling y potenciación a largo plazo	12
1.5. Kindling en hipocampo	13
1.6. Organización del hipocampo y epilepsia	14
1.7. Canales de cloruro	18
1.7.1. Bloqueadores de canales de cloruro	21
1.7.2. Canales de Cl ⁻ dependientes del voltaje	23
1.7.3. El canal <i>ClC-0</i> del órgano eléctrico del <i>Torpedo</i>	24
1.7.4. Canal de Cl ⁻ acoplado a el receptor GABA _A	27
2. Antecedentes	29
2.1. Regulación de los circuitos hipocampales	29
2.2. Participación del GABA y cloruro en la regulación hipocampal	31
3. Planteamiento del problema	34
4. Hipótesis	35
5. Objetivos	36
6. Método	37
6.1. Preparación biológica	37
6.2. Método electrofisiológico	39
6.3. Elaboración de las pipetas de registro	41
6.4. Formación de sellos de alta resistencia	42
6.5. Soluciones de registro	43
6.6. Inducción de descargas de tipo epileptiforme (kindling) en ratas	43
6.7. Captura y análisis de los datos	47
7. Resultados	52
7.1. Identificación del canal de cloruro en neuronas de hipocampo	52
7.2. Dependencia al voltaje del canal cloruro de neuronas de hipocampo	55
7.3. Sensibilidad al calcio del canal de cloruro de neuronas de hipocampo	57
7.4. Actividad del canal de cloruro de neuronas de hipocampo	59
7.5. Registro de neuronas de hipocampo de rata en las que se indujo kindling	61
7.6. Actividad del canal de cloruro de neuronas con kindling inducido, a diferentes voltajes	63
7.7. Actividad del canal de cloruro de neuronas con inducción de kindling	65
7.8. Las corrientes de cloruro de neuronas de hipocampo testigo y con kindling inducido, presentan múltiples subconductancias	68
7.9. Registros de poblaciones con estimulación simulada	73
8. Discusión	74
8.1. Canal de cloruro registrado en neuronas de hipocampo de rata	74
8.2. Canal de cloruro de neuronas de hipocampo con kindling inducido	81
9. Conclusión	83
10. Perspectivas	84



11. Bibliografia

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

El estudio de la epilepsia se remonta a épocas muy antiguas; los griegos la consideraron como una enfermedad mágica, posteriormente en el siglo XIX se le pudo asociar a causas específicas, como los traumatismos que producían crisis focalizadas. En 1899, Jackson describió algunos síntomas epilépticos como el aura preictal, y signos como la conducta de lamido, masticación, saboreo, movimiento de los labios y contracciones musculares en miembros superiores. Posteriormente, a mediados de este siglo se estableció que estos síntomas pudieran deberse a la activación de zonas cerebrales específicas; Magnus, Penfield y Jasper (1952) describieron que las crisis descritas por Jackson; pueden generarse por la activación de la zona sensorimotora de la función oral; así, se identificó gradualmente la participación de numerosos sitios corticales o subcorticales, con la descripción de sus respectivas sintomatologías. Sin embargo, al intentar dilucidar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la generación de estas crisis, se presentaron distintos problemas, entre ellos los concernientes a las causas de origen; se estableció que dichas causas podrían ser múltiples y de distinta naturaleza, lo que hizo más complejo su estudio. Debido a esto, los primeros conocimientos se generaron mediante métodos empíricos, auxiliados por el desarrollo sucesivo de fármacos hipnóticos o sedantes que podían coadyuvar en el control de las crisis. Así, con el desarrollo del bromuro de potasio en 1857, el

pentobarbital en 1912, la difenil hidantoína en 1938 y la trimetadona en 1944 (Tower, 1960; Spinks y Waring, 1963) se obtuvieron más herramientas para el estudio de esta enfermedad. Los fármacos y su uso dieron mayor luz sobre las posibles alteraciones químicas que se producían durante la epilepsia; cada uno de estos fármacos interactúa con sitios de afinidad específicos en la membrana celular, algunos de estos sitios de afinidad involucran a receptores cuya estructura proteica tiene incorporado un poro o canal iónico; un ejemplo de éstos, son los receptores específicos al ácido γ -aminobutírico (GABA), en los cuales un canal iónico principalmente permeable a cloruro es parte integral de la macromolécula receptora.

Se postuló que una alteración en la transmisión gabaérgica, podría ser una de las causas primarias de la epilepsia (Roberts, 1984; Meldrum, 1989). El desarrollo de fármacos agonistas del GABA, como las benzodiazepinas, evidenciaron su participación en esta enfermedad debido a su acción anticonvulsionante (Meldrum y Braestrup, 1984); otro fármaco como la gabapentina que también es un agonista del receptor a GABA, se utiliza en el tratamiento de la epilepsia parcial-compleja, por otra parte, actúa sobre canales de sodio disminuyendo su conductancia (Upton, 1994). A pesar de estos datos, no es posible considerar que las alteraciones del GABA sean la causa determinante de la epilepsia, ya que estudios en animales, han descrito también la participación de otros mediadores químicos como el glutamato y un subtipo del receptor activado por N-metil-D-aspartato (NMDA), el cual también es un receptor-canal, principalmente permeable a el calcio; al aplicar diariamente fármacos antagonistas del receptor NMDA como el ácido 2-amino-7-fosfoheptánico (AP7) y ácido 3-((\pm)-2-carboxipeperacina-4-yl)-propil-1-fosfónico (CPP), en animales con kindling inducido, inhibe la actividad epileptiforme por bloqueo de la entrada de

FALTA PAGINA

No. 3

1.2. Modelos experimentales de epilepsia en animales

Por la gran complejidad del fenómeno fue necesaria la creación de modelos que reprodujeran de manera satisfactoria las características de la epilepsia, con este fin hace aproximadamente 40 años se inició el desarrollo de distintos tipos de modelos de naturaleza muy diversa (citado por Purpura *et al.*, 1972; Fisher, 1989). Se describen a continuación algunos ejemplos:

Un modelo simple y directo consiste en la inyección sistémica de sustancias químicas convulsivantes, como el pentilentetrazol, la tiosemicarbazida y agentes antipiridoxal, otro, consiste en la aplicación de electrochoques en la cabeza del animal; también, mediante la implantación local de sustancias como el óxido de aluminio, el cobalto o la penicilina en el cerebro, se puede inducir una lesión por bloqueo; se crearon modelos quirúrgicos, como el aislamiento de pequeñas zonas de la corteza cerebral por medio de microcirugía o congelamiento dejando intacto el aporte sanguíneo, con lo cual se produce una hiperactividad espontánea del tejido bloqueado (Koyama y Jasper, 1977). Otro modelo es aquel en el que por medio de animales con mutaciones genéticas, se produce "epilepsia sensorial", un tipo de esta es la fotogénica, la cual se produce en mandriles fotosensibles por estimulación luminosa repetida a determinadas frecuencias, en ratones sensibles al sonido se producen crisis audiogénicas, y en ratones "El" se provocan las crisis por medio de "manoseo o agitación"; un modelo ampliamente difundido es el kindling (eléctrico o químico), el cual produce crisis motoras parciales, por medio de la aplicación local de estímulos de corriente directa o de sustancias químicas, repetidos diariamente o a intervalos de tiempo menores (de horas a segundos).

Dentro de las propiedades de cada modelo están las de producir crisis epilépticas con características particulares, creando así una lista de modelos con sus respectivos tipos de crisis, lo mismo se observa cuando se estudian los diferentes tipos de epilepsia en humanos, cada uno de estos se caracteriza por generar crisis específicas, de tal forma que ha sido posible equiparar a cada tipo de modelo de epilepsia animal con un tipo de crisis en humanos.

1.3. Modelos de epilepsia en animales y tipos de epilepsia en humanos

Debido a la gran variedad de características de las crisis convulsivas en humanos, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) creó en 1981 una clasificación basada en las características de los ataques, que incluye a todos los tipos de crisis, a los cuales dividió en crisis parciales (simples y complejas), generalizadas y sin clasificación (Dreifuss, 1981; Parsonage, 1986).

Las características de las crisis de cada uno de los modelos animales se pueden comparar en alguna medida a un tipo particular de crisis en los humanos, así, por ejemplo, el kindling químico y el eléctrico producen crisis de tipo parcial compleja; la aplicación tópica de penicilina, bicuculina o estriquina en la corteza cerebral produce crisis de tipo parcial simple; la estimulación talámica o la aplicación cortical bilateral de cobalto o penicilina provocan crisis generalizadas de ausencia, etc.; sin embargo la característica común a todos los modelos es la presencia de crisis de períodos breves, que se produce cuando la excitación local supera los procesos inhibitorios. En la tabla 1, se enlistan los diferentes modelos y la característica de sus crisis, clasificadas de acuerdo a la ILAE.

Tabla I. Modelos animales de epilepsia y el sistema de clasificación ILAE (1981).

TIPO DE EPILEPSIA DE ACUERDO A LA ILAE	MODELO ANIMAL
Crisis parcial simple (aguda)	Aplicación tópica. Ejemplo: penicilina, bicuculina, estricnina, picrotoxina, estimulación eléctrica aguda, abstinencia al GABA
Crisis parcial simple (crónica)	Implantación tópica de metales. Ejemplo: Al ₂ O ₃ , cobalto, tungsteno, zinc, fierro, inyección de anticuerpos contra gangliosidos. Procedimientos quirúrgicos y por congelamiento. Ejemplo: congelamiento cortical local (daño criogénico), aislamiento cortical de una zona (vasos sanguíneos intactos)
Crisis parciales complejas (en ocasiones con generación secundaria)	(a) kindling (eléctrico y químico) (b) Microinyecciones focales. Ejemplo: ácido kainico, toxina tetánica (c) ratón "El" (transgénico; sensible a manipulación manual)
Crisis primarias tónico-clónicas generalizadas	(a) Animales transgénicos. Ejemplo: mandril fotosensible, ratones con crisis audiogénicas, ratones tambaleantes, ratones y ratas con crisis de postración. (b) Electrochoques máximos (c) Convulsiones sistémicas ejemplo.: pentilentetrazol, penicilina, picrotoxina, alilglicina, estricnina, bicuculina, agentes antipiridoxal (tiosemicarbazida) (d) Alteraciones metabólicas Hipoxia, hipoglicemia, oxígeno hiperbárico, hipercapnia, uremia, temperatura alta
Crisis de ausencia generalizadas	Estimulación talámica, focos corticales bilaterales (penicilina, cobalto), penicilina sistémica, γ -hidroxibutirato, opiáceos intraventriculares, roedores transgénicos con crisis de ausencias
Estatus epilepticus	Estimulaciones recurrentes, litio-policarpina, cobalto-homocistina.

Tomada de Fisher (1989).

Dentro de todos los modelos enlistados uno de los que más destaca por la facilidad de su generación y mantenimiento, es el kindling; esto ha provocado que sea uno de los más utilizados para el estudio de la epilepsia.

1.4. Kindling eléctrico (modelo experimental de epilepsia)

El kindling es un modelo de epilepsia parcial compleja, en el que hoy día se centra un gran número de estudios. El kindling se puede definir como la aparición progresiva de actividad epileptiforme debida a la aplicación repetida de estímulos subconvulsivos, culminando en crisis motoras tónico-clónicas generalizadas en respuesta a un solo estímulo; consiste en aplicar localmente una estimulación eléctrica con trenes de 60 Hz durante 1 o 2 segundos, con pulsos cuadrados bifásicos de intensidad variable (subconvulsiva), diariamente o con mayor frecuencia hasta la aparición de crisis motoras bilaterales. Para establecer el sitio de estimulación debe considerarse que no todas las estructuras cerebrales presentan el mismo umbral para el desarrollo del kindling; así la estimulación en el cerebelo, la cápsula interna y el hipotálamo anterior no induce este tipo de respuesta; una área con umbral más bajo para las descargas epileptiformes, y por lo tanto el sitio más habitual de estimulación, es el sistema límbico, en especial la amígdala y la corteza piriforme (de Florida y Delgado, 1958).

La estimulación repetida en el hipocampo y la amígdala provoca el desarrollo de postdescargas que van aumentando gradualmente su duración, lo que genera crisis motoras bilaterales (Goddard, 1967; Racine 1972, 1978); para su estudio se clasifica la respuesta de acuerdo al cambio conductual de la rata, Racine (1972) describe esta evolución conductual y la divide en 5

estados: 1) movimientos faciales y de la boca; 2) movimientos repetidos de la nuca hacia atrás; 3) clonus de las extremidades anteriores; 4) adquisición de la posición erecta sobre las patas posteriores, y 5) las características del estado 4 con pérdida del equilibrio; una descarga motora generalizada con pérdida del equilibrio se considera de estado 5 (Fig. 7). Una vez que las crisis epileptiformes de la rata se califica en estado 5 de Racine, y esta calificación se obtiene en tres ocasiones consecutivas, se da por establecido el kindling. Ya generado el efecto, éste es permanente y espontáneamente irreversible, y puede provocarse una nueva crisis con la aplicación de un solo pulso de estimulación.

En numerosos estudios se ha mostrado que durante la instalación y el mantenimiento del kindling se generan importantes cambios químicos y fisiológicos, con la participación de diferentes mediadores químicos y/o estructuras anatómicas.

1.4.1. "Kindling" y aminoácidos excitatorios

Existen evidencias que muestran la participación de algunos aminoácidos como el glutamato o el aspartato en el kindling (Koyama, 1972; Koyama y Jasper, 1977); en el caso del kindling producido en hipocampo se generan respuestas sinápticas, que son potenciadas en sus tres relevos excitadores (fig.1) (Cotman y Nadler, 1981; Dolphin, Errington y Bliss, 1982), actuando sobre tres subtipos de receptores a glutamato; de acuerdo a su agonista exógeno más potente se denominan 1) N-metil-D-aspartato (NMDA), 2) quisquialato (Q), y 3) kainato (K); la aplicación de antagonistas del receptor NMDA como el ácido 2-amino-5-fosfono-valérico (AP5), el ácido (E)-4-(3-fosfonoprop-2-enil)piperazin-2-carboxílico (D-CPPene) y el 5-metil-10,11-dihidro-5H-

dibenzocyclohepteno-5,10-imino maleato (MK801), han mostrado efecto anticonvulsivo y antiepileptogénico (Coutinho-Netto *et al.*, 1981); también la aplicación de AP7 y CPP, 15 minutos antes de estimular a un animal con kindling previamente instalado, mostró una prevención de las crisis (Croucher *et al.*, 1988, 1992a; Sato *et al.*, 1988); un bloqueo parcial de las crisis por kindling se ha observado cuando se aplica un antagonista del receptor a Q como el ácido γ -D-glutamilaminometil-sulfónico (GAMS) (Croucher *et al.*, 1988), lo que sugiere una participación limitada de éste. Existen evidencias de que algunos agonistas del receptor presináptico metabotrópico a glutamato, tales como el L-2-amino-4-fosfonobutirato (D,L-AP4) y el 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato ((1S, 3S)-ACPD) también bloquean las crisis, presentando un potente efecto anticonvulsivo por medio de la inhibición de la liberación de glutamato (Coutinho-Netto *et al.*, 1981; Atwell *et al.*, 1995).

En determinaciones de glutamato, con la técnica de microdiálisis también se ha mostrado la participación de este neurotransmisor en el kindling, los niveles de glutamato cuantificados antes de la inducción fueron bajos, y se incrementaron gradualmente conforme se instaló el kindling, obteniéndose las concentraciones máximas al cursar en el estado 5 propuesto por Racine (Minamoto *et al.*, 1992; Ueda y Tsuru, 1994); esta serie de evidencias se pueden relacionar con las determinaciones del neurotransmisor hechas en el hipocampo de humanos con focos epilépticos (During y Spencer, 1993).

Algunos de estos neurotransmisores excitadores activan canales de calcio operados por receptor, y son altamente neurotóxicos y epileptogénicos (Ben-Ari *et al.*, 1979; Olney, 1985); cuando se usan para inducir actividad epileptiforme, se ha observado en estudios de hipocampo que

provocan un influjo de calcio en las neuronas de CA3 y CA1 (Evans, Griffiths y Meldrum, 1984; Griffiths, Evans y Meldrum, 1982; Korf y Postema, 1984). Estudios *in vitro* realizados en rebanadas de hipocampo de rata, han confirmado los hallazgos obtenidos *in vivo*, demostrando que algunos aminoácidos excitadores reducen las concentraciones extracelulares tanto de calcio como de sodio, e incrementan la captación de calcio por las neuronas (Zanotto y Heinemann, 1983).

1.4.2. Kindling y GABA

Se ha demostrado en diferentes estudios la participación del GABA en la epilepsia, algunos autores reportan pérdida de neuronas o terminales nerviosas GABAérgicas en focos epilépticos corticales en humanos (Ribak, 1983, 1985); en modelos animales se mostró una disminución del 30-50% de neuronas GABAérgicas o sus terminales nerviosas en la amígdala de ratas con kindling inducido eléctricamente (Callahan *et al.*, 1991; Loscher y Schwark, 1987); en determinaciones de GABA por la técnica de microdiálisis realizadas en la amígdala de ratas con kindling, se observó una disminución del 60-70% del GABA extracelular (Kaura *et al.*, 1995), también se han observado una reducción del GABA en el fluido cerebro espinal de humanos con epilepsia (Wood *et al.*, 1979; Maynam *et al.*, 1980). La aplicación focal de agonistas del GABA previene las descargas tónicas de epilepsia provocadas por electrochoques en animales (Ladarola y Gale, 1982), la inyección de muscimol (un agonista del GABA) aplicado bilateralmente en encéfalo de rata, suprime las descargas motoras provocadas por kindling, de la misma forma, otros agonistas como γ -vinil-GABA (Vigabatrin) o dipropilacetato (Epilim) tienen efecto anticonvulsivante (Godin *et al.*,

1969; Simler *et al.*, 1973; Harvey *et al.*, 1975; Jung *et al.*, 1977; Chapman *et al.*, 1982), así como también la administración de benzodiazepinas (Meldrum y Braestrup, 1984).

1.4.3. Kindling y iones de calcio

Se ha informado que los niveles de Ca^{++} extracelulares en neuronas de hipocampo, disminuyen en forma crónica durante el kindling en hipocampo, y que la disminución de este ion favorece la generación de las crisis (Davies y Peterson, 1989); en rebanadas de hipocampo sin inducción del kindling, en las que se provocaron descargas epileptiformes por adición de K^+ , se bloquea esta actividad si se exponen a bajas concentraciones de Ca^{++} extracelular (Stringer y Lothman, 1988), mostrando la sensibilidad a este en relación a la epileptogénesis. Durante el kindling se inducen cambios en la permeabilidad al Ca^{++} en neuronas de CA1 vía los receptores NMDA (Heineman y Hamon, 1986); aunque la entrada de iones de calcio promovida por aminoácidos excitatorios parece ocurrir principalmente a través de un canal operado por receptor, algunos bloqueadores de canales de calcio sensibles al voltaje, tienen potentes propiedades anticonvulsivas; así, antagonistas de estos canales sensibles a las dihidropiridinas, como la nifedipina, tienen propiedades anticonvulsivas en descargas epileptiformes inducidas por isquemia, por administración de drogas como la bicuculina y el pentilentetrazol, por estimulación eléctrica, por inhalación de óxido nítrico y por cefasolina (Ascioti *et al.*, 1986; Dolin y Little, 1986; Hoffmeister *et al.*, 1982; Meyer *et al.*, 1986a,b, 1987, 1988; Moricutti *et al.*, 1986). En concordancia con lo anterior, el agonista de los receptores a las dihidropiridinas BAY K 8644 aplicado en el fluido cerebro espinal de ratones induce descargas epileptiformes (Bolger *et al.*,

1984; Shelton *et al.*, 1987); por ello, los canales de calcio dependientes del voltaje sensibles a las dihidropiridinas, probablemente tienen un papel de facilitación en la epilepsia experimental. Los receptores a las dihidropiridinas son inhibidos alostéricamente al menos por otros dos bloqueadores de canales de calcio: las fenilalquilaminas (verapamil) y las benzodiazepinas (diltiazem) (Ferry y Glossmann, 1982), por lo que estos, también tienen cierto efecto anticonvulsivante (Walden *et al.*, 1985).

1.4.4. Kindling y potenciación a largo plazo

Se ha demostrado que la generación del kindling induce cambios plásticos, progresivos y permanentes en las neuronas, así como también potenciación a largo plazo (LTP) de la transmisión sináptica, con la producción de potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) (Bliss y Gardner-Medwin 1973; Bliss y Lomo 1973); por otra parte, se ha observado que la estimulación repetida de las vías excitadoras del hipocampo facilitan la transmisión sináptica (Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Bliss y Lomo, 1973), por lo que se ha relacionado al kindling con el aprendizaje, se ha determinado que ambos procesos comparten mecanismos fisiológicos y farmacológicos, por ejemplo: los dos se bloquean ante la administración de AP5 o AP7, demostrando que en ambos participa el receptor NMDA; también muestran facilitación recíproca, la LTP máxima facilita el kindling en un 50%; por otra parte la LTP tiene su efecto máximo después de la primera postdescarga del proceso del kindling (Racine *et al.*, 1983; Giacchino *et al.*, 1984; Sutula y Steward, 1987). Así, el fenómeno de kindling se ha descrito en diferentes niveles sinápticos del hipocampo, por lo que se determinó la relación sináptica entre la vía perforante y las células

granulares del giro dentado, la sinapsis entre las fibras musgosas y las células piramidales de CA3, y la sinapsis entre la colateral de Schaffer y las células piramidales de CA1 (Bliss y Lynch, 1988).

Dentro de los factores que intervienen en la instalación y el mantenimiento del kindling, no solo se encuentran cambios de tipo químico; se ha observado que ciertos circuitos neuronales como los del hipocampo también influyen dentro de este fenómeno.

1.5. Kindling en hipocampo

Como se describió con anterioridad, la generación del kindling se ve favorecida en algunas regiones cerebrales, en particular en el sistema límbico, por lo que el estudio de este fenómeno en el hipocampo, se ha difundido ampliamente; esto ha permitido la identificación de algunas de las relaciones que se establecen entre los circuitos neuronales de esta estructura durante el kindling.

Se ha mostrado que el kindling generado por medio de estimulación en el sistema límbico, produce cambios permanentes en las propiedades de los circuitos del hipocampo, en estudios de kindling producidos en esta estructura, se observó que aun destruyendo el sitio original de estimulación (corteza entorrinal), el efecto del kindling persiste debido a una influencia transináptica del circuito corteza entorrinal (CE)-hipocampo, (McNamara, 1988), también es posible provocar las crisis si se estimula la CE del lado contralateral. Estos cambios están generados por mecanismos sinápticos, que se llevan a cabo en las células granulares del giro dentado y probablemente en las neuronas piramidales de CA3 y CA1 (Messenheimer *et al.*, 1979).

Se ha demostrado que a pesar de destruir con colchicina las células granulares del giro dentado, es posible instalar el kindling, pero requiere 30-40% de incremento en el número de

estímulos (Frush *et al.*, 1986; Sutula *et al.*, 1986); probablemente debido a que en estas condiciones el kindling se instala vía un circuito paralelo. El hipocampo cuenta con un circuito por el cual se transmite la estimulación excitadora, éste consta de una cadena de neuronas hipocámpales que se inicia en la corteza entorrinal; estas células transmiten a las células del giro dentado, y a su vez por medio de las fibras musgosas, se excita la región de CA3; los axones de las células de CA3 se proyectan vía la colateral de Shaffer al área de CA1 (Fig. 1). Existen vías colaterales que se forman a partir de la corteza entorrinal hacia las células del giro dentado contralateral (McNamara, 1988).

Aparentemente el arreglo anatómico de los circuitos del sistema límbico y en particular del hipocampo influyen de manera importante en la génesis de la epilepsia experimental inducida por el kindling, esto debido probablemente al tipo de selección funcional que se establece en dichos circuitos.

1.6. Organización del hipocampo y epilepsia

En estudios realizados en humanos y en modelos animales se ha mostrado que el sistema límbico presenta una alta vulnerabilidad para desarrollar epilepsia; en humanos, una alta proporción de los diferentes tipos de epilepsia (30-40%), involucran al sistema límbico y al lóbulo temporal (Sutherland y Tail, 1971; Currie *et al.*, 1971). La epilepsia del lóbulo temporal presenta algunas alteraciones emocionales y manifestaciones psicóticas, lo que causa que la sintomatología de algunos pacientes con epilepsia psicomotora (sistema límbico) pueda ser indistinguible de la de una esquizofrenia paranoide. Las lesiones irritativas que involucran a la corteza entorrinal presentan descargas epilépticas acompañadas de alteraciones emocionales como terror, miedo, retraimiento,

falta de realidad, tristeza y sensaciones paranoides (MacLean, 1970). Estos datos muestran que, tanto en humanos como en modelos animales, el sistema límbico es una de las áreas del sistema nervioso más susceptibles al desarrollo de descargas epileptiformes, en especial el hipocampo, probablemente debido al arreglo de sus circuitos sinápticos y al sistema de regulación que presentan.

La corteza entorrinal es la principal estructura que envía aferencias al hipocampo y recibe a su vez eferencias de éste. Se determinó que existen dos circuitos a través de los cuales puede transmitirse la información generada en la CE; el primero está constituido por las células de la capa II de la corteza entorrinal las cuales proyectan sus axones para hacer sinapsis con neuronas granulares del giro dentado (GD), y éstas hacen sinapsis con células del área de CA3 por medio de las fibras musgosas; del área de CA3 se proyectan fibras axónicas vía la colateral Shaffer para hacer sinapsis con neuronas del área de CA1 (Fig. 1.).

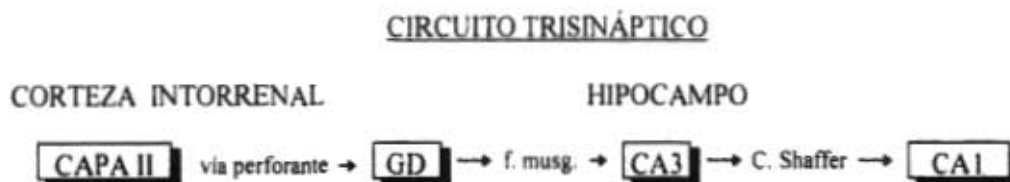


FIG. 1. Diagrama del circuito trisináptico del hipocampo.

Se muestra esquemáticamente las sinapsis que se establecen entre la capa II de la corteza entorrinal con el área del GD, mediante la vía perforante; el GD establece sinapsis con células de CA3 vía las fibras musgosas; y CA3 proyecta sinapsis con CA1 por medio de la colateral de Shaffer.

A esta serie de conexiones sinápticas se le denomina circuito trisináptico (Jones, 1993). Se ha

descrito que el circuito se puede extender mediante sinapsis de fibras de CA1 con neuronas del subiculum (Köhler, 1985).

El segundo circuito lo constituyen proyecciones de regiones profundas de la corteza entorrinal (capa III-IV) hacia el subiculum y hacia CA1 y CA3 (Fig. 2), debido a que solo se establece una sinapsis en el circuito, se le denomina circuito monosináptico; este circuito no se relaciona con el trisináptico ni con el giro dentado, por lo que actúa independiente de ellos (Jones, 1993).

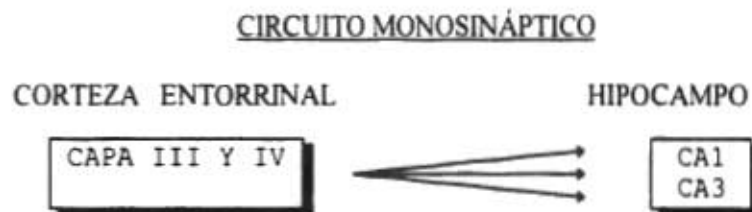


Fig. 2. Esquema del circuito monosináptico del hipocampo. Se muestra las sinapsis que se establecen entre las capas III y IV de la corteza entorrinal, con el área de CA1 y CA3. Este circuito se caracteriza por ser independiente del giro dentado y del circuito trisináptico.

El circuito monosináptico se caracteriza por que sus neuronas piramidales responden rápidamente a estimulaciones con kainato a través de receptores AMPA, produciendo potenciales postsinápticos excitadores (PPSE), seguidos de respuestas excitadoras lentas dependientes del receptor NMDA. La regulación del circuito, se produce por medio de interneuronas cuyas sinapsis no están mediadas por el receptor GABA_A ni por el GABA_B, por lo que la respuesta de las neuronas es básicamente excitadora; en contraste el circuito trisináptico cuenta con una gran población de neuronas piramidales espinosas en la capa II de la corteza entorrinal, cuyas sinapsis están mediadas por receptores NMDA; las interneuronas del circuito poseen receptores GABA_A y GABA_B que

generan potenciales postsinápticos inhibitorios (PPSI), lo que provoca una regulación sobre los potenciales postsinápticos excitadores generados por la estimulación con glutamato, previniendo así la generación de potenciales de acción. Por lo tanto la sinapsis de entrada de la capa II de la corteza entorrinal es básicamente inhibitoria; las proyecciones de la vía perforante ejercen sobre el giro dentado, fundamentalmente un control inhibitorio; a diferencia del que ejercen las capas III y IV sobre CA1 y CA3. El control inhibitorio de la vía perforante está basado en umbrales elevados para el disparo de espigas de las neuronas granulares del giro dentado. Estas características contribuyen a determinar la ruta que debe tomar la información procedente de la corteza entorrinal. Por estudios electrofisiológicos (Yeckel y Berger, 1990; Jones, 1993) se estableció que dicha selección depende de la frecuencia de disparo de las células de la corteza entorrinal; a frecuencias de disparo bajas (menor de 0.5 Hz), la ruta de entrada es directamente a través de la vía monosináptica (capa III y IV hasta CA1 y CA3), debido a la fuerte propensión de la capa II a la inhibición; las frecuencias altas de disparo (5-10 Hz) activan las capas superficiales de la CE (capa II) y estimulan al giro dentado, de esta manera se puede modular el equilibrio de la entrada de información procedente de la corteza entorrinal hacia el hipocampo, dando una actividad de "reverberación" dependiente de la frecuencia; así, en cada momento se selecciona la ruta de acceso al hipocampo; si la información viaja por la vía monosináptica se limita la vía trisináptica y a la inversa.

La corteza entorrinal es crítica en el control de la entrada y salida de información del hipocampo, gracias a las conexiones sinápticas que establece, se pueden determinar los sitios de entrada de las vías, filtrar e integrar la salida de información; además, coordina la actividad de la capa II y IV para la entrada de información y dirige la salida de información nuevamente hacia el

hipocampo. Estas características del arreglo sináptico y funcional del hipocampo con sus aferencias y eferencias favorecen el establecimiento de la potenciación a largo plazo y el reforzamiento de circuitos que hagan más accesible su activación subsecuente, lo que induce el establecimiento de memoria por reforzamiento sináptico (Jones, 1993).

La regulación inhibitoria del hipocampo, constituye uno de los puntos de mayor importancia, ya que si dicho control se altera puede desequilibrar la relación excitación-inhibición del sistema, provocando el predominio de los circuitos excitatorios. Como se mencionó en el control inhibitorio del circuito trisináptico del hipocampo, juegan un papel muy relevante las interneuronas cuyo mediador principal es el GABA (Miles, 1987), en algunos casos ésta inhibición está generada por la activación de canales de Cl⁻. La participación de los canales de Cl⁻ en estos circuitos parece ser relevante, ya que no sólo se limita a generar hiperpolarización de la célula, sino que dependiendo de la fuerza impulsora para el Cl⁻ la activación de este tipo de canales podría generar también una despolarización. Se ha descrito este fenómeno en áreas como CA3 y el giro dentado (Misgeld, 1986).

La participación de los canales de Cl⁻ en procesos de regulación de la excitabilidad celular se ha descrito en diferentes sistemas; por lo que revisar algunas características de estos canales, podría ser de ayuda para tratar de entender su participación dentro de estas funciones de regulación.

1.7. Canales de cloruro

Los canales de Cl⁻ participan en diversas funciones celulares, tales como regulación del volumen celular (Strange, 1991; Valverde *et al.*, 1992), transporte transepitelial (Gogelein,

1988; Liedtke, 1989; Welsh, 1990), estabilización del potencial de membrana de la célula (Bretag, 1987; Steinmeyer *et al.*, 1991) y la comunicación intercelular de señales (Grenningloh *et al.*, 1987; Schofield *et al.*, 1987). Se ha descrito una gran variedad de canales de Cl⁻, los cuales presentan comportamientos cinéticos muy particulares y en ocasiones difíciles de estudiar por la gran complejidad que encierra su caracterización: por una parte, por los problemas experimentales para aislar y caracterizar las corrientes macroscópicas de Cl⁻, a diferencia de lo que sucede con el Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. Algunas corrientes de Cl⁻ registradas bajo la configuración de célula completa, muestran una dependencia temporal lenta, una débil dependencia del voltaje y a menudo se les consideró como una corriente de fuga, y por otra parte, por el desconocimiento sobre el papel fisiológico que tiene el cloruro en diferentes sistemas.

Se han identificado canales de Cl⁻ en diferentes tipos celulares y especies animales, que de acuerdo a sus comportamientos cinéticos se clasifican en cuatro grupos principales (Franciolini y Petris, 1990): 1) canales de Cl⁻ dependientes del voltaje, 2) canales de cloruro "doble-cañon", 3) canales de gran conductancia ó "maxi" y 4) canales activados por mensajeros químicos. En seguida se mencionarán las características generales de todos los canales de Cl⁻.

La conductancia de los canales de Cl⁻ es muy variable, y no es posible caracterizarlos de acuerdo a ésta, ya que puede variar desde 5 pS de conductancia en astrocitos (Nowak *et al.*, 1987), hasta 450 pS en células de Schwann (Gray *et al.*, 1984). En la relación corriente voltaje, lo más común es que exista una rectificación saliente debida a la asimetría de cargas en el poro del canal, que afecta el paso de los iones a través de éste. Es una característica de los canales aniónicos, la de presentar un comportamiento complejo de sus compuertas; en particular los canales de Cl⁻

presentan subniveles de conductancia que pueden ser uno o más, estos subniveles de corriente fueron descritos en células del órgano eléctrico del *Torpedo*, neuronas de moluscos, astrocitos de rata, linfocitos de ratón y músculo esquelético de anfibio (Fox, 1987); otra característica de los canales de Cl^- es su permeabilidad a otro tipo de aniones, como el Br^- , I^- , NO_3^- , F^- , SCN^- , acetato, propionato, aspartato, y a algunos cationes como Na^+ , K^+ , Cs^+ , pero en condiciones similares a las fisiológicas, el cloruro es el anión más permeante; también presentan permeabilidad a aniones como el SO_4^- y a aniones hidrofóbicos como el benzoato y el glutamato, que además actúan como agentes bloqueadores (Gray *et al.*, 1984; Franciolini y Nonner, 1987; Li *et al.*, 1990).

Franciolini y Nonner (1987) describieron en neuronas de hipocampo un comportamiento muy interesante de un tipo de canal de Cl^- , observaron que algunos cationes podían permear a través de este canal, siempre que se encontraran en presencia de algún anión permeable, por ejemplo, cuando se sustituía cloruro por sulfato, no era posible observar una corriente entrante de cationes. Otra característica fue que el grado de permeación dependía del tipo de catión, así, cuando en el líquido extracelular se sustituyó sodio por cesio como principal catión, la conductancia a nivel unitario se incrementó en un 20%. Estas observaciones mostraron una clara relación entre el flujo de cationes y aniones a través del canal. Franciolini y Nonner (1987) propusieron un modelo en el cual se establece un sitio de afinidad para un catión y un anión en el poro del canal, denominándole a este sitio "complejo activo". En este modelo el sitio activo es aniónico y por lo tanto lo primero que se une a él es un catión, formando entre ellos un dipolo, a su vez a este dipolo se le une un anión, lo que conforma así el "complejo activo" (Fig. 3). Este complejo puede funcionar de dos formas: primero, por medio de una disociación del anión, lo que generará un flujo aniónico, y

segundo, una disociación del par anión-cation produciendo un flujo catiónico y anionico. El flujo aniónico puede implicar la unión del anión al cation del dipolo (sitio catiónico), seguido por una separación del anión de este sitio; mientras que el flujo catiónico implica la unión o no del cation, la unión del anión al cation del dipolo, o la separación del complejo anión-cation del sitio cargado negativamente en el canal.

1.7.1. Bloqueadores de canales de cloruro

Los canales de Cl⁻ pueden ser bloqueados por diferentes agentes, que se clasifican dentro de tres categorías: Ácidos aromáticos, cationes inorgánicos y protones. Dentro de los ácidos aromáticos se encuentran el antraceno-9-carboxilato (9-AC), la difenilamina-2-carboxilato (DPC), el 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoato (NPPB) y el ácido disulfónico, además de algunos derivados como el ácido 4-acetamida-4'-isotiocianoestilbeno-2-2'-disulfónico (SITS) y el ácido 4-4'-diisotiocianoestilbeno-2-2'-disulfónico (DIDS); estos compuestos se han probado en diferentes preparaciones y se determinó que su efecto es principalmente extracelular, y a concentraciones micromolares; hipotéticamente se ha postulado que el dominio hidrófobo del canal de Cl⁻ es el sitio donde actúan estos fármacos (Li *et al.*, 1990). En el caso del NPPB se propone que interactúa con los lípidos de la membrana para inhibir al canal de cloruro, este efecto se ha mostrado en diferentes tipos de células (Greger, 1990); el efecto de estos fármacos no es el mismo para todos los tejidos, en algunos, como el músculo esquelético de mamífero, los canales son bloqueados eficientemente, mas en el músculo esquelético de rana no se observa este efecto bloqueador (Bryant y Morales-

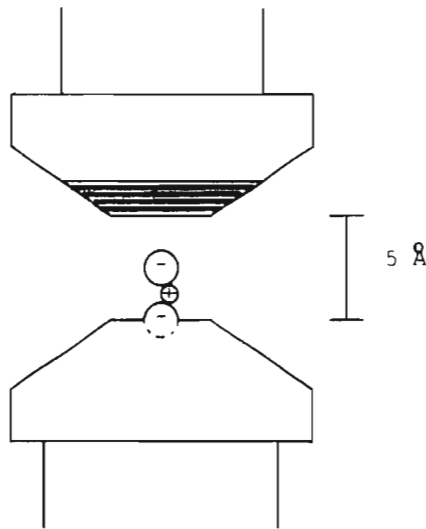


Figura 3. Diagrama del filtro de selectividad del canal de cloruro.

Diagrama esquemático del filtro de selectividad propuesto por Francioloni y Nonner (1987). La parte rayada corresponde a la región hidrofóbica del canal, opuesto a él se ubica un grupo aniónico, éste atrae a un catión monovalente formando un dipolo; conformando el sitio activo que recibirá al anión.

Aguilera, 1971; Palade y Barchi, 1977). Los cationes inorgánicos como el Zn^{2+} y el Cu^{2+} también han mostrado un efecto como bloqueadores de los canales de cloruro en tejidos como músculo esquelético de rana, el Zn^{2+} reduce la conductancia del cloro con una K_i cercana a 0.1 mM (Hutter y Warner, 1967; Stanfield, 1970; Woodburry y Miles, 1973), el Zn^{2+} puede actuar tanto en la parte extracelular como en la intracelular (Woll *et al.*, 1987; Franciolini y Nonner, 1987). También se ha mostrado que el tetra etil amonio (TEA), que es un bloqueador de varios tipos de canales de potasio, puede bloquear los canales de Cl^- actuando por la cara extracelular. este efecto se observó en nervios de langosta y en neuronas corticales de rata (Lukács y Moczydlowski, 1990; Sánchez y Blatz, 1992); el efecto bloqueador del TEA varía de acuerdo al potencial de membrana, por ejemplo, a 10 mM de concentración se observó una disminución del 50% de la corriente, este efecto se incrementó a potenciales negativos (Sánchez y Blatz, 1992). Los protones también tienen un efecto sobre los canales de Cl^- , cambios en el pH y en el potencial de la célula inducen cambios

en el comportamiento del canal, por ejemplo, en músculo de rana a pH de 9.8 la conductancia del canal fue de 1.8 veces mayor que a pH de 7.4, pero si se hiperpolariza la célula a -90 mV esta conductancia se incrementa diez veces (Warner, 1972); el efecto del pH ha sido similar en otras células, la conductancia se incrementó a potenciales negativos y disminuyó a potenciales positivos (Shapiro y DeCoursey, 1991). También se han observado cambios en la probabilidad de apertura (P_o) por cambios en el pH (Blatz, 1991).

1.7.2. Canales de Cl⁻ dependientes del voltaje.

En general, el Cl⁻ no tiene una participación directa en la excitabilidad de la célula como el Na⁺, el K⁺ y el Ca²⁺. Los canales de Cl⁻ dependientes de voltaje son importantes ya que su conductancia contribuye a estabilizar el potencial de membrana de la célula cerca de los límites fisiológicos, y en consecuencia mantiene su excitabilidad dentro de los parámetros normales. Los canales dependientes del voltaje se pueden clasificar en tres categorías, 1) activados por hiperpolarización, 2) activados por despolarización, 3) inactivados por polarización.

Los canales activados por despolarización se describieron por primera vez en neuronas de *Aplysia* (Chesnoy-Marchais, 1982). La activación del canal es lenta con una constante de tiempo de cientos de milisegundos, su compuerta tiene características semejantes al las del canal de K⁺ de la rectificación entrante, su conductancia máxima es de 10-15 pS (Chesnoy-Marchais y Evans, 1986); incrementan su P_o a potenciales positivos, y disminuye el tiempo en el estado cerrado.

Un ejemplo de canal de Cl⁻ activado por hiperpolarización es el canal “doble-cañon” del *Torpedo*. su activación es dependiente del voltaje, y su cinética de activación puede ser descrita de acuerdo a la función de Boltzmann (Blatz, 1991).

Los canales inactivados por polarización se activan a voltajes cercanos a 0 mV y se cierran a potenciales positivos o negativos (Gray *et al.*, 1984); este tipo de comportamiento se ha descrito en canales de Cl⁻ en cultivos de células de Schwann, músculo esquelético de rata y macrófagos (Blatz y Magleby, 1983; Schwarze y Kolb, 1984). Se ha observado que la dependencia al voltaje de estos canales es menor que la observada en algunos canales de Na⁺ y K⁺, y su constante de tiempo de activación es mucho mayor que la de estos canales.

1.7.3. El canal CIC-0 del órgano eléctrico del *Torpedo*

Uno de los canales de cloruro que se ha estudiado con mayor detalle, tanto por técnicas electrofisiológicas como de biología molecular, es el canal CIC-0 del *Torpedo*, lo que ha contribuido para entender más acerca de la función de los canales de cloruro. El canal CIC-0 se caracterizó en neuronas del órgano eléctrico del *Torpedo californica* (White y Miller, 1979; Miller y White, 1984). En estudios de biología molecular se ha descrito que este canal está constituido por una cadena de 805 aminoácidos (aa), cuenta con nueve dominios hidrofóbicos de 20-25 aa que se arreglan en forma de α hélice, se encuentran otros cuatro segmentos transmembranales que no se arreglan en α hélice, cuenta con un sitio de fosforilación dependiente de cinasas activados por AMPc entre los segmentos de las subunidades D12 y D13; presenta un “doble-cañon” o sea un sistema de dos poros compuesto por un homodímero formado por dos monómeros idénticos con un

solo mecanismo de compuertas, que también presenta un sistema adicional de compuertas de apertura y de cierre para cada monómero, con una frecuencia de apertura y cierre de un orden de magnitud mayor que la de un mecanismo de compuerta común (Miller y White, 1984).

El modelo de "doble-cañon" describe a un homodímero funcional compuesto por dos protocanales, cada uno de éstos puede ser un oligómero de dos o más proteínas idénticas. La estructura de los canales diméricos o más comúnmente multiméricos puede ser un fenómeno generalizado, ya que se han descrito en nefronas de conejo (Sansom *et al.*, 1990), neuronas de *Aplysia* (Chesnoy-Marchais, 1990), y un ejemplo semejante se presenta en miocitos cardiacos con el canal "triple-cañon" (Matsuda *et al.*, 1989).

La compuerta de este canal tiene características muy particulares, por lo que ha sido objeto de diversos estudios para describir sus propiedades cinéticas. Pusch *et al.* (1995) describen que la compuerta rápida y la lenta del canal sufren modificaciones por factores externos a él, como cambios en la concentración extracelular de Cl^- ; al incrementar la concentración extracelular, la apertura del canal se ve facilitada, lo que sugiere que el mecanismo de la compuerta está relacionado con la permeación del ion, probablemente por medio de la unión del ion a distintos sitios en el poro (Franciolini y Nonner, 1987), así, cuando se ocupan estos sitios la compuerta modifica su cinética, mostrando una gran dependencia de las concentraciones extracelulares de Cl^- , por lo que se propuso que la compuerta del canal se constituía por el propio ion que permea; otras evidencias que muestran al ion Cl^- como la compuerta del canal CIC-O las aportan Ludewig *et al.* (1997) por medio de experimentos de biología molecular en los que se realizaron mutaciones puntuales en la subunidad D12, en la que se sustituyó la lisina de la posición 519 por

glutamato, se provocaron cambios electrostáticos en los aminoácidos de esa región, lo que modificó la cinética de la compuerta rápida de uno de los poros, así como también la P_o . Una explicación probable de esto puede deberse a cambios en la unión del ion con su sitio de afinidad en el poro al permear a través de él; por otra parte, se observó que la compuerta lenta del canal cambia su cinética cuando se modifica la concentración intracelular de Cl^- (Ludewig *et al.* 1997).

Como ya se mencionó, el canal "doble-cañón" está constituido por dos poros idénticos, cada uno abre y cierra independientemente a través de un mecanismo de compuerta; se ha sugerido que la compuerta rápida pertenece sólo a uno de los protocanales, y la lenta pertenece a los dos (Middleton *et al.*, 1996; Ludewig *et al.*, 1996), lo cual apoya la hipótesis de que el canal tiene dos mecanismos de compuerta independientes y separados; en el primero, la transición del canal entre el estado activado y el inactivado es dependiente del voltaje, y en esta fase el canal se activa a potenciales hiperpolarizantes incrementando la probabilidad de las salvas o ráfagas de actividad; el segundo mecanismo se puede observar, cuando la compuerta rápida muestra una dependencia del voltaje a potenciales despolarizantes, presenta un incremento de la probabilidad de apertura de los protocanales dentro de las salvas (Miller, C, y Richard, E. 1990). Este canal de Cl^- muestra una cinética compleja en la cual el canal puede transitar entre cuatro estados: un estado inactivado y tres subestados U, M y D que corresponden a tres niveles de conductancias, 20, 10 y 0 pS, respectivamente (Miller, 1982; 1984).

1.7.4. Canal de Cl⁻ acoplado a el receptor GABA_A

El estudio de este receptor aportó información acerca de los diferentes sitios receptores que posee; se determinó que una gran variedad de sustancias tanto endógenas como externas presentan afinidad para la unión con él; dicho receptor presenta cinco dominios de unión funcional; 1) sitio de unión a GABA (agonistas y antagonista). 2) sitio de unión a esteroides como los anestésicos (volátiles). 3) sitio de unión a barbitúricos y etanol. 4) sitio de unión a la picrotoxina. 5) sitio de unión a benzodiazepinas (agonistas y antagonistas) (Macdonald y Olsen 1994). Esta característica del receptor originó el concepto del complejo supramolecular del receptor a GABA_A (Olsen 1981).

Mediante técnicas de biología molecular se pudo establecer que el receptor a GABA_A está constituido por cinco subunidades, denominadas α , β , γ , δ y ρ ; en sí, cada una de estas subunidades tiene a su vez múltiples subtipos, así tenemos a las subunidades α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ y ρ 1-2. El receptor GABA_A junto con el canal iónico al cual está acoplado, constituyen un complejo glicoproteico heteropentamérico, de 275 kDa, el cual se constituye funcionalmente como una unidad, de tal forma que cuando el GABA o algún fármaco con sitio de afinidad en el receptor se une a dicho sitio, se produce la apertura de un canal aniónico que principalmente permite la permeación de Cl⁻. El receptor-canal de GABA al activarse, presenta múltiples niveles de conductancia que varían entre 27-30 pS, 17-19 pS y 11-12 pS; pero el nivel de conductancia responsable de más del 95% de la conductancia del canal es el de 27-30 pS; se desconoce el mecanismo por el cual el canal genera los diferentes niveles de conductancia, pero por medio de experimentos de biología molecular en los que en líneas de fibroblastos transfectados se

produjeron mutaciones en las subunidades $\alpha 1\beta 1$ del receptor a GABA, evidenciando que estas unidades participaban de manera significativa en las conductancias pequeñas de 15-18 pS; por otra parte las mutaciones realizadas en las subunidades $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ mostraron una influencia sobre la conductancia de 33 pS (Macdonal y Olsen 1994).

La compuerta de activación del receptor a GABA parece tener un comportamiento complejo; presenta tres diferentes estados de apertura con promedio de duración de 0.5, 2.6 y 7.6ms. el promedio de la duración de la apertura se incrementa al incrementar la concentración de GABA en el medio extracelular; a concentraciones bajas de GABA se observan aperturas breves, a concentraciones mayores es frecuente la presencia de dos aperturas de gran duración. En cuanto el estado cerrado se observan múltiples estados, entre estos dos de duración pequeña (0.2 y 1.4ms) y tres de duración promedio mayor, generando así salvas compuestas por aperturas repetidas dentro de un mismo estado de apertura. En resumen el modelo cinético del canal-receptor esta conformado por una secuencia de dos sitios de unión a GABA, tres estados abiertos, diez estados cerrados y un estado inactivado (Macdonal *et al* 1989; Twyman y Macdonal 1992).

2. ANTECEDENTES

2.1. Regulación de los circuitos hipocampales

En la fisiología del hipocampo, el control sináptico de la transferencia de información a través de los diferentes circuitos, es un mecanismo básico de regulación de su excitabilidad. Los mecanismos de control pueden influir de manera muy significativa sobre la génesis y conducción de la actividad eléctrica, así, como también en posibles alteraciones locales. En el caso del kindling se postula que las alteraciones de los circuitos involucran cambios químicos, anatómicos y funcionales que modifican de manera sustancial la excitabilidad del sistema. Las modificaciones pueden ocurrir en puntos específicos del circuito; al alterarse la función de uno, influirá sobre otro, y este, a su vez sobre un tercero, etc., constituyendo una serie de eslabones funcionales que en conjunto pueden establecer aberraciones fisiológicas permanentes e irreversibles. Uno de los elementos involucrados en este control lo constituyen las interneuronas de las células piramidales, las cuales tienen un papel modulador muy relevante.

Dentro de las interneuronas que participan en estos circuitos encontramos a las células en canasta, las cuales reciben sinapsis excitadoras de fibras colaterales aferentes de axones de células piramidales, que cursan en el *estratum radiatum* y en el *estratum oriens*, las células en canasta establecen sinapsis inhibitorias en el soma y en la parte inicial de las dendritas apicales de las células piramidales (Andersen *et al.*, 1980). Otro tipo de interneuronas son las *oriens-alveus* (O/A), las cuales reciben sinapsis excitatorias de fibras aferentes colaterales de axones de células piramidales que cursan en el *alveus* y en el *estratum radiatum*, posteriormente establecen sinapsis inhibitorias con las células piramidales y posiblemente con las células en canasta (Fig. 4).

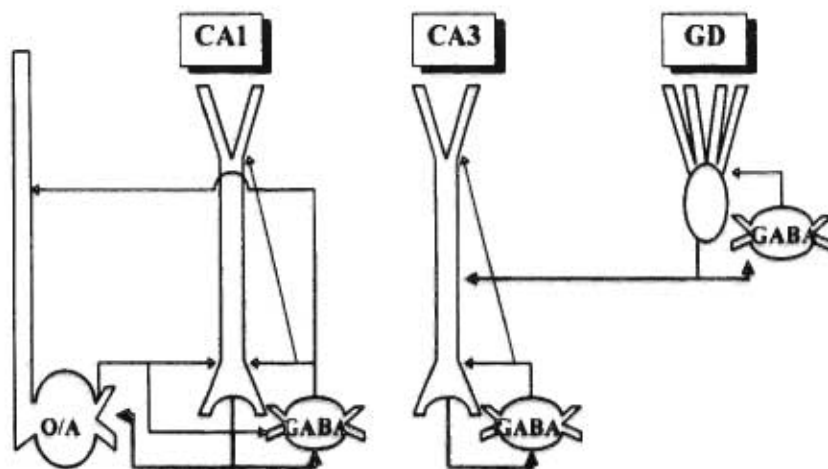


Fig. 4. Esquema de las sinapsis que se establecen entre las interneuronas y células del área de CA1, CA3 y GD.

El tipo de células esquematizadas son: células piramidales de CA1 y CA3, células granulares del giro dentado (GD), interneuronas GABAérgicas (células en canasta) e interneuronas *oriens-alveus* (O/A).
 →, sinapsis inhibitoria, →, sinapsis excitatoria. (Modificado de López Da Silva *et al.*, 1990).

Una característica importante de estos circuitos es que las fibras aferentes pueden excitar rápidamente a las interneuronas en canasta y a las O-A antes de que las células piramidales disparen (Lacaille *et al.*, 1987); esto significa que ambos tipos de interneuronas regulan un mecanismo de retroalimentación negativa. Si se aplica glutamato localmente en las dendritas apicales de células piramidales de CA1, se produce una breve despolarización (50-100 ms) y una respuesta hiperpolarizante de larga duración (300-500 ms), esto se genera por que al aplicar el glutamato también se activan las interneuronas GABAérgicas que convergen en las células piramidales (Taube y Schwartzkroin 1987).

En la regulación inhibitoria señalada, el GABA juega un papel muy importante, ya que es el principal mediador de las sinapsis de estas interneuronas (Miles y Wong 1984).

2.2. Participación del GABA y el cloruro en la regulación hipocampal

Los receptores a GABA están muy concentrados en la capa molecular del giro dentado y de CA1 (Storm-Mathisen *et al.*, 1983), debido a la abundante población de células en canasta que se encuentran en esta zona (Knowles y Schwartzkroin 1981; Ribak y Anderson 1980). En general, las sinapsis GABAérgicas que se establecen entre las células en canasta y los somas de células piramidales producen una hiperpolarización de la membrana (Alger y Nicoll 1979; Andersen *et al.*, 1980), pero esto no se cumple en todos los casos; se ha mostrado que con aplicaciones de GABA por iontoforesis en células piramidales de CA1 y CA3 se producen respuestas diferentes dependiendo del sitio de aplicación; en la capa celular, el GABA produce predominantemente una hiperpolarización, pero cuando se aplica en las dendritas apicales, la respuesta es predominantemente una despolarización; este tipo de respuesta puede ser originado por múltiples factores: La respuesta hiperpolarizante pudiera ser el resultado de la activación de los receptores sinápticos a GABA que se encuentran en alta concentración en el soma y en el segmento inicial del axón de las células piramidales. La respuesta despolarizante provocada en el árbol dendrítico podría ser el resultado de la activación de receptores extrasinápticos al GABA (Alger y Nicoll 1982). A pesar de que el receptor a GABA promueve la permeación de Cl^- , puede generar respuestas divergentes, ya sea una despolarización o una hiperpolarización, esto puso de manifiesto la participación que tiene el Cl^- en la regulación por GABA, dependiendo de la fuerza impulsora para el Cl^- ($E_m - E_{\text{Cl}}$), será el sentido del flujo iónico; si el potencial de equilibrio del cloruro (E_{Cl}) es más negativo que el potencial de membrana (E_m), el gradiente electroquímico del Cl^- a través de la membrana está a favor del interior, por lo que al incrementar la conductancia a

Cl⁻ en esta condición, promovería un flujo hacia el interior de la célula, con la consecuente hiperpolarización de la membrana; en el caso contrario, cuando el E_{Cl} es más positivo que el E_m , el gradiente electroquímico del cloruro está a favor del exterior: un incremento en la conductancia bajo esta circunstancia puede generar un flujo hacia el exterior de la célula, provocando la despolarización de la membrana. Se ha mostrado en rebanadas de hipocampo que la fuerza impulsora para el flujo de Cl⁻ tiene direcciones opuestas en las células piramidales de CA3 y en las células granulares del giro dentado (Misgeld *et al.*, 1986), lo que podría explicar por qué la respuesta de la aplicación somática de GABA en las células de CA3 es predominantemente hiperpolarizante y en las células granulares es despolarizante (Crunelli *et al.*, 1983).

El hecho de que en muchas células nerviosas el E_{Cl} sea más negativo o más positivo que el E_m , significa que el Cl⁻ presenta una distribución transmembranal fuera del equilibrio electroquímico; en consecuencia, requiere de mecanismos de transporte activo, como el cotransporte de Cl⁻. Misgeld *et al.* (1986) postuló que la actividad intracelular del Cl⁻ en las neuronas hipocampales está determinada por dos mecanismos, uno, por acumulación en el interior de la célula y otro, por extrusión. Es necesario un acarreo de cloruro hacia el exterior para mantener bajos los niveles intracelulares y que el E_{Cl} sea más negativo que el E_m . Así mismo para que el E_{Cl} sea más positivo que el E_m se requiere de un acarreo de cloruro hacia el interior, acumulándolo dentro de la célula.

En particular, la regulación de la excitabilidad de los circuitos hipocampales se produce por medio de sinapsis inhibitorias que mantienen en niveles normales la excitabilidad de las neuronas; si esta inhibición está ausente (desinhibición) puede constituirse en un factor endógeno

para la génesis de descargas epilépticas (Korn *et al.*, 1987; Thompson y Gähwiler, 1989a). La desinhibición promueve cambios en el flujo del Cl⁻ a través de la membrana celular por modificaciones en su fuerza impulsora durante los potenciales posinápticos inhibitorios (PPSI). Cuando se aplican estímulos tetánizantes de 3-10 Hz durante 30 a 60 s. en las fibras aferentes de las células musgosas, se produce un incremento en la concentración intracelular del Cl⁻, produciendo una modificación de 2-7 mV en el potencial de equilibrio, lo que genera una disminución del 49% de la fuerza impulsora para el Cl⁻, debido a una reducción del 22% en la conductancia al Cl⁻ durante el PPSI (Thompson y Gähwiler, 1989a,b), lo que lleva a pensar que patrones de estimulación similares como los utilizados en el kindling, pueden producir este tipo de respuestas, donde el Cl⁻ se perfila como un elemento importante de control o de facilitación en las alteraciones de la transmisión en los circuitos hipocampales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las funciones del Cl^- en algunas células excitables, es la de contribuir a la repolarización de células despolarizadas, teniendo así una influencia estabilizadora sobre el potencial de membrana (Hille, 1992). Las células hipocampales están sometidas a un control inhibitorio que regula su excitabilidad, por lo que al provocar alteraciones de esta inhibición (desinhibición) se podría facilitar la generación de descargas epilépticas (Korn *et al.*, 1987; Thompson y Gähwiler, 1989a,b; Lipicky *et al.*, 1971); como parte de dicho control el Cl^- tiene una participación relevante, por medio de distintas formas, como son; la activación de canales de Cl^- que forman parte del receptor postsináptico a GABA (receptor GABA_A), la activación del receptor presináptico a GABA, la activación de canales de Cl^- dependientes de calcio, el cotransporte de Cl^- / K^+ o $2\text{Cl}^- / \text{K}^+ / \text{Na}^+$ (Alvarez-Leefmans, 1990). En algunos modelos de epilepsia experimental, donde al perderse el control inhibitorio del sistema se presenta un estado de hiperexcitabilidad que genera descargas de tipo epileptiforme, se ha dado evidencia de la participación del Cl^- en dichos procesos; aunque este ion podría contribuir por medio de distintos mecanismos que permitan su permeación, un elemento importante para dicho fin lo podrían constituir los canales iónicos. Hasta la fecha se desconoce cual es la participación del canal de Cl^- en el fenómeno de la hiperexcitabilidad neuronal inducida por kindling; así, como también cuáles son las características de este canal en dicho proceso. Por lo que el propósito de este trabajo de tesis consistió en estudiar las propiedades del canal de Cl^- durante el fenómeno de la hiperexcitabilidad celular inducida por kindling en células granulares del hipocampo de rata, y

con base en esto, discutir su participación dentro de los mecanismos de regulación inhibitoria del hipocampo.

4. HIPÓTESIS

Considerando los mecanismos de regulación inhibitoria de los circuitos hipocampales en los que el Cl⁻ participa de manera relevante, se puede proponer como hipótesis de trabajo que:

Durante el proceso de la hiperexcitabilidad neuronal, como la producida en el caso del kindling, los canales de Cl⁻ de la membrana de los elementos neuronales del hipocampo, pueden participar como otro más de los mecanismos de regulación del flujo de cloruro que contribuya a la inhibición o desinhibición de los circuitos hipocampales, mediante un posible incremento en la densidad de canales de cloruro, o bien, por modificaciones en sus propiedades cinéticas tales como: variaciones del tiempo de apertura, variaciones de la conductancia unitaria, o variaciones en el número de canales disponibles para ser abiertos. Al ocurrir alguna o varias de estas modificaciones en los canales de Cl⁻, esto podría contribuir a producir cambios en las concentraciones del Cl⁻, tanto a nivel intracelular como extracelular, lo que podría modificar su fuerza impulsora promoviendo un flujo de Cl⁻ hacia el interior o el exterior de la célula, con el consecuente cambio en el potencial de membrana de la célula según sea el caso. Así, los canales de Cl⁻ podrían contribuir o no a mantener la inhibición del sistema favoreciendo o no la desinhibición del mismo, como se ha descrito para otro tipo de canales de cloruro (Misgeld *et al* 1986; Tompson, S. and Gähwiler, B. 1989a,b).

5. OBJETIVOS

5.1 Estudiar la características de la actividad del canal de Cl^- en neuronas granulares de hipocampo, tanto de ratas testigo como. de ratas con kindling inducido.

5.2 Inducción de kindling eléctrico en ratas macho de la especie wistar.

5.3 Registro de corrientes de cloruro con la técnica de patch-clamp en la modalidad de registro de canal único.

5.4 Análisis de las corrientes unitarias de Cl^- registradas de neuronas de ratas testigo y en las que se haya inducido kindling; examinando la magnitud de la corriente, la probabilidad de apertura, el tiempo abierto del canal, la frecuencia de las salvas de actividad y análisis para determinar niveles de subconductancia de la corriente del canal.

6. MÉTODO

6.1. Preparación biológica

Los registros de corriente de Cl^- en este trabajo de tesis se realizaron en neuronas de hipocampo de rata disociadas agudamente (Gray y Johnston, 1985; Mody *et al.*, 1989); la técnica, se adaptó a las necesidades del trabajo. Se utilizaron ratas macho de la especie wistar con un peso de 120 a 140 g.; bajo anestesia superficial con éter, se decapitaron y se extrajo el cerebro, en un tiempo que no rebasó los 2 min. El cerebro se colocó en una solución de composición similar al líquido cefalorraquídeo, llamada solución de líquido cerebro espinal artificial (LCEA), la cual contenía 5 mM de EGTA para quelar el calcio libre (Tabla 2 sol D.); previamente, se saturó durante una hora con una mezcla de O_2 95% y CO_2 5% (carbógeno) a una temperatura de 3 a 5°C; a esta temperatura el tejido reduce su metabolismo, incrementando su tiempo de viabilidad y adquiere mayor firmeza para los cortes. Posteriormente, se realizaron cortes corónales de aproximadamente 800 a 1000 μm de grosor; por medio de disección roma se extrajo el hipocampo; bajo el microscopio de disección se obtuvieron mediante cortes, rebanadas del hipocampo de aproximadamente 300 μm de grosor, estas rebanadas se cortaron en fragmentos no mayores de 2 mm, posteriormente los fragmentos de hipocampo se incubaron con proteasa tipo XXV (Sigma; 1.5mg/ml) en LCEA libre de calcio, previamente saturado con carbógeno; el volumen utilizado para incubar fue de 2 ml, el tiempo de una hora y la temperatura de 31°C; a esta temperatura se incrementa la cinética de la enzima, se observó que una hora de incubación fue el tiempo óptimo para obtener una población abundante y en buenas condiciones de neuronas. Transcurrida la hora de incubación, la solución de la enzima se lavó repetidas veces con solución LCEA con Ca^{++} a temperatura de 5°C. Se adaptó una punta de microjeringa de 100

μ l a una pipeta Pasteur, y con esta se realizó una succión suave del tejido, haciéndolo pasar por la punta de microjeringa; maniobra que permite la disociación las células; posteriormente, éstas se colocaron dentro de la cámara de registro en la solución de LCEA con Ca^{++} (Tabla 2 sol. E) a temperatura ambiente (20 a 25°C) y saturada previamente con carbógeno.

Las células obtenidas con esta técnica tienen como característica el conservar sus prolongaciones axónicas y dendríticas, aproximadamente en el 80% de las células se identifican ramificaciones primarias, en un 15% se identifican ramificaciones secundarias y 5% no presentan ramificaciones, adquiriendo una morfología esférica; estas propiedades permiten identificar las células de acuerdo a su morfología y sólo seleccionar el grupo celular deseado (Fig. 5.). En este trabajo sólo se seleccionaron neuronas de tipo granular para registro.

La cámara donde se efectuaron los registros consta de una poza principal de 3.5 ml de capacidad; dentro de esta poza se encuentra un compartimiento construido con un tubo de plástico (tygon) de 1.5 milímetros (mm) de diámetro, conectado en uno de sus extremos a una jeringa de 5 ml, y el otro extremo a una fosa colectora de la solución; el tubo tenía un orificio de 0.5 x 0.5 mm, en donde se introducía la punta de la pipeta patch para exponer la membrana del sello en la configuración de parche evertido, a las soluciones de prueba durante el registro; el flujo de la solución fue de 3.6 L por hora. Las soluciones de prueba fueron: solución asimétrica de cloruros y solución simétrica de cloruros libre de calcio; la composición de las soluciones se muestra en la tabla 2.

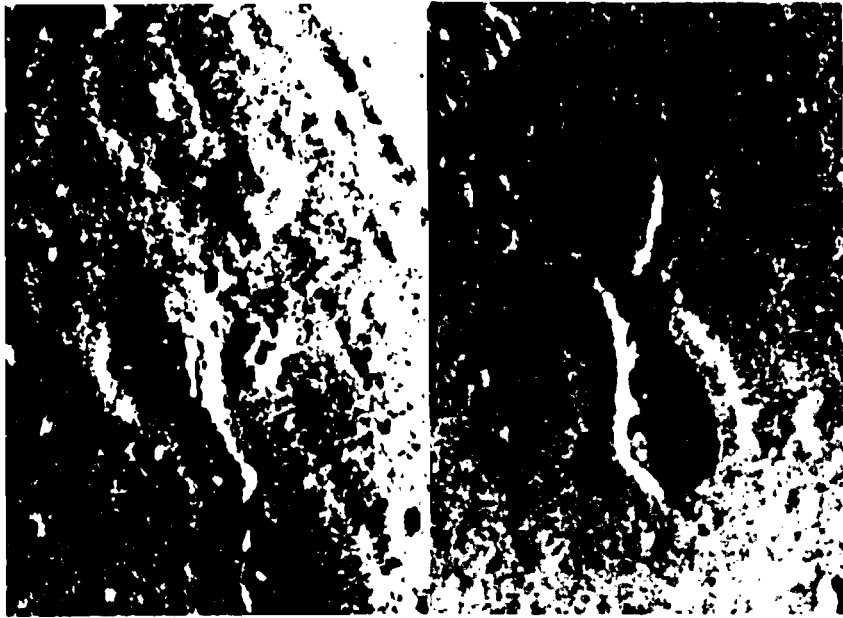


Fig. 5. Neuronas del giro dentado del hipocampo disociadas agudamente.

Fotomicrografía de contraste de fases de neuronas, disociadas del área del giro dentado de rebanadas de hipocampo (de ratas de 120 gr de peso). Se muestran dos neuronas granulares, en las que se puede observar las ramificaciones primarias.

6.2. Método electrofisiológico

El método empleado para el registro de las corrientes de Cl^- , fue el descrito por Hamill *et al.*, (1981) denominado fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp), que consiste en aislar eléctricamente una microárea de membrana del resto de la célula, mediante un sello de alta resistencia entre la membrana celular y una pipeta de vidrio llena de solución salina, permitiendo así registrar las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana en ese segmento de membrana. El sello se forma al crear presión negativa dentro de la pipeta de vidrio que se encuentra sobre la membrana de la célula, parte de la membrana se introduce en la punta de la pipeta dejando una microárea de membrana en contacto con la solución de la pipeta; la parte de membrana que se relaciona con las paredes internas de la pipeta forma un sello de alta resistencia del orden de los

gigaohmios ($G\Omega$), denominándose a éste configuración de adherido a la célula (on-cell), cuando la microárea de membrana que se encuentra dentro de la punta de la pipeta y no está separada de la célula; al mover con cierta rapidez la pipeta se puede separar el parche de membrana del resto de la célula, dejando expuesta la cara intracelular de la membrana a la solución del baño y la cara extracelular de la membrana a la solución de la pipeta; a esta configuración se le conoce como parche evertido (inside-out) (Fig. 6.). Todos los registros de este trabajo de tesis se realizaron bajo esta última configuración.

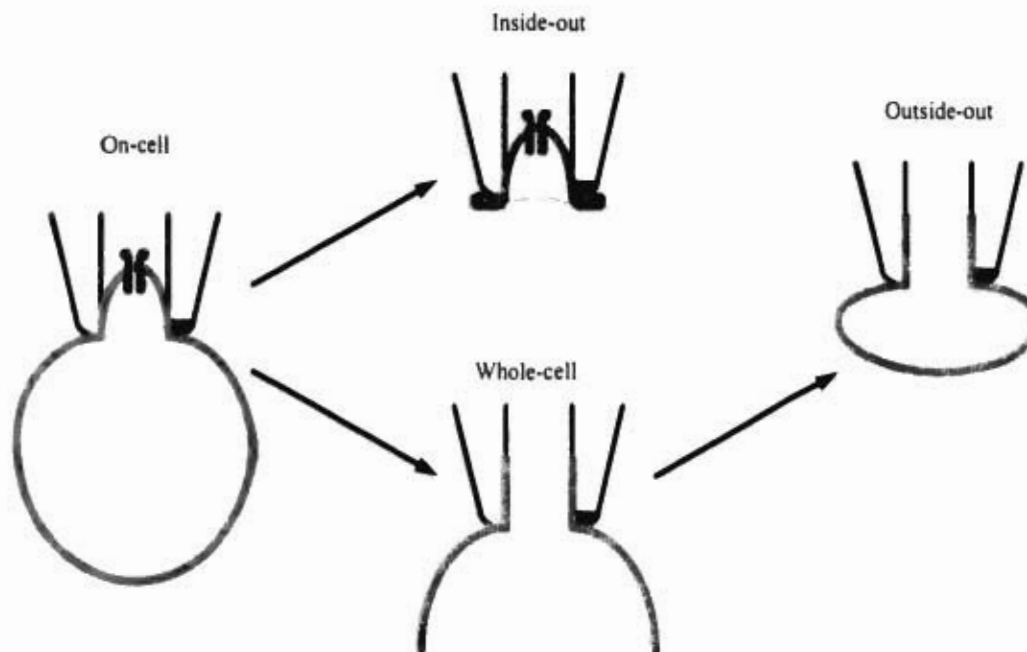


Fig. 6. Diferentes configuraciones de la técnica de patch-clamp.

Cuatro diferentes configuraciones de registro de la técnica de patch-clamp. El sello de alta resistencia que se forma entre la pipeta y la membrana de una célula, permite registrar la corriente iónica que fluya a través del canal o canales presentes en el área libre de membrana dentro de la pipeta. Primero se realiza el sello en la célula completa (On-cell), posteriormente es posible romper el área libre de membrana (Whole-cell), si, se separa de la célula se forma una vesícula (Outside-out); otra configuración se forma cuando se separa el sello de la célula completa (Inside-out). (Tomado de Hille, 1992).

6.3. Elaboración de las pipetas de registro

Para la elaboración de las pipetas se utilizaron capilares de vidrio duro (borosilicato) K_{MAX} . WP. Es importante seleccionar el vidrio adecuado, ya que al formarse el sello entre la membrana y la pipeta se establece una estrecha interacción entre el vidrio de la pipeta y la membrana celular, lo que favorece interacciones químicas entre estos dos elementos. Algunos tipos de vidrio liberan componentes solubles que modifican las propiedades cinéticas de los canales iónicos (Cota y Armstrong, 1988).

La selección de capilares de vidrio duro, también obedeció a que con éste se facilita la elaboración de las pipetas con punta y dimensiones apropiadas, que permitan registrar las corrientes en un área de membrana adecuada y con un nivel bajo de ruido; con el vidrio de borosilicato (duro) las propiedades de sellado son mejores (Sakmann y Neher, 1983), el espesor de las paredes es mayor reduciendo la capacitancia del electrodo, lo que disminuye el nivel de ruido de las corrientes (Ogden y Stanfield, 1987).

Las pipetas se fabricaron en un estirador horizontal Sutter Instrument. P-87. El electrodo se fabricó mediante el estiramiento del capilar en dos pasos; en el primero la tracción se logró haciendo pasar 32 amperios (A) a través del selenoide, el calor de la resistencia se obtuvo con 18.6 A, con estos parámetros, el capilar se estira cerca de 8 mm y su diámetro se reduce aproximadamente hasta 200 μm . El estiramiento del capilar se realiza desde sus dos extremos, por lo que no es necesario recentrar la pipeta para el segundo paso, como sucede con algunos estiradores verticales; en el segundo paso de estirado se aplicó la tracción producida por una corriente de 8 A en el selenoide, el calor de la resistencia se estableció con 16 A; de esta forma se

obtienen dos pipetas con punta, aproximadamente de la misma dimension; el diámetro de las puntas fue cercano a $1\ \mu\text{m}$, y su resistencia después de ser llenadas con solución salina, fue de 5 a $10\ \text{M}\Omega$.

6.4. Formación de los sellos de alta resistencia

Cuando se aísla la microárea de membrana, es muy importante que el sello que se forma entre las paredes de vidrio y la membrana sea de la mayor resistencia posible, dado que mientras mayor sea la resistencia del sello, mayor será el aislamiento eléctrico de la membrana y de esta forma se reducirá el ruido del registro, permitiendo una mejor resolución temporal de las corrientes iónicas.

Para formar un sello de alta resistencia, deben tomarse en cuenta varios parámetros que influyen de manera importante. Hamill *et al.*, (1981) describieron que para la formación de sellos de entre 10 a $100\ \text{G}\Omega$ es necesario mantener limpia la punta de la pipeta, por lo que sólo se puede utilizar una para cada intento de obtener un sello. Las soluciones tanto del baño como de la pipeta fueron filtradas para evitar elementos extraños a ellas; al atravesar la pipeta la interfase aire-agua se aplicó presión positiva para evitar que se pegue a la punta cualquier elemento que la ensucie, esta presión se mantiene hasta que la punta de la pipeta haga contacto con la membrana celular. Para la formación del sello, una vez que la pipeta hace contacto con la membrana se aplica una ligera succión (presión negativa), promoviendo que ocurra el sellado entre la pipeta y la membrana, esto se puede monitorear por medio de un osciloscopio, al observar un incremento de la resistencia de la pipeta hasta encontrarse en el rango de los $\text{G}\Omega$. Posteriormente, se ajusta la corriente a cero; en este momento el sello se encuentra en la configuración de adherido a la célula (on-cell), por lo que se procede a levantar rápidamente la pipeta para desprender la membrana del sello, del resto de la

célula, obteniéndose así, la configuración de parche evertido (inside-out) (Fig. 6). En algunos casos, durante la maniobra para obtener la configuración de "inside-out", se formó una microesfera de membrana en la punta de la pipeta, mediante la exposición de esta microesfera a una interfase aire agua, se consigue romperla y obtener la configuración de inside-out.

6.5. Soluciones de registro

En la tabla 2, se muestra la composición de las diferentes soluciones empleadas en este trabajo de tesis. Las soluciones fueron diseñadas para tener al Cl^- como único anion que puede permear, así, la solución empleada en la pipeta contenía tetraetilamonio (TEA) y Cs^+ como bloqueadores de canales de potasio y son los principales cationes, la concentración de Cl^- en ésta fué de 120 mM (Tabla 2, sol. A). La solución del baño que se utilizó fue la de LCEA con Ca^{++} (Tabla 2, sol. E); esta solución también se empleo para registrar las corrientes de Cl^- en presencia de Ca^{++} y en condiciones simétricas de Cl^- (120 mM). Para probar la dependencia al calcio del canal de Cl^- se utilizó etilenglicol-bis (b-aminoetileter) N, N, N',N'-ácido tetraacético (EGTA), como quelante de Ca^{2+} (Tabla 2, sol B). Para registrar las corrientes de Cl^- en concentraciones asimétricas de este ion, se utilizó una solución con 190 mM de Cl^- (Tabla 2 sol C).

6.6. Inducción de descargas de tipo epileptiforme (kindling) en ratas

Para la inducción de descargas de tipo epileptiforme (epilepsia) se han utilizado muchos modelos basados en diferentes técnicas; una de las más difundidas es el kindling, un modelo de epilepsia que consiste en una estimulación focal repetida que induce cambios plásticos, progresivos y permanentes en las neuronas. El tipo particular de kindling que se indujo en este trabajo fue el conocido como eléctrico, ya que se basa en estímulos de este tipo, (de Florida y Delgado, 1958).

Tabla 2. Composición de las soluciones de registro (mM)

	SOL "A"	SOL "B"	SOL "C"	SOL "D"	SOL "E"
CaCl ₂	--	--	--	--	2
Ca(OH) ₂	2	--	--	--	--
CsCl	100	--	--	--	--
NaCl	--	--	--	111	111
NaH ₂ PO ₄	--	--	--	1.25	1.25
KCl	--	--	--	5	5
MgSO ₄	--	--	--	2	2
MgCl ₂	--	2	2	--	--
TEA-Cl	20	116	186	--	--
EGTA	--	10	10	5	--
α-D-GLU.	--	--	--	10	10
HEPES	10	10	10	26	26
pH 7.4	(TEA OH)	(TEA OH)	(K OH)	(Na OH)	(Na OH)

A) Solución de la pipeta, B) Solución simétrica de cloruro sin Ca⁺⁺, C) Solución asimétrica de cloruro, D) Solución de líquido cefalorraquídeo sin Ca⁺⁺ (sol. dispersión), E) Solución de líquido cefalorraquídeo artificial con calcio (sol. baño).

El kindling eléctrico es un modelo que ofrece diferentes ventajas: 1) Este modelo tiene una alta reproducibilidad, aun en diferentes especies animales como reptiles, anfibios, roedores, felinos, caninos y primates; mientras más complejo es el sistema nervioso de la especie animal en la que se induce el kindling (mamíferos), más complejas y severas son las convulsiones que se generan. 2) No se aplican sustancias químicas que pudieran interferir con el estudio de la fisiopatología del fenómeno. 3) Una vez que se establece el kindling su efecto en general es permanente y espontáneamente irreversible. 4) Los cambios que se generan no se restringen solo al área de estimulación, es posible estudiar otras regiones que se encuentren comunicadas por vías nerviosas, con el sitio original de estimulación; esto demuestra, junto con diferentes estudios, que las modificaciones que se producen involucran a la transmisión sináptica. 5) Es posible monitorear la actividad epileptiforme tanto electrofisiológicamente (EEG), como por la evolución conductual del

animal. 6) Las crisis son de corta duración (20-40 s), y una vez que transcurrió esta, los animales muestran un aparente comportamiento normal; debido a esto es que se ha generalizado su uso.

Para la inducción del kindling se realizaron los siguientes pasos: Se utilizaron electrodos concéntricos de acero inoxidable; en el extremo distal de la camisa del electrodo se retiró el barniz de aislamiento, dejando descubierta una zona en forma de anillo de aproximadamente 1mm, esta zona cierra circuito con la punta del polo central; la distancia entre el anillo de la camisa y el polo central fue de 3mm.

Por medio de la técnica estereotáxica se implantó el electrodo en la vía perforante del hipocampo; las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral a una dosis de 320 mg/kg. Debido a que las ratas empleadas son de un peso de 120 a 140 g, y las coordenadas de los atlas de estereotaxia son para ratas de 270 a 310 g, fue necesario adaptar las coordenadas. Después de realizar las pruebas, y con el control histológico, se establecieron las coordenadas en: posterior a bregma P-6 mm, lateral a la línea media L-3.6 mm y profundidad a partir de la dura madre 2.5 mm. Los electrodos implantados se fijaron al cráneo por medio de acrílico autopolimerizable (rápido), de uso dental. Posterior a la cirugía, se mantuvo a las ratas en jaulas individuales, en periodo de recuperación postquirúrgica por 7 días.

Un grupo de 15 ratas a las cuales se les implantó el electrodo, se tomaron para estimulación simulada, es decir solo se les implanto el electrodo pero no recibieron estimulación; con la finalidad de descartar algún posible efecto producto del electrodo o del mismo procedimiento para implantarlo. Antes de iniciar la estimulación, fue preciso determinar la intensidad de la corriente de estimulación, para lo cual se aplicó corriente directa a un tren de estimulación de 60 Hz, con una duración del pulso de 1 ms, y trenes de 2 s de duración, se varió la intensidad de la corriente entre

10 a 50 μ A, hasta que la rata presentó convulsiones tónico clónicas. A partir de este punto, se estableció el valor de la corriente de estimulación por debajo de aquel con el que se obtuvo la respuesta, para posteriormente dar estímulos subumbrales (para la respuesta de convulsión). Después de fijar el valor de estimulación, se mantuvo a la rata en reposos por 7 días y posteriormente se inició el ciclo de estimulación.

La estimulación se aplicó con trenes de 60Hz, la duración del pulso fue de 1ms, y la duración total del tren de 2 s; la intensidad se determinó de acuerdo con el valor de corriente asignado para cada rata. La estimulación se aplicó cada 30 minutos; después de aproximadamente 20 estimulaciones, la rata empieza a presentar una respuesta al estímulo que originalmente no la provocaba. Para evaluar la respuesta, y poder establecer que el kindling se indujo como tal, se calificó la evolución conductual de la rata, de acuerdo a la calificación de Racine (1972), que establece 5 estados: 1) movimientos faciales y de la boca; 2) movimientos repetidos de la nuca. 3) clonus de las extremidades anteriores. 4) adquisición de la posición erecta sobre las patas posteriores y 5) el estado 4 más pérdida del equilibrio (Fig. 7). Una descarga motora generalizada con pérdida del equilibrio se considera una descarga motora clase 5. Una vez calificada la respuesta como clase 5 en tres ocasiones consecutivas se suspendió la estimulación y sólo se repitió una por día, cuando en tres días consecutivos se obtuvo calificación de 5 se daba como establecido el kindling. Una característica importante del kindling es que una vez que se a establecido, la respuesta es permanente y espontáneamente irreversible.

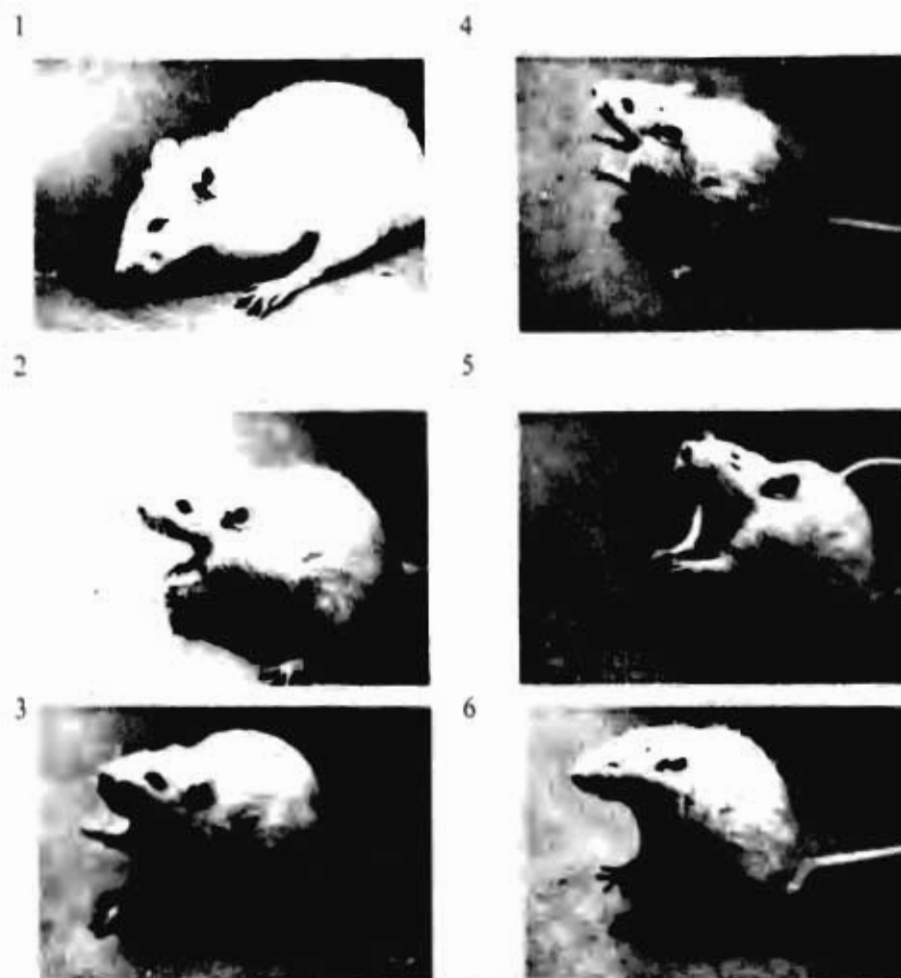


Figura 7. Cambios conductuales posteriores a la estimulación de una rata con kindling inducido.
 Evolución conductual de una rata con kindling inducido; posterior a una estimulación (1-6). La rata inicialmente presenta movimientos repetidos de la cabeza, posteriormente presenta clonus de las patas delanteras, adquiere la posición erecta y finalmente presenta contracciones tónico clónicas generalizadas.

6.7. Captura y análisis de los datos

Para la captura de las corrientes iónicas se utilizó un transductor corriente-voltaje de alta ganancia, el cual contiene una resistencia de retroalimentación (R_f) de $10\text{ G}\Omega$, que ajusta la ganancia (V_o) de acuerdo a la siguiente relación:

$$V_o = -R_f \times i_p + V_{ref}$$

donde el voltaje de salida (V_o) está determinado por la corriente registrada (i_p) y el voltaje dentro de la pipeta (V_{ref}), el cual corresponde a la suma del potencial de mantenimiento (V_{hold}) y el voltaje comando (V_{com}), restados desde la salida (Ogden y Stanfield, 1987). Lo que permite fijar el potencial dentro de la pipeta a un nivel estable.

Las señales analógicas registradas se amplificaron a 0.1-0.2 V/pA con un amplificador Dagan; se filtraron las señales a 2 kHz (filtro pasabajas de 8 polos; Bessel). Las corrientes iónicas así registradas fueron digitalizadas con la ayuda de un convertidor A/D y D/A (Labmaster TM-100), a una velocidad de muestreo de 100 μ s por punto. La captura se controló por una microcomputadora personal AT (Gateway 2000 386-33 Mhz).

En esta tesis solo se reportan los experimentos que se realizaron en estado estacionario, ya que el análisis con pulsos de voltaje no mostró que los canales tuvieran dependencia a este, es decir la transición que lleva al canal al estado abierto no se modificó como una función del voltaje. El potencial de membrana se mantuvo constante durante cinco minutos, tiempo en el cual se efectuó el registro de las corrientes; se utilizó un sistema de videograbación con un procesador digital de 16 bits de resolución. Una vez grabados los registros se capturaron con la computadora y se almacenaron en el disco duro; en la figura 8, se muestra un diagrama del sistema de registro y almacenamiento de las corrientes. Para la captura y análisis se utilizó el programa pClamp V6.0 de Axon Instruments y un programa diseñado por el Lic. en Matemáticas Arturo Aldana Becerra. Es importante mencionar que el potencial de membrana se expresó de manera convencional, el interior con respecto al exterior, y las corrientes salientes se describen con signo positivo.

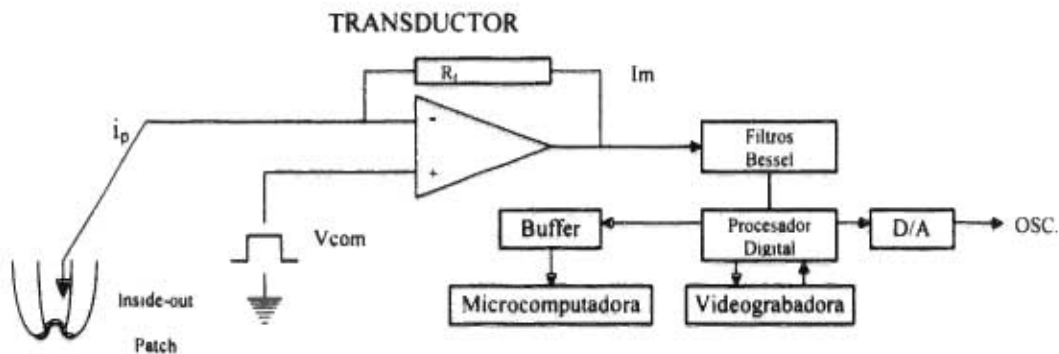


Figura 4. Diagrama del sistema de registro, adquisición y almacenamiento de datos. La punta de prueba del transductor corriente-voltaje ajusta la ganancia por su resistencia de retroalimentación R_f . La información pasa a través de filtros Bessel, posteriormente un procesador digital puede enviar la información a un osciloscopio, una videogradora o a la memoria de una microcomputadora. (modificado de Ogden y Stanfield, 1987).

Para el registro de las corrientes se estableció un protocolo para la activación del canal, debido a que en ocasiones al fijar el voltaje, la actividad del canal era muy escasa, este protocolo fue similar al propuesto por Woll *et al.* en 1987; consiste en que una vez obtenida la configuración de parche evertido, se debe mantener el potencial a un valor despolarizante cercano o igual a +20mV durante algunos segundos o minutos, hasta que las corrientes aparezcan espontáneamente; ya activado el canal se podía mover a cualquier valor el potencial.

Como parte inicial del análisis de los datos se consideró la amplitud de las corrientes, la duración de los periodos de cierre y de apertura y la secuencia en el que ocurren estos eventos. Para determinar las amplitudes y las transiciones de un nivel de corriente a otro, se ajustaron líneas horizontales sobre los niveles de corriente, con esto se obtiene una versión idealizada del registro, que se representa como una serie de transiciones rectangulares entre estados discretos de conductancia que sea muy similar a un registro que estuviera libre de ruido y de artefactos; de esta manera se detectó el cambio de los niveles de amplitud, así como la duración de los eventos de

cierre y de apertura. Un punto importante para evitar errores de medición es mantener las líneas en las posiciones correctas, lo que se consiguió ajustando manualmente la posición de las líneas sobre los niveles de corriente. Para considerar un evento como de apertura o de cierre se utilizó el método del umbral al 50%; este método consiste en fijar una línea horizontal en el nivel de cierre y otra en el nivel de apertura, la corriente que sobrepasa el nivel del 50% entre el cierre y la apertura se designó como estado abierto, y la corriente que se ubicó por debajo de este nivel medio se consideró como estado cerrado (Standen, Gray, y Whitaker, 1989); se obtiene así una estimación de la duración para cada período en que el canal está abierto o cerrado; el resultado es una serie de intervalos de tiempo, cada uno asociado a una amplitud. Los períodos de cierre y de apertura no necesariamente son alternantes; aperturas sucesivas pueden ocurrir si hay estados de subconductancias, o si más de un canal se abre simultáneamente.

Tanto las amplitudes como las duraciones son aleatorias, pero en general tienden a agruparse alrededor de un promedio, por lo que es importante considerar la medición de sus distribuciones, que pueden ser graficadas como histogramas. Para la presentación gráfica de los datos se utilizó el programa Sigmaplot V2.0 de Jandel Corporation.

Los tiempos de aperturas y cierres de los canales, se definieron como una excursión del 50% de la diferencia entre la línea basal y el nivel de apertura. Los valores numéricos son expresados como el promedio más menos el error estándar (E.S). Se determinó la frecuencia de apertura del canal con respecto al tiempo, el histograma obtenido muestra una distribución en forma de salvas. También se examinó el número de salvas y su duración con respecto al tiempo.

Otro parámetro evaluado fueron los niveles de subconductancias de las corrientes de cloruro, para lo cual se construyeron histogramas de amplitudes siguiendo los criterios de medición

propuestos por Patlak (1988), que consisten en determinar cuál es la duración mínima que puede incluirse dentro del histograma; debido a que en muchas ocasiones las transiciones entre los diferentes niveles de conductancia son muy rápidos, el sistema de registro no logra detectarlos y es necesario de inicio determinar cuál es la longitud mínima que puede ser medida en un solo nivel, a lo que se le llama N y se considera en función de la frecuencia de corte; en este caso se utilizó un filtro de 2 kHz y una velocidad de muestreo de 10 kHz, por lo que N se estableció como $N = 5$; por lo tanto la longitud mínima a medir será de $700 \mu s$, la cual se contabiliza como una entrada, así sucesivamente los niveles con una duración de $800 \mu s$ se consideran como dos entradas, etc. El área del histograma que se encuentra por debajo del pico corresponde a una aproximación proporcional del número de eventos de un nivel dado.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación del canal de cloruro en neuronas de hipocampo

Para la identificación de un canal aniónico se realizaron registros de corrientes de Cl^- con la técnica ya descrita (patch-clamp) bajo la configuración de inside-out (Fig. 6), el tiempo de registro en cada potencial de mantenimiento fue de 5 minutos (estado estacionario), y el registro de las corrientes se realizó con soluciones que fueron diseñadas para tener como único anión permeable al Cl^- .

En la figura 9A, se presentan corrientes de Cl^- obtenidas con soluciones que contenían una concentración de 120 mM de cloruro a ambos lados de la membrana (tabla 2 sol A y B). Se observa que a potenciales de membrana positivos las corrientes son salientes, indicadas por las deflexiones hacia arriba de los trazos en los registros. Se puede observar que las corrientes transcurren entre transiciones del estado abierto y el estado cerrado; dichas transiciones son casi instantáneas y en algunas ocasiones la transición en el registro no es completa, quedando en un nivel distinto a los niveles cerrado o al abierto (fig.12). A potenciales de membrana menos positivos, la magnitud de la corriente disminuye, no así las transiciones entre los distintos estados, ni el porcentaje de tiempo que permanece abierto el canal; alrededor de cero milivoltios, la corriente cambia de dirección y se convierte en entrante; a valores de potencial poco negativos la magnitud de la corriente es menor, y conforme se incrementa el voltaje a valores negativos la magnitud de ésta aumenta; lo cual es de esperarse debido a las condiciones iónicas y la selectividad los canales. En el registro mostrado en la figura 9A, la duración del trazo es de 1 s.,

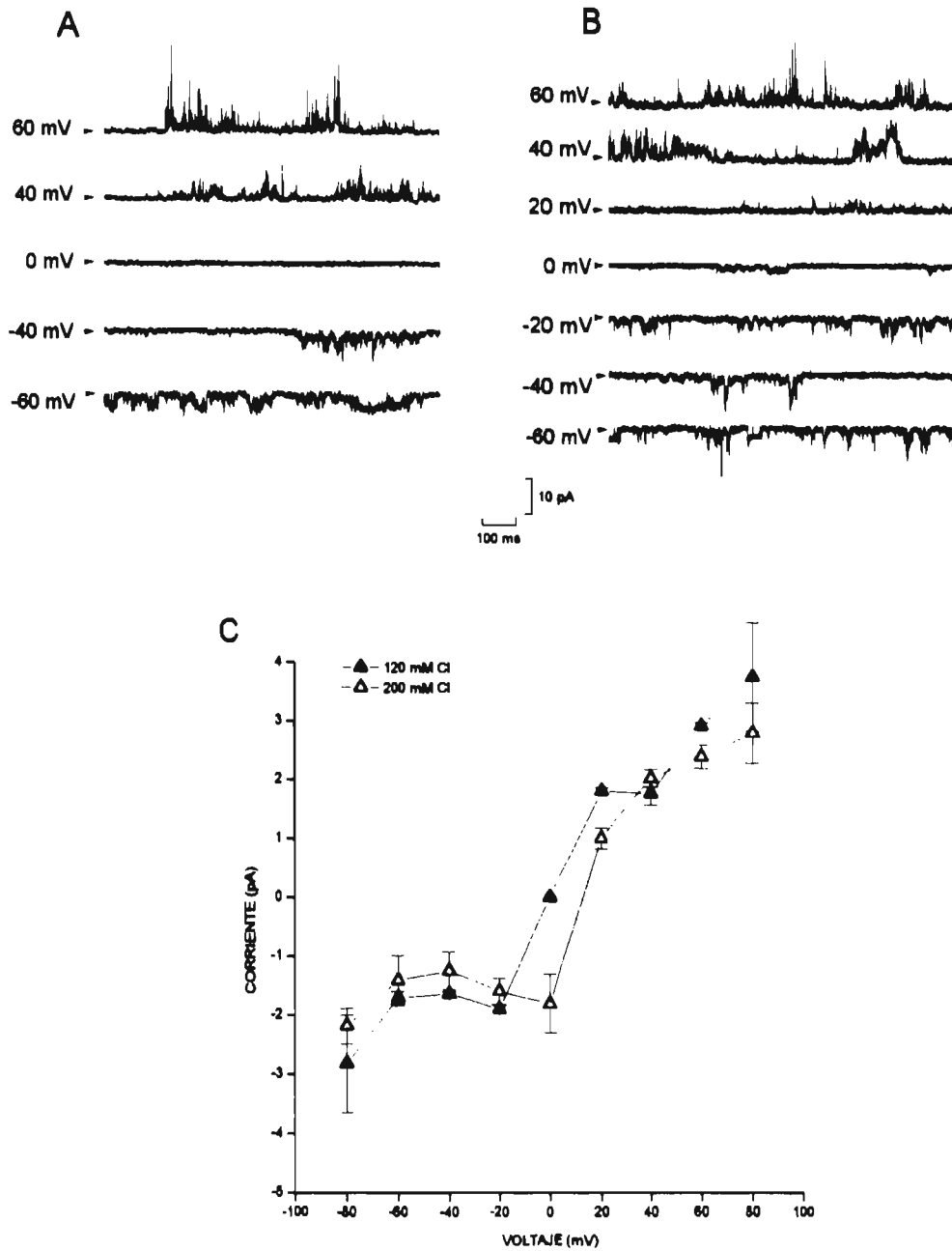


Figura 9. Registros de corrientes unitarias y relación corriente-voltaje obtenidos en diferentes concentraciones de cloruro intracelular.

Un grupo de corrientes unitarias obtenidas en estado estacionario desde 60 hasta -60 mV, en pasos de 20 mV; el registro A se obtuvo en soluciones simétricas de Cl⁻ (120 mM), y para el registro B se obtuvo en soluciones asimétricas (120 mM_o, 200 mM_i); las flechas señalan el estado cerrado del canal. En C, relación corriente-voltaje en diferentes concentraciones intracelulares de Cl⁻. cada símbolo representa el promedio de 10 experimentos; en triángulos llenos se presentan mediciones en 120 mM de cloruro (sol. simétrica); los triángulos vacíos corresponden a mediciones en 200 mM de cloruro (sol. asimétrica). Las barras de cada símbolo corresponde al error estándar. Las líneas punteadas muestran la referencia de cero de corriente y el potencial de membrana correspondiente al cual se obtiene.

la conductancia a -60mV fue de $6.3\text{pS} \pm 2.7\text{pS}$ n=10, a -40mV fue de $9.1\text{pS} \pm 3.1\text{pS}$ n=10, a 60mV fue de $28.7\text{pS} \pm 1.02\text{pS}$ n=10 y a 40mV de $14.25\text{pS} \pm 2\text{pS}$ n=10.

La relación corriente-voltaje de los registros realizados en soluciones simétricas se muestra en la figura 9C. Cada punto de la relación representa el promedio de diez registros de corrientes de diferentes neuronas. La duración a cada potencial de membrana fue de 5 s. La relación no es lineal; a potenciales negativos (-80mV) la corriente promedio es mayor, disminuyendo a potenciales menores, hasta aproximadamente -20 mV, de este punto la gráfica muestra que el potencial de inversión coincide con el valor que corresponde al potencial de equilibrio del Cl⁻ (0 mV). A valores positivos la corriente se incrementa gradualmente sin llegar a un cambio lineal.

En la figura 9B, se muestran los registros de las corrientes de cloruro obtenidas en presencia de soluciones asimétricas de cloruro (200 mM en el baño y 120 mM en la parte extracelular, véase tabla 2 sol A y C). Las características de las corrientes son similares a las descritas para los registros en soluciones simétricas. A potenciales de mantenimiento positivos, las corrientes son salientes con transiciones casi inmediatas entre el estado cerrado y abierto, presentando niveles de apertura diferentes a estos dos; a potenciales de mantenimiento menos positivos la magnitud de la corriente disminuye; alrededor de 13mV, la corriente invierte haciéndose entrante y en potenciales más negativos la magnitud de la corriente se incrementa.

En la figura 9C, se presenta la relación corriente-voltaje de los registros con soluciones asimétricas. Cada punto de la relación representa el promedio de diez registros de 5 s. de duración cada uno, de microáreas obtenidos de diferentes neuronas. La relación presentó las siguientes características: no es lineal, a potenciales negativos la corriente máxima se observa a -

80 mV, disminuye a potenciales menores, hasta -20 mV, y el potencial de inversión se observa a 13 mV, valor muy cercano al E_{Cl} . La conductancia de la relación asimétrica de cloruro es: -60 mV 23.4 ± 6.9 pS n=10, -40 mV 31.1 ± 7.9 pS n=10, 60mV 40 ± 3.3 pS n=10 y 40 mV 50.8 ± 3.7 pS n=10.

En las soluciones que se utilizaron los cationes con posibilidad de permear fueron Na^+ , K^+ y Ca^{2+} ; los canales de K^+ se bloquearon con distintos agentes tanto del lado extracelular e intracelular de la membrana, por lo que se impidió el paso del K^+ a través de esta vía. El Na^+ sólo se encontró en la solución del baño (Tabla 2, sol. E), lo que provoca un gradiente muy alto, con un potencial de equilibrio casi de infinito para que el sodio entre; al presentar una fuerza impulsora tan grande sería factible que, a los voltajes examinados, se observaran sus corrientes, esto no ocurrió; por ejemplo, a 0 mV en los registros no se observa ninguna transición de corriente, una explicación a esto, podría ser que en este trabajo los registros se realizaron en estado estacionario (hasta 5 min. de registro), lo que provocaría que a los voltajes examinados (+60 a -60 mV) el canal se inactiva, relacionándose esto con la ausencia de corriente. Las condiciones para el Ca^{2+} , son muy similares al punto anterior; el Ca^{2+} sólo se encontró en la solución del baño, a pesar de su fuerza impulsora tan grande no se observan las corrientes, ya que sus canales pudieron haber inactivado también por el tiempo de registro. Por lo tanto, se puede decir que las corrientes así registradas son de Cl^- y que los canales son principalmente selectivos a este ion, ya que los potenciales de inversión son prácticamente los mismos que los E_{Cl} .

7.2. Dependencia al voltaje del canal de cloruro de neuronas de hipocampo

Para determinar la dependencia al voltaje del canal de Cl^- posterior a la primera apertura, se examinó un grupo de corrientes las cuales se obtuvieron mediante pulsos de voltaje desde -80

mV hasta 80 mV en pasos de 20 mV, en esta serie de diez experimentos se observó que la latencia a la primera apertura del canal fue muy cercana a cero milisegundos en todos los voltajes estudiados; lo que mostró la nula dependencia al voltaje de este canal. A partir de estos experimentos se decidió realizar la totalidad de los experimentos en estado estacionario.

A las corrientes de Cl⁻ obtenidas en estado estable se les examinó la P_o y el tiempo abierto (t_o) a diferentes potenciales de membrana. Para el cálculo del t_o se utilizaron los mismos registros de los cuales se obtuvo la P_o; y se realizó de acuerdo al método del umbral al 50%.(Standen, Gray y Whitaker, 1989)

En la figura 10B se muestra la relación del promedio de tiempo abierto con respecto a diferentes valores de potencial de membrana. A valores de voltaje de -60 hasta +20 mV el t_o del canal no se modifica, se mantiene alrededor de 0.30 ms, y a potenciales de +40 y +60 mV, se incrementa a 0.43 ms y 0.60 ms respectivamente.

La P_o se calculó de acuerdo al algoritmo propuesto por Fenwick *et al.* (1982), con el que se puede calcular la probabilidad de apertura independientemente del número de canales presentes en la membrana registrada, asimismo este algoritmo tiene la propiedad de que no hace suposiciones sobre la cinética de los canales; tiene la siguiente fórmula:

$$P_o = \frac{\sum j t_j}{TN}$$

donde N es el número de canales abiertos en el parche, j corresponde a cada nivel abierto, t_j es el tiempo total en cada nivel de corriente j, y T es la duración total del registro.

En la figura 10A se muestra la relación de P_o con respecto al voltaje, cada punto de la relación corresponde al promedio de diez sellos distintos registrados en presencia de soluciones

simétricas de cloruro (mismos experimentos que la figura 9). Se observa que la P_o no se modifica con la despolarización de -60 a +40 mV, manteniéndose en un valor aproximado de 0.0061 y a +60 mV, la P_o se incrementa 7.54 veces, a un valor de 0.046.

Andrew y Blatz (1991) mencionan que el análisis de la P_o de las corrientes de Cl^- a potenciales positivos es difícil por tres razones: 1) contaminación de las corrientes por diferentes canales de Cl^- ; 2) la actividad de la compuerta de apertura y cierre se complica por el incremento de transiciones dentro del modo inactivo, y 3) los valores de potencial positivos pueden causar la activación de canales de Cl^- inactivos que se encuentren en el parche de membrana. También el reclutamiento de canales de Cl^- por la despolarización es un fenómeno común, por lo que el cambio ocurrido a 60 mV podría ser consecuencia de estos factores. En conclusión, a potenciales -60 a +40 mV la P_o mostró no ser sensible a cambios en el voltaje; la falta de sensibilidad observada en la P_o a estos valores de potencial debería estar acompañada de un comportamiento similar en el promedio de duración del t_o del canal; tanto la P_o como el t_o muestran insensibilidad al voltaje en un intervalo de -60 a +40 mV, y a +60 mV se tiene un incremento de P_o con una mayor duración del t_o .

7.3. Sensibilidad al calcio del canal de cloruro de neuronas de hipocampo

Uno de los puntos de estudio de este trabajo de tesis fue el determinar si el canal registrado correspondía o no a un canal de Cl^- activado por Ca^{2+} intracelular, por dos razones: primero, debido a que se ha reportado que el canal de Cl^- activado por Ca^{2+} participa en la facilitación del disparo de potenciales de acción en neuronas, al hacer más positivo el

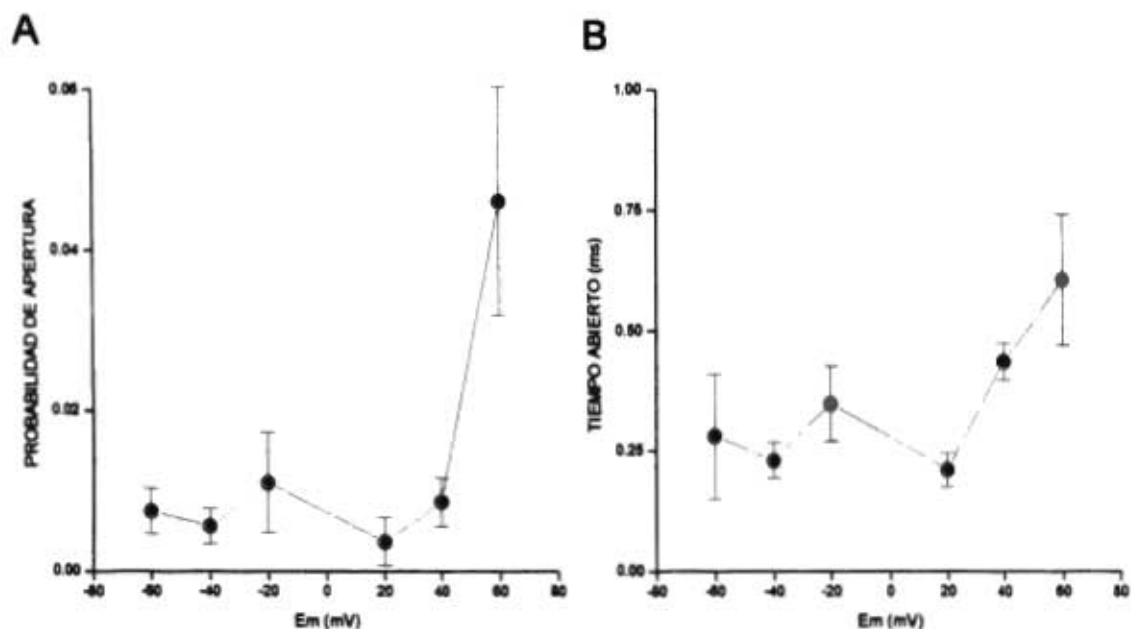


Figura 10. Probabilidad de apertura y tiempo abierto del canal de cloruro registrado en solución simétrica.

La P_o y el t_o se obtuvieron de 10 experimentos similares a los de la fig. 9 registrados en estado estacionario; se tomaron 5 seg. de registro para cada experimento. En A, se presenta el valor de P_o a diferentes potenciales de mantenimiento (de -60 hasta +60 mV). La P_o se calculó de acuerdo al algoritmo de Fenwick. No se observan cambios de -60 hasta +40 mV; a +60 mV la P_o presenta un incremento. El t_o presenta un comportamiento similar, no se observan cambios sensibles con respecto al voltaje de -60 a +40 mV, e incrementa a +60 mV. Las barras de los símbolos corresponden al error estándar.

postpotencial despolarizante, facilitando así la generación del siguiente potencial; provocando el disparo de ráfagas de potenciales de acción (Meyer, 1984). Segundo, por que durante el kindling o durante la actividad epiléptica hay un incremento en el influjo de Ca^{++} a la célula (Griffiths *et al.*, 1982), lo que favorecería la activación de este tipo de canal; debido a esto se realizaron experimentos en presencia y ausencia de Ca^{++} en el medio interno.

Para determinar la sensibilidad del canal de Cl^- al calcio, se efectuaron registros de corrientes de cloruro en presencia y ausencia de Ca^{++} . La solución carente de calcio contiene magnesio en sustitución del calcio y EGTA como quelante (tabla 2 sol B). En la figura 11, se

presenta la relación corriente-voltaje del promedio de diez experimentos distintos. La relación obtenida en la solución libre de calcio no mostró diferencias con respecto a los valores de registros control, y conservan características similares tanto a potenciales positivos como negativos, lo que indica que el Ca^{++} intracelular no modifica la corriente del canal de Cl^- registrado (Fig. 11A).

En estos experimentos se estudiaron también la P_o y el t_o en presencia y ausencia de Ca^{++} . En la figura 11B, se presenta la relación de P_o con respecto al potencial de membrana (-60 a +60 mV); se observa que las P_o obtenidas en presencia de Ca^{++} o EGTA tienen un comportamiento similar a todos los potenciales registrados y no muestran diferencia alguna. El comportamiento de la relación es la misma que la mencionada en el registro testigo inicial, a potenciales de membrana entre -60 y +40 mV no hay cambios de la P_o ; de +40 a +60 mV la P_o se incrementa, lo que concuerda con las características del canal descrito inicialmente. También se determinó el t_o en los mismos registros bajo las mismas condiciones. En la figura. 11C, se observa que los valores del tiempo abierto en presencia y ausencia de Ca^{++} a cada uno de los potenciales no presentan una diferencia, por lo que el comportamiento de las dos relaciones es el mismo. Conforme a los resultados, de esta serie se puede concluir que los canales no son estrictamente dependientes del Ca^{++} .

7.4. Actividad del canal de cloruro de neuronas de hipocampo

Los canales presentaron actividad a todos los potenciales de membrana examinados, es decir entre -80 y +80 mV. En la figura 12A, se muestran las corrientes registradas durante 60 segundos a -40 mV de potencial de membrana. Las soluciones contenían una concentración de

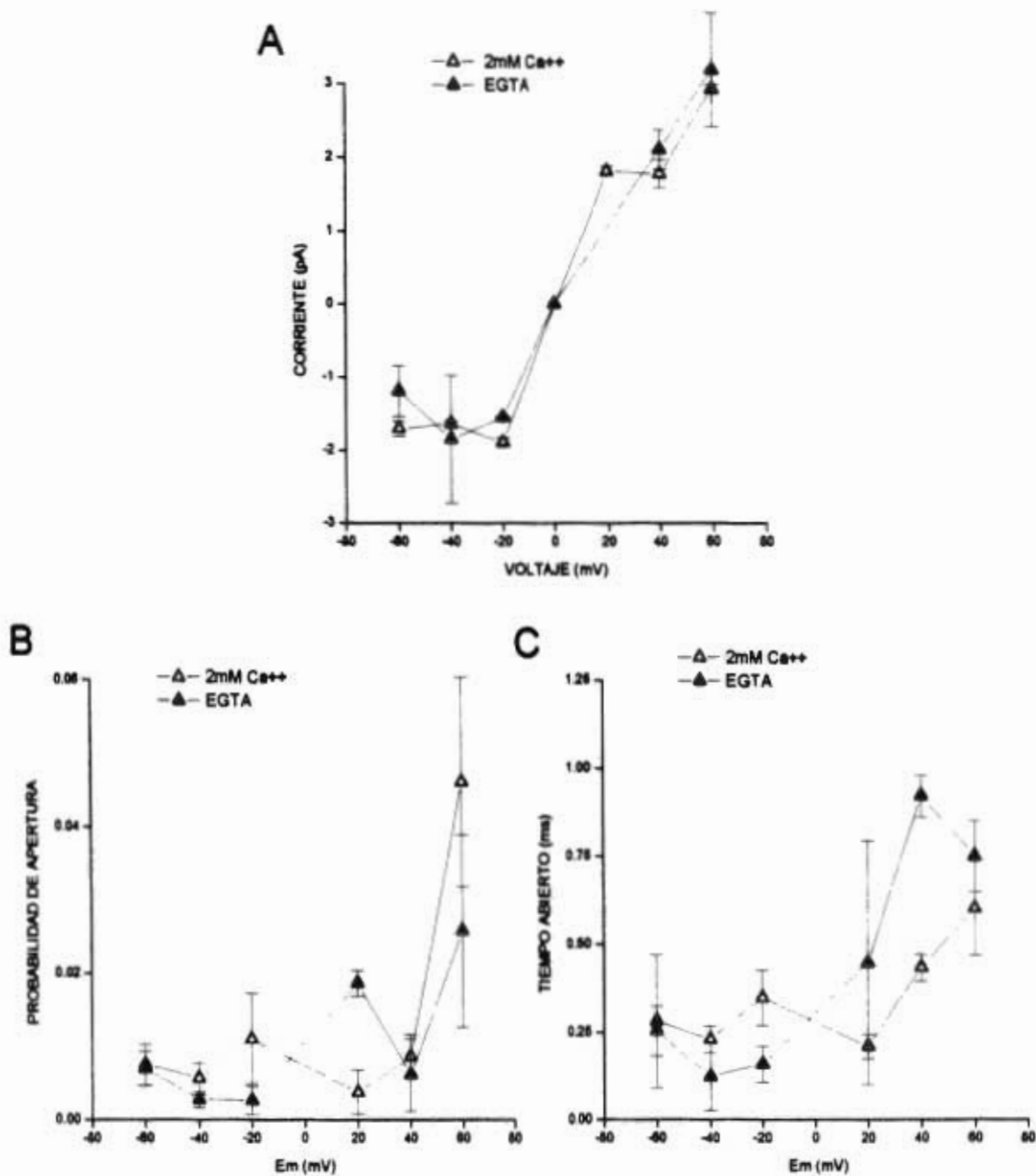


Figura 11. Sensibilidad al calcio del canal de cloruro.

Se presenta la relación corriente voltaje en *A*, P_o en *B* y t_o en *C*, de la corriente registrada del canal de cloruro en presencia de 2 mM de CaCl_2 (triángulos vacíos) y EGTA (triángulos llenos). No se observan diferencias entre los datos obtenidos en presencia y ausencia del calcio en las tres relaciones mostradas; demostrando la falta de sensibilidad al calcio del canal de Cl⁻. Las barras de los símbolos corresponden al error estándar.

Cl⁻ simétrica, los trazos no son continuos y representan 20 s. cada uno; se observó que las características de las corrientes de Cl⁻ registrados eran complejas, las aperturas ocurren en forma de salvas o grupos de salvas, con periodos de apertura y cierre breves y repetitivos, separados por intervalos cerrados de mayor duración. Para observar con mejor claridad la transición de la corriente, en la figura 12B se presentan los registros con tres escalas de tiempo distintas; en la de mayor resolución, se observa que la apertura del canal no es una apertura discreta, está compuesta por algunos eventos abiertos de baja amplitud (fig. 12B), esto podría sugerir que en el estado cerrado, la cinética del canal de Cl⁻ registrado contiene una variedad de estados cerrados con promedios de duración de microsegundos a segundos.

Una vez caracterizado el canal en neuronas testigo, se procedió a realizar los registros de este en neuronas de ratas en las que se indujo el kindling. Se presentan a continuación los resultados de esta serie de experimentos.

7.5. Registro de neuronas de hipocampo de rata en las que se indujo kindling

Después de establecer el kindling en ratas, según lo descrito por de Florida y Delgado (1958) y Racine (1972), los registros se realizaron en presencia de soluciones simétricas de Cl⁻. En la figura 13A se muestran los registros de las corrientes de Cl⁻ de neuronas en las que se había inducido el kindling. Las características de apertura, cierre y amplitud de las corrientes son similares a las descritas para los registros testigo. Es importante resaltar, que en los registros experimentales se observa un incremento en el número de transiciones entre los distintos estados de apertura y cierre, lo cual podría sugerir un incremento en la probabilidad de apertura de este canal.

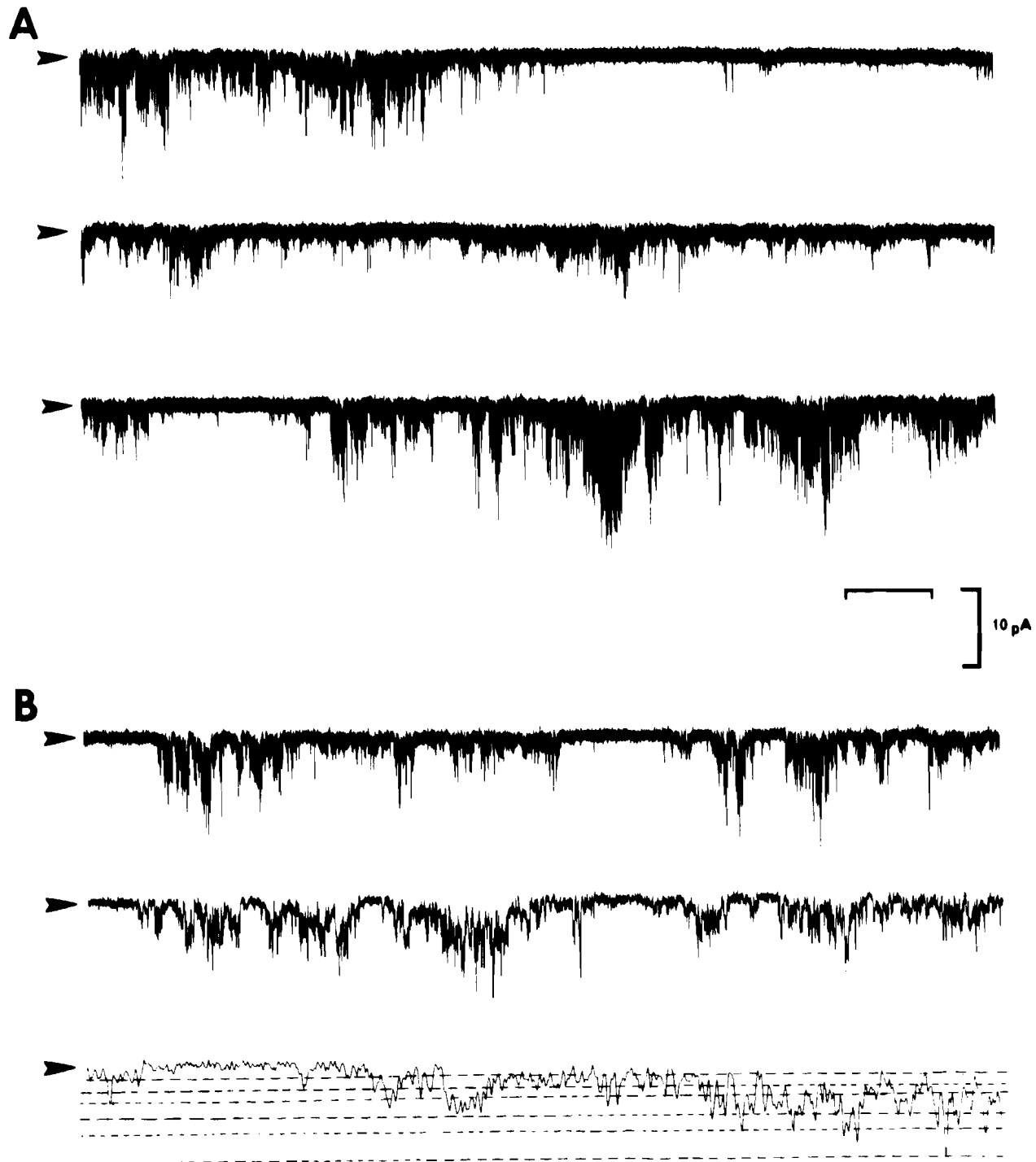


Figura 12. Las transiciones de la corriente de cloruro no son discretas.

Registro de corrientes unitarias de cloruro a una escala de resolución baja *A*, y alta *B*. Los registros se realizaron bajo la configuración de inside-out a un potencial de mantenimiento de -40 mV en soluciones simétricas de cloruro. El estado cerrado del canal se señala con la flecha. La barra de tiempo de calibración para *A*, es de 2 seg. (tiempo total 20s) y en *B*, 1 s. para el trazo superior, 100 ms para el medio y 5 ms para el inferior. las líneas punteadas muestran los diferentes subniveles de apertura. La corriente se filtró a 2 kHz.

En la figura 13B se presenta la relación corriente voltaje de los registros testigo y experimental. Cada punto de la relación representa el promedio de 10 datos de 5 s. cada uno; se observa que a potenciales negativos (de -80 a -20 mV) el valor de la corriente con respecto al voltaje no muestra diferencias con el testigo; a potenciales positivos se observa que en el registro experimental hay una disminución en la corriente del 68% a +60 mV y del 58% a +80 mV.

7.6. Actividad del canal de cloruro de neuronas con kindling inducido, a diferentes voltajes.

Para estudiar la actividad del canal de cloruro de neuronas con kindling inducido, se calculó la probabilidad de apertura a diferentes voltajes. Para el cálculo de la P_o se emplearon los mismos registros de los cuales se obtuvieron las mediciones anteriores (relación corriente-voltaje).

En la figura 14A se muestra la relación del P_o testigo y experimental con el potencial de membrana; se observan marcadas diferencias entre ambas. A potenciales negativos, la P_o de los datos experimentales se incrementaron con respecto al testigo; a -60 mV el incremento fue del 8.2 veces (de 0.00726 a 0.06024) y a -40 mV del 22.9 veces (de 0.00418 a 0.09608); sin embargo a potenciales positivos también se obtuvo un incremento en la P_o en las neuronas del grupo experimental, pero las diferencias fueron mucho menores, a +40 mV incrementó 7.4 veces (de 0.0548 a .0074), a +60 mV fue de 1.8 veces (de 0.0861 a 0.462) dado que las modificaciones mas importantes se observaron a -60 y -40 mV, y no en el resto de los potenciales estudiados, es posible que los cambios pudiera ser dependientes del voltaje.

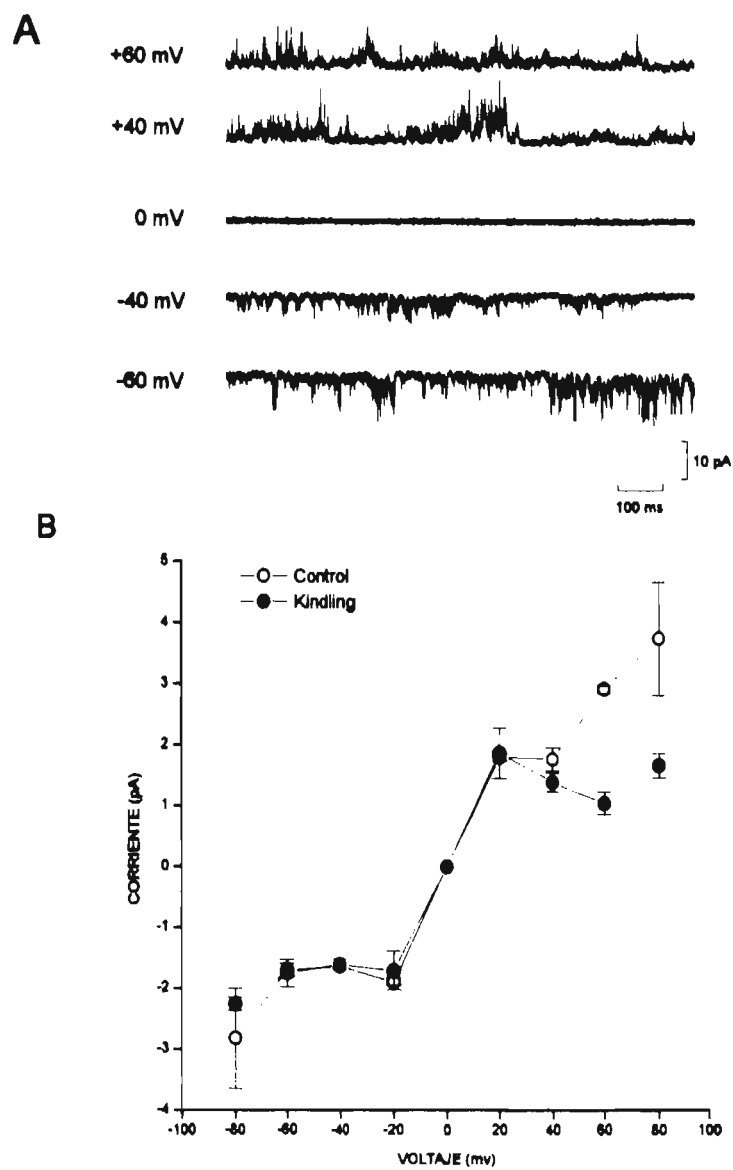


Figura 13. Registro de corrientes unitarias de cloruro de neuronas de rata con kindling establecido. Corrientes unitarias de cloruro obtenidas de neuronas de rata con kindling inducido (A). Los registros se efectuaron en estado estacionario desde -60 hasta +60 mV, en pasos de 20 mV; en soluciones simétricas de cloruro (120 mM). En B. relación corriente-voltaje de registros control (círculos vacíos) y de registros kindling (círculos llenos); cada punto representa el promedio de 10 experimentos. Las barras en los símbolos corresponden al error estándar.

También se determinó el tiempo abierto del canal. En la figura 14B se presenta la relación del t_o de datos experimentales y testigos. De manera semejante a la P_o , el t_o presentó un incremento a valores de potencial negativo, a -60 mV el incremento fue del 2.9 veces (de 0.3499 a 1.04813 ms), y a -40 mV del 5.5 veces (de 0.21476 a 1.2024 ms); en este caso también se observó que las modificaciones ocurrieron solo a -60 y -40 mV, demostrando que los cambios del t_o al igual que los de la P_o son dependientes del voltaje. A potenciales positivos no se observaron diferencias entre los datos testigo y experimental.

En esta sección se concluye que en los datos experimentales se observó que a potenciales de mantenimiento de -40 y -60 mV se presenta un marcado incremento de la probabilidad de apertura del canal de cloruro con un mayor tiempo abierto.

7.7. Actividad del canal de cloruro de neuronas con inducción de kindling

Al igual que las neuronas testigo, las neuronas con kindling se estudiaron a potenciales de membrana entre -80 y +80 mV. En la figura 15, se muestra la relación entre la frecuencia de apertura del canal en función del tiempo, tanto de datos testigo como experimentales; en estos registros el potencial de membrana fue de -40 mV durante 5 min. y en presencia de soluciones simétricas de Cl⁻. Las aperturas se agruparon en forma de salvas con periodos rápidos de apertura y cierre (intervalo intrasalva), separados por intervalos cerrados relativamente de duración mayor (espacio intersalva). En el caso del registro testigo, se observan numerosos intervalos inter e intra salva (fig.15A). En los registros de neuronas con epilepsia experimental (fig.15B), se incrementó el número de salva con la consecuente disminución de los intervalos intra e inter salva, mostrando un incremento marcado en la frecuencia de aperturas con respecto al tiempo, esto concuerda con el incremento en la P_o descrito con anterioridad. A continuación se describen

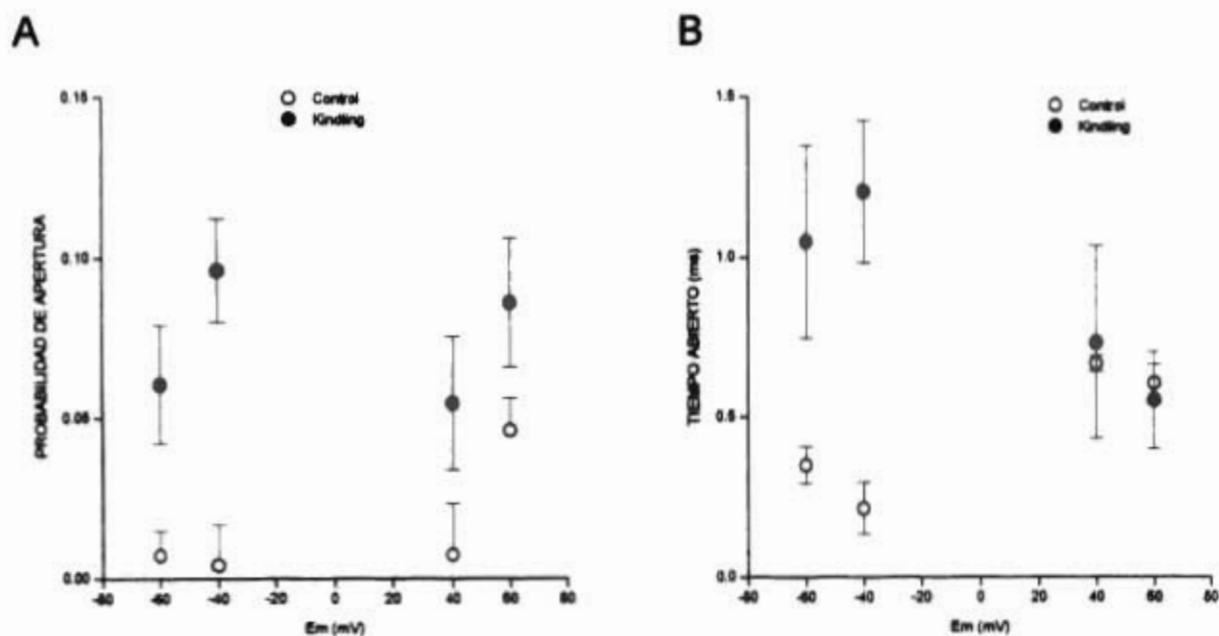


Figura 14. El kindling incrementa la P_o y t_o del canal de cloruro.

La P_o y el t_o se obtuvieron de 10 experimentos similares a los de la fig. 13, registrados en estado estacionario; se tomaron 5 seg. de registro para cada experimento. En A, se presenta el valor de P_o a diferentes potenciales de mantenimiento (de -60 hasta +60 mV). La P_o se calculo de acuerdo al algoritmo de Fenwick. Se observa un incremento de la P_o a -60 y -40mV. En B, el t_o también mostró un incremento a -60 y -40mV, en los datos experimentales. Las barras en los símbolos corresponden al error estándar.

notar las características de las salvas y las diferencias encontradas entre los datos experimentales y testigos.

En la figura 16A se muestra la relación del número de salvas con respecto el periodo de tiempo de la corriente, en datos testigo y experimentales; el inicio de la corriente o el primer punto donde se realiza la lectura se considera como tiempo cero, de este punto se contabilizan los salvas o la duración de estas en cada periodo de tiempo subsecuente. Se observa una disminución en el número de salvas pertenecientes a los datos experimentales que se encuentran en intervalos de tiempo menores a 120 ms; en intervalos de tiempo mayores no hay diferencias entre el testigo y el experimental.

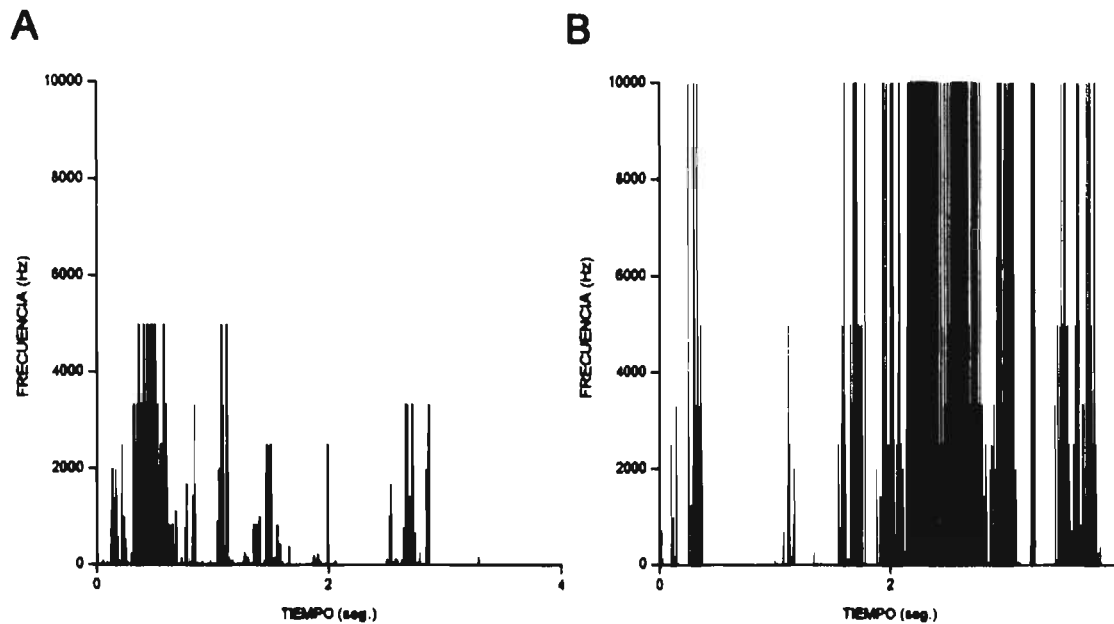


Figura 15. El canal de cloruro de neuronas con kindling inducido presenta un incremento de las salvas de apertura y cierre.

Los datos se obtuvieron de registros en soluciones simétricas de cloruro, a un potencial de mantenimiento de -40 mV y en estado estable. En A, la frecuencia de las salvas de corrientes testigo, B, la frecuencia de las salvas de corrientes experimental. La frecuencia de los salvas experimentales se incrementa con respecto al testigo; disminuye el espacio intrasalva y el intersalva.

Se observó una relación entre el número de salvas y la duración de éstas en intervalos de tiempo menores a 120 ms. En la figura 16B se muestra la gráfica de duración de las salvas contra distintos intervalos de tiempo. En los datos experimentales a intervalos menores de 120 ms, las salvas son de una duración mayor que los testigo.

Con estos resultados, podemos concluir que en las células con kindling inducido se incrementa la frecuencia de apertura del canal de Cl^- agrupada en salvas, y se reduce el número de éstas, pero con mayor duración; en ambos casos los cambios se presentan a intervalos de tiempo menores de 120 ms.

7.8. Las corrientes de cloruro de neuronas de hipocampo testigo y con kindling inducido, presentan múltiples subconductancias

En la figura 18A.B, se muestran corrientes de Cl^- de neuronas testigo y con kindling inducido, a un potencial de mantenimiento de -40 mV y en condiciones simétricas de Cl^- . Tanto en el registro testigo como en el experimental se observan múltiples niveles de conductancia durante todo el trazo. En la mayoría de los casos estos niveles no son múltiplos unos de otros, por lo que se descarta que correspondan a la apertura simultánea de otros canales del mismo tipo. Dado que las aperturas y cierres son eventos aleatorios, las amplitudes de un evento a otro varían alrededor de un promedio; por lo que se construyeron histogramas de amplitudes, para determinar cual era la distribución de las diferentes amplitudes. Los histogramas obtenidos mostraron características muy interesantes; en la figura 17 se muestran cuatro histogramas de apertura, las gráficas de la parte superior corresponde a los datos testigo y los de la parte inferior a los datos experimental. Los histogramas de la parte izquierda (A y C) fueron obtenidos en la modalidad de medición automática del programa, y los de la derecha (B y D) bajo la modalidad de medición manual. En los histogramas obtenidos por medición automática se advierte que no es posible identificar con claridad la presencia de diferentes poblaciones de conductancia, a pesar de lo observado en los registros; tanto en el histograma testigo (A) como el experimental (C), al estudiar la distribución de las amplitudes ajustando el histograma con una función de distribución normal, se observa que una población importante se agrupa de acuerdo a esta distribución, pero, una parte de la población del histograma queda fuera del ajuste, tanto en el testigo como el experimental. la población que no se ajusta podría corresponder a otros grupo de amplitudes; esto se muestra con mayor claridad cuando se construyeron los histogramas de acuerdo a la medición

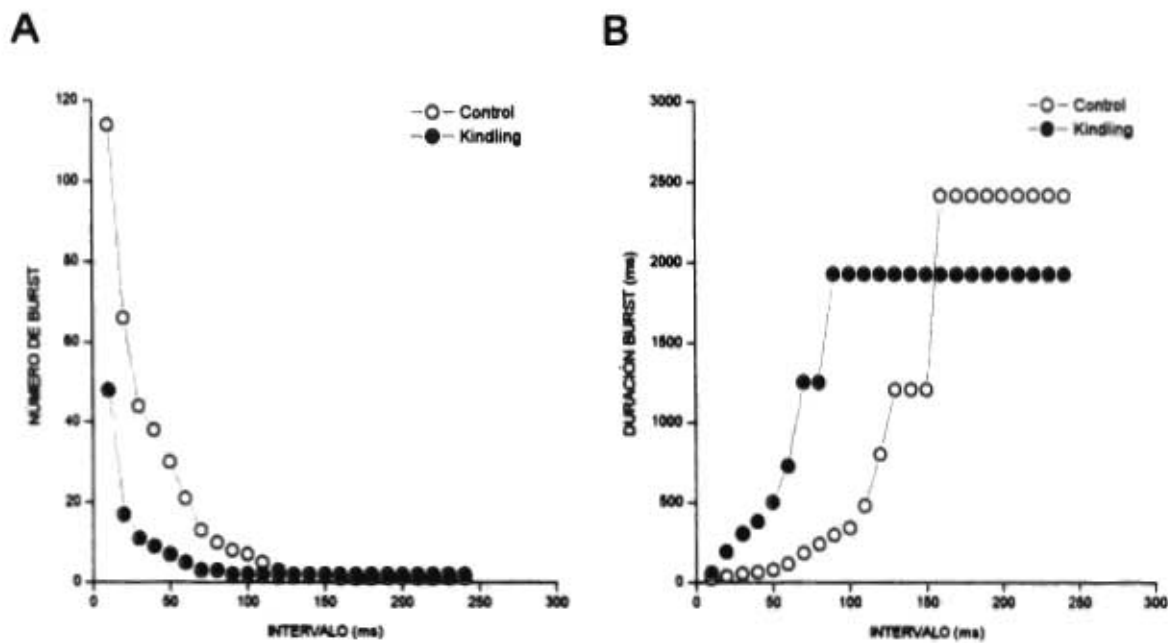


Figura 16. El kindling modifica las características de las salvas.

Número de salvas (A), y duración de estas (B), con respecto a intervalos de tiempo: de datos testigo y experimental. Los registros de los cuales se obtuvieron los datos, se realizaron en soluciones simétricas de cloruro, a un potencial de mantenimiento de -40 mV. Se observa que las salvas de neuronas con kindling que se generan en un intervalo de tiempo menores a 120 ms se presentan en menor número y con duración mayor.

manual de las amplitudes de las corrientes; los histogramas obtenidos bajo estas características se muestran en la fig. 17 (B y D), se observa en estos la presencia de diferentes poblaciones que podrían corresponder a distintos niveles de conductancia, aunque no están bien definidas ya que no se separa una población de la otra, es posible ajustar cada una de acuerdo a una distribución normal; para el caso del testigo se definen dos poblaciones, una muy cercana a 0 pA que podría corresponder al el nivel cerrado y otra cercana a 1.5pA; en el caso de los experimentales se ajustan a una distribución normal tres niveles de amplitud, el primero muy cercano a 0pA, otra cercana a 7pA y una tercera cercana a 10pA; una cuarta población muy pequeña cercana a 15pA no se pudo ajustar. La diferencia observada en las poblaciones de los histogramas, puede sugerir la importancia que tiene el muestro de la población; la medición automática no discrimina entre muchas poblaciones, aunque los histogramas obtenidos por medición manual logran insinuar

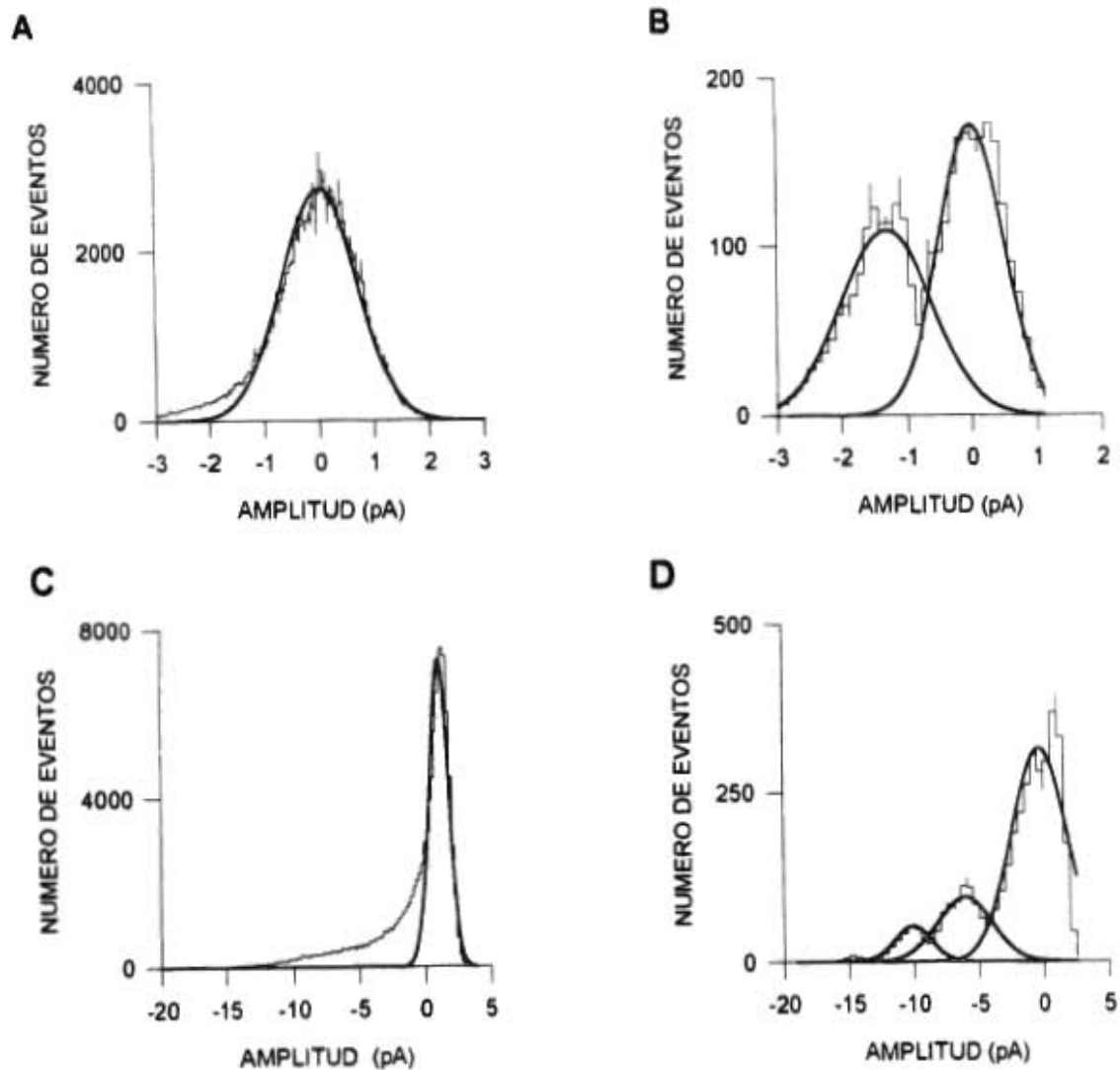


Figura 17. Los niveles de amplitud se enmascaran de acuerdo al tipo de muestreo. Distribución de las amplitudes de corrientes testigo parte superior, y de corrientes experimentales parte inferior; obtenidas por medición automática A, C, y por medición manual B, D. La línea delgada corresponde al histograma de amplitudes, la gruesa corresponde al ajuste del histograma de acuerdo a una función de distribución normal.

algunas diferencias en las poblaciones, estas no se definen con claridad al no observarse separaciones entre ellas, lo cual podría deberse a la presencia de subniveles u otras poblaciones entre una población y la siguiente.

Para tratar de definir con más claridad los diferentes niveles de conductancia, se construyó un histograma de amplitudes, realizando un muestreo de datos de acuerdo a lo

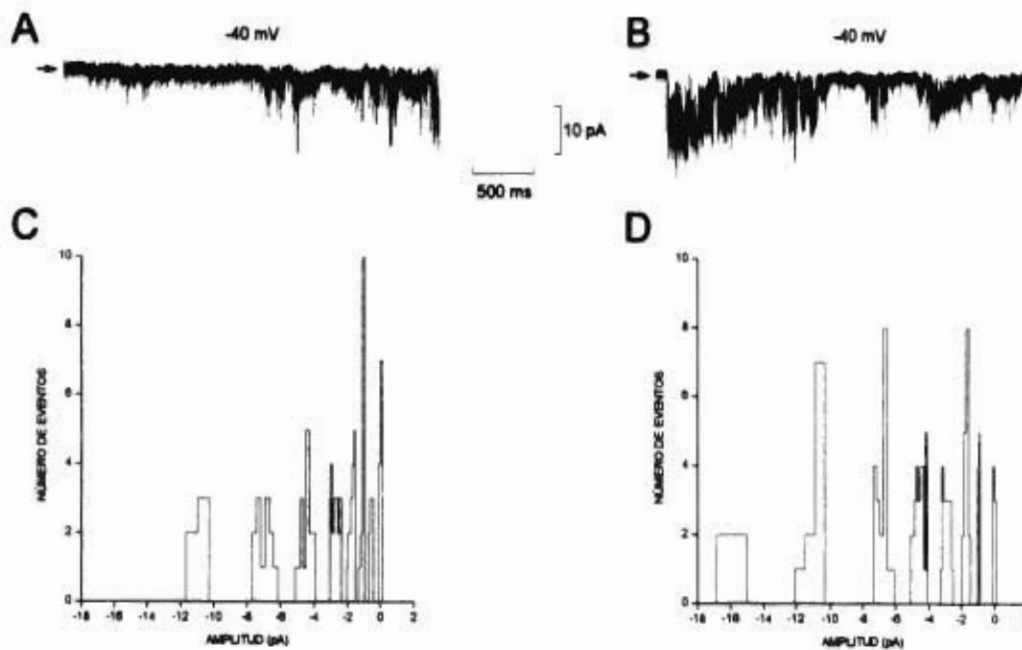


Figura 18. Múltiples niveles de amplitud de corrientes de cloruro testigo y experimental.

A y B corrientes unitarias de cloruro a -40 mV, registradas en soluciones simétricas de cloruro. Las líneas punteadas muestran los diferentes niveles de amplitud. C y D histogramas de amplitudes de las corrientes testigo y experimental respectivamente. Los histogramas no consideran a eventos menores de $700\mu\text{s}$ lo que permite identificar independientemente los diferentes niveles de conductancia.

propuesto por Patlak (1988); estos criterios se considera en función de la frecuencia de corte, en este caso $N = 5$, y la duración mínima que puede incluirse dentro del histograma es de $700\mu\text{s}$. El área del histograma que se encuentra por debajo del pico corresponde a una aproximación proporcional del número de eventos de un nivel dado. Los niveles de amplitud se establecieron de acuerdo a la técnica del umbral al 50%. En la figura 18C,D se muestran los histogramas testigo (C) y experimental (D) obtenidos a -40 mV y solo corresponden al registro mostrado. Se observan 7 niveles de conductancia bien definidos en cada uno, en la figura 18C se muestra que

el nivel que corresponde al valor mínimo es de -0.5 pA y el de mayor amplitud es -11 pA; en el caso de la figura 18D se presenta el valor mínimo de -1 pA hasta el valor máximo de -16 pA. Se observa que el número de niveles entre los dos grupos no se modificó, corresponde a 7 en ambos; las diferencias observadas fueron en la amplitud; en el grupo testigo se presenta un nivel de amplitud bajo de -0.5 pA que no está presente en el experimental, y el nivel de corriente máxima es de -11 pA, comparado con -16 pA de corriente máxima en el experimental; en el resto de los niveles no ocurrieron cambios. La identificación de los diferentes niveles de amplitud se obtuvo a todos los voltajes estudiados. Estos resultados solo muestran los niveles de subconductancia correspondientes al registro mostrado en la figura 18. Podemos concluir en esta sección que en la condición de kindling inducido se presenta el mismo número de subniveles de conductancia con respecto al testigo.

Tanto en los registros de células testigo como experimentales se obtuvieron a todos los potenciales explorados con soluciones simétricas de Cl⁻, una serie de corrientes con un comportamiento particular; al iniciar el registro se observaron períodos de minutos, durante los cuales no aparecían las corrientes (fig. 20A); posteriormente se observó una corriente bien definida, de aproximadamente 0.50 pS, con una probabilidad baja de apertura (fig. 20B); después de unos minutos se presentan subniveles de conductancia combinadas con las corrientes pequeñas, y se incrementa la probabilidad de apertura del canal (fig. 20C), y posteriormente estos niveles de subconductancia se incrementan tanto en número como en frecuencia (fig. 20D).

7.9 Registros de poblaciones con estimulación simulada

Se realizaron registros de las corrientes de cloruro en neuronas de hipocampo de ratas a las cuales sólo se les implantó un electrodo de estimulación con las características mencionadas en el método, mas no se efectuó estimulación alguna; los registros obtenidos de este grupo de neuronas no mostró diferencia alguna con el grupo testigo.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis se enfocó a determinar el comportamiento de los canales de Cl⁻ de las neuronas granulares del hipocampo durante el fenómeno de la hiperexcitabilidad neuronal inducida por kindling; en especial se estudiaron los cambios que ocurren en la cinética del canal como resultado de la inducción del kindling.

8.1. Canal de cloruro registrado en neuronas de hipocampo de rata

La relación corriente voltaje de los datos mostró un comportamiento similar en los registros testigo y experimental (Fig. 13), la relación no presenta un comportamiento lineal; a potenciales muy negativos (-80mV) la corriente promedio es máxima, disminuyendo a potenciales menores, lo que indica que la corriente sufre una ligera rectificación entrante a -60 mV, hasta un potencial de membrana de -20 mV; se observa que el valor que corresponde al potencial de inversión, coincide con el E_{Cl^-} ; a valores positivos, la corriente se incrementa gradualmente sin que dicho incremento llegue a ser lineal mostrando una ligera rectificación: este tipo de comportamiento es similar a el descrito para diferentes tipos de canales de cloruro (Ludewig *et al.*, 1997). En la relación corriente voltaje, algunos canales de Cl⁻ presentan como comportamiento habitual una rectificación saliente de la corriente, lo cual se debe a la asimetría de la vecindad eléctrica del poro que influye sobre la permeación del ion (Ludewig *et al.*, 1997).

Pusch *et al.* (1995) describen en estudios del canal CIC-O del órgano eléctrico del *Torpedo* que la cinética de las compuertas rápida y lenta se modifica por factores externos tales como los cambios en la concentración extracelular del cloruro; al incrementarse la concentración extracelular de cloruro, la apertura del canal se ve facilitada, lo que sugiere que el mecanismo de

la compuerta está relacionado con la permeación del ion, por medio de la unión del ion a distintos sitios en el poro; así, cuando se ocupan estos sitios, la compuerta modifica su cinética, mostrando una gran dependencia de las concentraciones extracelulares de Cl^- . Pusch *et al.* (1995) proponen que para este tipo de canal, el propio ion que permea a través de él se constituye como la compuerta de este. Otras evidencias que muestran al ion de cloruro como la compuerta del canal CIC-O las aportan Ludewig *et al.* (1997) por medio de experimentos de biología molecular en los que se realizaron mutaciones puntuales en la subunidad D12, sustituyendo la lisina de la posición 519 por glutamato; esto provocó cambios electrostáticos en los aminoácidos de esa región, lo que modifica la cinética de la compuerta rápida de uno de los poros, así como también la probabilidad de apertura. La explicación que dan a estos cambios es que al permear el ion por el poro se ve alterada la unión de éste con su sitio de afinidad. Otro hallazgo fue que la compuerta lenta del canal cambia su cinética de acuerdo a la concentración intracelular de cloruro. Este tipo de comportamientos se ha observado en otros canales, como el de potasio de la rectificación entrante que sufre cambios en su compuerta por diferencias en la concentración extracelular de potasio (Rubo *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1976).

Estos datos pueden sugerir que en el comportamiento del canal registrado en este trabajo participen mecanismos similares. Como se mencionó, las compuertas del canal pueden alterarse por las concentraciones extracelulares de cloruro. En el caso del canal registrado en este estado, cuando se compara la relación corriente-voltaje de registros control en soluciones simétricas y asimétricas de cloruro no se observan cambios, esto puede ser debido a que las concentraciones extracelulares no se modificaron, por lo que probablemente no existen cambios en la compuerta.

Pusch *et al.* (1995) describen que la probabilidad de apertura del canal CIC-0 se modifica por la concentración intracelular de cloruro; a concentraciones altas (104 mM), la probabilidad de apertura se incrementa y a concentraciones bajas (4 mM) la probabilidad disminuye. En el caso del canal registrado en este trabajo, al comparar los registros en soluciones simétricas y asimétricas no se observan cambios en la probabilidad de apertura, a pesar de que las modificaciones de las dos soluciones de registro se realizaron en la parte intracelular (de 120 a 200 mM), lo que muestra que el canal registrado no es sensible a esta diferencia de concentración intracelular de Cl⁻. Esto se observa tanto en la relación corriente voltaje como en la de probabilidad de apertura de registros de soluciones simétricas y asimétricas.

Otro factor que pudo haber influido sobre el comportamiento de la relación corriente voltaje fue el protocolo empleado para el registro de las corrientes. Todos los registros de la tesis se realizaron en estado estable, pero en ocasiones al fijar el voltaje aparecía muy poca o nula actividad espontánea del canal, por lo que fue necesario establecer un protocolo de activación de las corrientes como el utilizado por Woll *et al.*, en 1987. Este protocolo consiste en que una vez realizado el sello y estar en la configuración de "inside-out" se debe mantener la membrana a un potencial despolarizante cercano o igual a +20 mV, durante algunos segundos o minutos, hasta que las corrientes aparezcan espontáneamente; ya activado el canal, la corriente registrada se va incrementando gradualmente. Posteriormente se registra la corriente a diferentes potenciales de mantenimiento, desde -80 hasta +80 mV en pasos de 20 mV. Con este tipo de protocolo podríamos haber modificado la cinética de las compuertas de apertura rápida o lenta, y por lo tanto obtener una relación corriente voltaje diferente a la de otros tipos de canales, sin que

necesariamente fuera un canal distinto, sólo pudo haber sido registrado bajo condiciones que modifican su actividad.

Otra característica de los canales, fue la presencia de estados de subconductancia, tanto en los registros experimentales como en los testigo. Este tipo de comportamiento es común a diferentes tipos de canales de cloruro, como el canal rápido de músculo esquelético y de neuronas (Weiss y Magleby, 1990; Blatz, 1991), así como también en el canal doble cañón del órgano eléctrico del *Torpedo* (Miller y White, 1984). Blatz y Magleby (1986) mostraron que en la distribución de la duración de los eventos de apertura y cierre para el canal doble cañón se describían dos componentes para la distribución del intervalo de apertura y cinco componentes exponenciales fueron necesarios para describir la distribución del intervalo de cierre, lo que presenta un modelo con dos estados abiertos y cinco estados cerrados. El canal doble cañón está constituido por dos poros idénticos, que abren y cierran independientemente a través de un mecanismo de compuerta; la compuerta rápida parece pertenecer sólo a uno de los protocanales y la lenta pertenece a los dos (Middleton *et al.*, 1996; Ludewig *et al.*, 1996), lo cual muestra que el canal tiene dos mecanismos de compuerta independientes y separados. En el primero, cuando el canal transita entre el estado activado y el inactivado se observa una dependencia del voltaje, el canal se activa a potenciales hiperpolarizantes, incrementando la probabilidad de las salvas (compuerta lenta); y en el segundo, la compuerta rápida muestra una dependencia del voltaje a potenciales despolarizantes, presentando un incremento en la probabilidad de apertura de los protocanales dentro de las salvas (Miller y Richard 1990). Este canal de cloruro presenta una cinética compleja, en la cual el canal puede transitar entre cuatro estados, el estado inactivado y tres subestados U, M y D, con tres niveles de conductancia de 20, 10 y 0 pS respectivamente (Miller,

1982; 1984). En nuestros registros tanto testigo como experimental, encontramos varios niveles de subconductancia, lo que sugiere que la cinética de estos canales también es compleja, y esto podría hacer pensar que este canal se constituyera por varios poros, tal como se ha descrito previamente (Miller y White, 1984).

Otra evidencia de la gran complejidad del comportamiento de las compuertas, ha sido documentada a partir de los registros de la corriente que fluye a través del canal de cloruro de *Torpedo* en presencia de 10 μM de DIDS, un inhibidor específico de una variedad de proteínas transportadoras de Cl^- . Cuando se administra el DIDS, el canal cambia su comportamiento, de presentar varios niveles de subconductancia a uno solo de 10 pS. Después de la administración del DIDS la probabilidad de apertura del protocanal va disminuyendo significativamente, el tiempo abierto se reduce, y se incrementa el tiempo cerrado. El DIDS causa un claro incremento del estado cerrado o inactivado debido a un cambio en la estructura cuaternaria del dímero (fig. 19) (Miller y White, 1984). En nuestros registros, a pesar de que las condiciones fueron distintas, también observamos un comportamiento complejo del canal, es decir tanto en los registros testigo como en los experimentales, al inicio del registro se observaron períodos de minutos durante los cuales no aparecían las corrientes (fig. 20A); posteriormente, aparecía una corriente de aproximadamente 0.50 pS de conductancia, con una probabilidad de apertura baja (fig. 20B); después de unos minutos se presentan subniveles de conductancia combinada con las corrientes pequeñas, y se incrementa la probabilidad de apertura del canal (fig. 20C), posteriormente estos niveles de subconductancia se incrementan, tanto en número como en frecuencia, lo cual hace muy complejo su análisis (fig. 20D). Este comportamiento del canal se repitió consistentemente en registros testigo, como en experimentales, y en los registros de soluciones asimétricas.

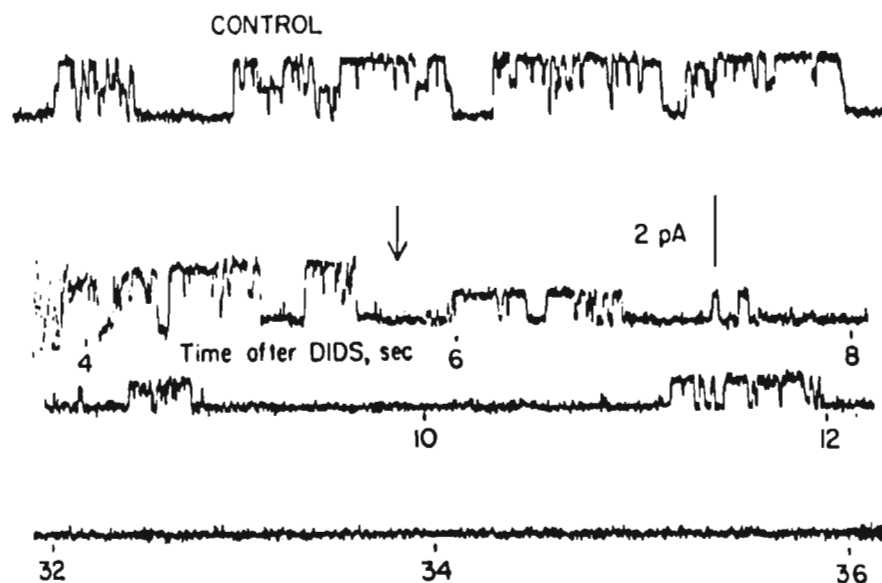


Figura 19. Inhibición del canal de cloruro por DIDS.

Corrientes de cloruro obtenidas con 200 mM de NaCl, a un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se registró un canal de cloruro incorporado en una bicapa lipídica. El trazo inicial son corrientes de cloruro control; en los trazos de en medio se muestran los registros cuando se le administro el DIDS en una concentración de 10 mM y en el trazo inferior la corriente después de 30s, en la cual no se observan las fluctuaciones de la corriente. (Tomado de Miller y White, 1984)

Al parecer el comportamiento del canal registrado es similar en cuanto a su complejidad al canal del *Torpedo*; esto hace pensar que en el canal registrado, los primeros segundos de registro cuando no hay corriente y cuando se registran las corrientes de baja amplitud, pudieran corresponder al estado inactivado del canal; y que conforme transcurre el tiempo de registro pasa al estado activado, evidenciándose la complejidad de la compuerta por el gran incremento de los niveles de subconductancia.

Otra posible explicación de los niveles de subconductancias puede derivarse de los modelos propuestos por Franciolini y Nonner (1987; 1994) donde postulan que las interacciones del ion con sitios específicos en el poro del canal pueden modificar la cinética de éste: como el

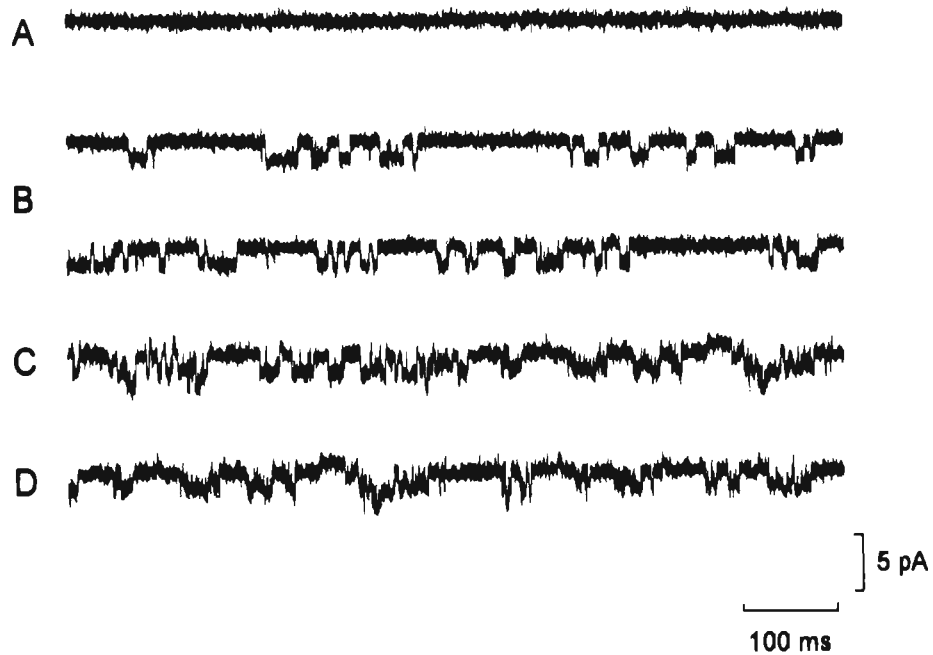


Figura 20. Las corrientes de cloruro modifican su cinética con el tiempo.

Corrientes de cloruro registradas en soluciones simétricas, a un potencial de mantenimiento de -40 mV y en estado estacionario: los registros no son continuos, cada trazo corresponde a 1 s. El intervalo entre cada uno es de 5 s. De A-D modificación de las corrientes con el tiempo, en el trazo inicial (A), no se observan transiciones de corriente, B, se presentan corrientes bien definidas, C, se observan corrientes con niveles de subconductancia y niveles bien definidos y en D, no se identifica claramente un nivel de conductancia.

canal permite la permeabilidad de cationes y aniones, estos interactúan en conjunto para determinar la conductancia del canal. El modelo presenta un primer paso en el que el poro está vacío; posteriormente, acepta un anión y posteriormente uno o dos cationes asociados a un par de aniones. Otro modelo implica el transporte formado por ciclos: un ciclo de anión lento (entre el estado vacío y el de un solo anión en el poro), un ciclo de catión lento (entre el estado de uno y tres iones en el poro), y el ciclo del anión rápido (entre el estado de tres y cinco iones en el poro); en todos estos mecanismos hay una interacción entre aniones y cationes con el sitio activo del poro, para el paso de cationes o aniones; cada una de las transiciones que ocurren en la corriente

del registro corresponde, aparentemente, a cambios de la carga que se moviliza a través del canal, lo que podría determinar los subniveles de conductancia (Franciolini y Nonner; 1994).

8.2. Canal de cloruro de neuronas de hipocampo con kindling inducido

Los registros realizados en neuronas de hipocampo de rata con kindling establecido muestran que entre -80 y +40 mV la relación corriente voltaje no presenta diferencias con respecto a los controles; las diferencias que se observaron fueron en la cinética; se observó un incremento en la probabilidad de apertura y un incremento del tiempo abierto sólo a un potencial de mantenimiento de -60 y -40 mV, el resto de los parámetros evaluados no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el control. Las diferencias observadas nos indican que en las neuronas de ratas con kindling establecido los canales de Cl^- presentaron cambios muy específicos y dependientes del voltaje; como el incremento de la probabilidad de apertura y el tiempo abierto a -60 y -40 mV. A -40 mV de potencial de mantenimiento se incrementó la frecuencia de las salva, otra diferencia obtenida fue que en intervalos de lectura menores a 120 ms se presentó menor número de estas, pero con duración mayor. El resultado obtenido en los registros de células de ratas con kindling muestra un incremento significativo del tiempo abierto y la probabilidad de apertura del canal a potenciales hiperpolarizantes. Esto podría contribuir a generar un flujo de cloruro hacia el interior o el exterior de la célula, dependiendo de su fuerza impulsora, y regular así la excitabilidad de las células del sistema manteniendo o modificando la inhibición o excitación del circuito. En el sistema hipocampal se ha descrito este proceso en diferentes áreas, como parte de los mecanismos de regulación de la excitabilidad. En rebanadas de hipocampo se ha mostrado que la fuerza para el impulsora para el flujo de cloruro tiene

direcciones opuestas en las células piramidales de CA3 y en las células granulares del giro dentado (Misgeld *et al.*, 1986) lo cual determina que en las células de CA3 sea predominantemente hiperpolarizante dicho flujo y en las células granulares despolarizante (Crunelli *et al.*, 1983). Cuando en neuronas de hipocampo se altera el flujo por modificaciones de la fuerza impulsora para el ion se modifica la inhibición del circuito. Las modificaciones en el flujo de Cl⁻ se han observado en procesos de desinhibición experimental; cuando se aplican estímulos tetánizantes de 3-10 Hz durante 30 a 60 s en las fibras aferentes de las células musgosas, se produce una reducción del 22% en la conductancia del cloruro durante el PPSi y una modificación de 2-7 mV en el potencial de inversión, debido a una disminución del 49% en la fuerza impulsora del cloruro durante el PPSi, provocado por un incremento en la concentración intracelular de cloruro (Thompson y Gähwiler, 1989a); cuando esta inhibición se modifica (desinhibición) puede constituirse en un factor endógeno para la génesis de descargas epilépticas (Korn *et al.*, 1987; Thompson y Gähwiler, 1989b). Se debe de considerar por los resultados obtenidos, que el kindling aparentemente ocasiona un incremento en la P_o y el t_o, así como también incrementa de la frecuencia de las salvas de aperturas del canal, disminuyendo el número de grupos de estos, pero con duración mayor; estas modificaciones podrían sugerir que la cantidad de Cl⁻ que se moviliza a través de la membrana celular podría estar incrementados, y como se discutió anteriormente, podría ser parte de un mecanismo de desinhibición, o de un mecanismo de compensación para contrarrestar el estado de hiperexcitabilidad en que se encuentra la célula, el cual requeriría de mecanismos compensatorios que lo contrarresten; uno de estos podría ser por medio del Cl⁻ y específicamente por los canales selectivos a este ion.

9. CONCLUSION

En conclusión, pude plantearse que el canal de cloruro registrado muestra características similares a otros canales de cloruro.

Los niveles de subconductancia y el comportamiento complejo de la corriente que se observaron en los registros, pudiera sugerir que el canal registrado corresponde a un canal de tipo multiporo.

Con respecto al testigo, el canal de cloruro registrado en neuronas de rata con kindling muestra un incremento en la probabilidad de apertura y del tiempo abierto a potenciales de mantenimiento de -60 y -40 mV, aumento de la frecuencia de las salvas, menor número de grupos de estas, pero con duración mayor; esto también podría sugerir que la movilización de Cl⁻ durante el kindling pudiera ser mayor.

Probablemente los cambios observados en la probabilidad de apertura y el tiempo abierto, pudieran ser parte de un mecanismo de desinhibición del sistema hipocampal que favoreciera la instalación de descargas epilépticas, o como parte de un mecanismo que intente compensar la hiperexcitabilidad de la célula.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos mostraron cambios muy específicos en la actividad del canal de cloruro; un canal no sensible al voltaje como el registrado, mostró un incremento en la probabilidad de apertura y en el tiempo abierto, de la frecuencia de apertura a -60 y -40 mV de potencial de membrana, pero sin cambios a otros potenciales, lo que sugiere la activación de algún mecanismo de regulación del canal durante el kindling, que pudiera estar activándolo a estos voltajes. Como parte de las perspectivas de este trabajo podríamos sugerir el estudio de una posible modulación del canal de Cl^- ; esta supuesta modulación pudiera estar inhibida, y al establecerse el kindling activarse; un posible mecanismo de esto podría ser la regulación del canal vía una proteína "G". Esta posibilidad puede ser factible dado que cuando se efectuaron registros en la configuración de adherido a la célula (no se muestran), donde toda la maquinaria de proteínas intramembranales están intactas se obtuvieron los mismos resultados que con los registros realizados en la configuración de inside-out, lo que podría apoyar que a pesar de desprender un fragmento de la membrana celular se conservan los componentes asociados, como las proteínas "G".

La regulación de canales iónicos por proteínas G es un mecanismo muy común en distintos tipos de canales iónicos, por ejemplo, el canal de potasio de la rectificación entrante en corazón (Sakmann *et al.*, 1983), canales de potasio en células piramidales de hipocampo (van Dongen *et al.*, 1988), canales de calcio en neuronas y células neurosecretoras (Hescheler *et al.*, 1987), canales de cloruro activados por GABA en neuronas de la raíz dorsal (Holz *et al.*, 1986;

López y Brown, 1991; Pollo *et al.*, 1991), y se ha descrito regulación de canales de cloruro por proteínas G en células epiteliales (Ismailov *et al.*, 1996).

11. BIBLIOGRAFIA

- Alger, B. E. and Nicoll, R. A. (1979). GABA mediated biphasic inhibitory response in the hippocampus. *Nature Lond.* **281**, 315-317.
- Alger, B. E. and Nicoll, R. A. (1982). Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. Lond.* **328**, 125-141.
- Alvarez-Leefmans, F. J. (1990). Intracellular Cl⁻ regulation and synaptic inhibition in vertebrate and invertebrate neurons. In *Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle, and Glial Cell* (F. J. Alvarez-Leefmans and J. M. Russel, eds.) 109-158. Plenum Press, New York.
- Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I. A. and Mosfeldt-Larsen. (1980). Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-butyric acid. *J. Physiol. Lond.* **305**, 279-296.
- Andrew, L. and Blatz, A. L. (1991). Properties of single fast chloride channels from rat cerebral cortex neurons. *J. Physiol.* **441**, 1-21.
- Ascioti, C., DeSarro, G. B., Meldrum, B. S. and Nistico, G. (1986). Calcium entry blockers as anticonvulsant drugs in DBA/2 mice. *Br. J. Pharmacol.* **88**, 379.
- Attwell, P. J. E., Kaura, S., Bradford, H. F., Croucher, M. J., Jane, D. E. and Watkins, J. C. (1995). Blockade of both epileptogenesis and glutamate release by (1S, 3S)-ACPD, a presynaptic glutamate receptor agonist. *Brain Res.* **698**, 155-162.
- Ben-Ari, Y., Lago Wski, J., Tremblay, E. and LeGal LaSalle, G. (1979). A new mode of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* **163**, 176-179.
- Blatz A. L. (1991). Properties of fast chloride channels from rat cerebral cortex neurons. *J. of Physiology* (London). **441**, 1-21.
- Blatz A. L. and Magleby, K. L. (1983). Single voltage-dependent chloride selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys.* **43**, 237-241.
- Blatz A. L. and Magleby, K. L. (1986). Quantitative description of three modes of activity of fast chloride channels from rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)*. **378**, 141-174.
- Bliss, T.V.P. and Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* **232**, 357-374.
- Bliss, T.V.P. and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)*. **232**, 331-356.
- Bliss, T.V.P., and Lynch, M.A. (1988). Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: properties and mechanisms. In P.W. Landfield and S.A. Deadwyler (Eds.), *Long-Term Potentiation: From Biophysics to Behavior*, Liss, New York, 3-72.
- Bolger, G. T., Weissman, B. A. and Skolnick, P. (1984). The behavioral effects of the calcium agonist BAY K 8644 in the mouse; antagonism by the calcium antagonist nifedipine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **328**, 373-377.
- Bretag, A. H. (1987). Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* **67**, 618-724.
- Bryant, S. H. and Morales-Aguilera, A. (1971). Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J. Physiol. (London)* **219**, 367-383.
- Callahan, P. M., Paris, J. M., Cunningham, K. A., Shinnick-Galagher, P. (1991). Decrease of GABA-immunoreactive neurons in the amygdala after electrical kindling in the rat. *Brain Res.* **555**, 335-339.

- Chapman, A., Keane, P. E., Meldrum, B. S., Simiand, J. and Vernieles, J. C. (1982). Mechanism of anticonvulsant action of Valproate. *Progr Neurobiol.* **19**, 315-359.
- Chesnoy-Marchais, D. (1982). A Cl⁻ conductance activation by hyperpolarization in *Aplysia* neurons. *Nature (London)*. **299**, 359-361.
- Chesnoy-Marchais, D. and Evans, M. G. (1986). Cl⁻ channels activated by hyperpolarization in *Aplysia* neurons. *Pflugers Arch.* **407**, 694-696.
- Chesnoy-Marchais, D. (1990). Hyperpolarization-activated chloride channels in *Aplysia* neurons. In Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle, and Glial Cell (F. J. Alvarez-Leefmans and J. M. Russel, eds.) 367-382. Plenum Press, New York.
- Cota, G., and Armstrong, C. M. (1988). Potassium channel "inactivation" induced by soft-glass patch pipettes. *Biophys. J.* **53**, 107- 109.
- Cotman, C. W. and Nadler, J. V. (1981). Glutamate and aspartate as hippocampal transmitters: Biochemical and pharmacological evidence. In P. J. Roberts, J. Storm-Mathisen and G. A. R. Johnson (Eds). *Glutamate: Transmitter in the central Nervous system*. 117-154.
- Coutinho-Netto, J., Abdul Ghani, A. S., Collins, J. F. and Bradford, H. F. (1981). Is a glutamate trigger factor in epileptic hyperactivity? *Epilepsia*. **22**, 289-296.
- Croucher, M. J., Bradford, H. F., Sunter, D. C. and Watkins, J. C. (1988). Inhibition of the development of electrical kindling of the prepyriform cortex by daily focal injections of excitatory amino acid antagonists. *Eur. J. Pharmac.* **152**, 29-38.
- Croucher, M. J., Cotterell, K. L. and Bradford, H. F. (1992). Effects of daily focal NMDA pretreatment on the parameters of amygdaloid electrical kindling. *Br. J. Pharmac.* **103**, 216.
- Crunelli, V., Assaf, S. Y. and Kelly, J. S. (1983). Intracellular recording from granule cells of the dentate gyrus in vitro. In: *Neurobiology of the Hippocampus* edited by W. Seifert, London: Academic. 197-214.
- Currie, S., Heathfield, K. W. G., Henson, R. A. and Scott, D. F. (1971). Clinical course and prognosis of temporal lobe epilepsy a survey of 666 patients. *Brain*. **94**, 173-190.
- Davies, G. and Peterson, D. W. (1989). Normal extracellular calcium levels block kindling seizures. *Expl Neurol.* **106**, 99-101.
- de Florida, F.A. and Delgado, J. M. R. (1958). Lasting Behavioral and EEG Changes in Cats Induced by Prolonged Stimulation of Amygdala. *Am. J. Physiol.* **193**, 223-230.
- Dingledine, R. (1983). N-Methyl-aspartate activates voltage-dependent calcium conductance in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol. (Lond.)* **343**, 385-405.
- Dolin, S. J. and Little, H. J. (1986). The dihydropyridine nifedipine prevent nitrous oxide withdrawal seizures in mice. *Br. J. Addict.* **81**, 708.
- Dolphin, A. C., Errington, M. L. and Bliss, T. V. P. (1982). Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature (Lond.)*. **297**, 494-498.
- Dreifuss, F. E. (1981). Proposal for revised clinical and EEG classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. **22**, 489-501.
- During, M. J. and Spencer D. D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *The Lancet*. **341**, 1607-1610.
- Evans, M. C., Griffiths, T. and Meldrum, B. S. (1984). Kainic acid seizures and the reversibility of calcium loading in vulnerable neurons in the hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **10**, 285-302.
- Fenwick, E. M., A. Marty, and E. Neher. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*. **331**, 599-635.
- Ferry, D. R. and Glossmann, H. (1982). Evidence for multiple receptor sites within the putative calcium channel. *Arch. Pharmacol.* **321**, 80-83.

- Fisher, R. S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.* **14**, 245-278.
- Fox, J. A. (1987). Ion channel subconductance states. *J. Membr. Biol.* **97**, 1-8.
- Franciolini, F. and Nonner, W. (1987). Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* **90**, 453-478.
- Franciolini, F. and Nonner, W. (1994). A multi-ion permeation mechanism in neuronal background chloride channels. *J. Gen. Physiol.* **104**, 725-746.
- Franciolini, F. and Petris, A. (1990). Chloride channels of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **103**, 247-249.
- Frush, D. P., Giacchino, J. L. and McNamara, J. O. (1986). Evidence implicating dentate granule cells in development of entorhinal kindling. *Expl Neurol.* **92**, 92-101.
- Giacchino, J., Somjen, G., Frush, D. and McNamara, J. O. (1984). Lateral entorhinal cortical kindling can be established without potentiation of the entorhinal-granule cell synapse. *Expl Neurol.* **86**, 483-492.
- Girgis, M. (1981). Kindling as a model for limbic epilepsy. *Neuroscience.* **6**, 1695-1706.
- Goa, K. L., Ross, S. R. and Chrisp, P. (1993). Lamotrigine. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs.* **46**, 152-176.
- Godin, Y., Heiner, L., Mark, J. and Mandel, P. (1969). Effects of di-n-propylacetate, an anticonvulsant compound, on GABA metabolism. *J. Neurochem.* **16**, 869-873.
- Gogelein, H. (1988). Chloride channels in epithelia. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**, 521-547.
- Graham V. Goddard. (1983). The kindling model of epilepsy. *TINS.* **2**, 275-279.
- Gray, P. T. A., Bevan, S. and Ritchie, J. M. (1984). High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc. R. Soc. London B.* **221**, 395-409.
- Gray R. and Jhonston D. (1985). Rectification of single GABA-gated chloride channels in adult hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* **54**, (1), 134-142.
- Greger, R. (1990). Chloride channel blockers. *Meth. Enzymol.* **191**, 793-809.
- Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D. and Betz, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotine acetylcholine receptors. *Nature (London).* **328**, 215-220.
- Griffiths, T., Evans, M. C. and Meldrum, B. S. (1982). Intracellular sites of early calcium accumulation in the rat hippocampus during status epilepticus. *Neuros. Lett.* **30**, 329-334.
- Hagiwara, S., Miyazaki, S. and Rosenthal, N. P. (1976). Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* **67**, 621-638.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflugers. Arch.* **391**, 85- 100.
- Harvey, P. K. P., Bradford, H. F. and Davison, A. N. (1975). The inhibitory effects of sodium dipropyl acetate on the degradative enzymes of the GABA shunt. *FEBS Lett.* **52**, 251-254.
- Heinemann, V. and Hamon, B. (1986). Calcium and epileptogenesis. *Expl Brain Res.* **65**, 1-10.
- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W. and Shultz, G. (1987). The GTP-binding protein, G_o, regulates neuronal calcium channels. *Nature (Lond).* **325**, 445-447.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Second ed. *Sinauer Associates Inc Publishers.*
- Hoffmeister, F., Benz, Y., Heise, A., Krause, H. P. and Nuser, V. (1982). Behavioral effects of nimodipine in animals. *Arzneim. Forsch.* **32**, 347-360.

- Hutter, O. F. and Warner, A. E. (1967). Action of some foreign cations and anions on the chloride permeability of frog muscle. *J. Physiol. (London)*. **189**, 445-460.
- Ismailov, I. I., Jovov, B., Fuller, C. M., Berdiev, B. K., Keeton, D. A. and Benos, D. J. (1996). G-protein regulation of outwardly rectified epithelial chloride channels incorporated into planar bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 776-780.
- Jackson J. H. (1899). On asphyxia in slight epileptic paroxysms on the symptomatology of slight epileptic fits supposed to depend on discharge-lesions of the uncinata gyrus. *Lancet*. **1**, 79. (Citado por Girgis, M. 1981)
- Jones, R. S. G. (1993). Entorhinal-hippocampal connections: A speculative view of their functions. *Trends Neurosci.* **16**, 58-64.
- Jung, M. J., Lippert, B., Metcalf, B. W., Bohlen, P. and Schechter, P. J. (1977). γ -Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: Effects on brain GABA metabolism in mice. *J. Neurochem.* **29**, 797-802.
- Kaura, S., Bradford, H. F., Young, A. M. J., Croucher, M. J. and Hughes, P. D. (1995). The effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurochem.* **65**, 1240-1249.
- Knowles, W. D. and Schwartzkroin, P. A. (1981). Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slice. *J. Neurosci.* **1**, 318-322.
- Köhler, C. A. (1985). Projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **56**, 13-19.
- Korf, J. and Postema, F. (1984). Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J. Neurochem.* **43**, 1052-1060.
- Korn, S. J., Giacchino, J. L., Chamberlin, N. L. and Dingledine, R. (1987). Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.* **57**, 325-340.
- Koyama, Y. (1972). Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and non-epileptogenic cat's cortex. *Can. J. Physiol. Pharmac.* **50**, 740-752.
- Koyama, I. and Jasper, H. (1977). Amino acid content of chronic undercut cortex of the cat in relation to electrical discharge: Comparison with cobalt epileptogenic lesions. *Can. J. Physiol. Pharmac.* **55**, 523-536.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J. and Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. **362**, 127-133.
- Lacaille, J. C., Mueller, A. L., Kunkel, D. D. and Schwartzkroin, P. A. (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.* **7**, 1979-1993.
- Ladarola, M. J. and Gale, K. (1982). Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by GABA. *Science*. **218**, 1237-1240.
- Li, M., McCann, J. D. and Welsh, M. J. (1990). Apical membrane Cl⁻ channels in airway epithelia: Anion selectivity and effect of an inhibitor. *Am. J. Physiol.* **259**, C295-C301.
- Liedtke, C. M. (1989). Regulation of chloride transport in epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 143-160.
- Lipicky, R. J., Bryant, S. H. and Salmon, J. H. (1971). Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.* **50**, 2091-2103.
- Lopes Da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H. and Lohman, H. M. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol. Rev.* **70**, 453-511.

- Loscher, W. and Schwark, W. S. (1987). Further evidence for abnormal GABAergic circuits in amygdala kindled rats. *Brain Res.* **420**, 385-390.
- Loscher, W. and Siemes, H. (1984). Valproic acid increases GABA in CSF of epileptic children. *Lancet*. **2**, 225.
- Ludewig, U., Jentsch, T. J. and Pusch, M. (1997). Analysis of a protein region involved in permeation and gating of the voltage-gated Torpedo chloride channel ClC-0. *J. Physiol. (London)*. **498**, 691-702.
- Ludewig, U., Pusch, M. and Jentsch, T. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature*. **383**, 340-343.
- Lukács, G. L. and Moczydlowski, E. (1990). A chloride channel from lobster walking leg nerve. Characterization of single-channel properties in planar lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* **96**, 707-733.
- Macdonald, R. L., Rogers, C. J. and Twyman, R. E. (1989). Kinetic properties of the GABA_A receptor main-conductance state of mouse spinal cord neurons in culture. *J. Physiol. (London)*. **410**, 479-499.
- Macdonald, R. L. and Olsen, R. W. (1994). GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 569-602.
- MacLean, P. D. (1970). The limbic brain in relaxation to psychosis. In *Physiological Correlates of Emotion*. 0.0x 12 De. 0-10 Academic Press, N. Y. (Citado por Girgis, M. 1981)
- Mangus O., Penfield W. and Jasper H. (1952). Mastication and consciousness in epileptic seizures. *Acta psychiat. Chicago* **17**, 113-123.
- Matsuda, H., Matsuura, H. and Noma, A. (1989). Triple-barrel structure of inwardly rectifying K⁺ channel revealed by Cs⁺ and Rb⁺ block in guinea-pig heart cells. *J. Physiol. (London)*. **413**, 139-157.
- Maynam, N. V. B., Katz, L., Hare, T. A., Gerber, J. and Grossman, M. H. (1980). Levels of GABA in CSF in various neurological disorders. *Arch. Neurol.* **37**, 352-355.
- McNamara, J. O. (1988). Pursuit of the mechanisms of kindling. *TINS*. **11**, 33-36.
- Meldrum, B. S. (1989). GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br. J. Pharmac.* **27**(suppl. 1): 3-11.
- Meldrum, B. S. and Braestrup, C. (1984). GABA and the anticonvulsant action of benzodiazepines and related drugs. In: *Actions and interactions of GABA and Benzodiazepines*. 133-153. De N. G. Bowery. Raven Press: New York.
- Messenheimer, J. A., Harris, E. W. and Steward, O. (1979). Sprouting fibres gain access to circuitry trans-synaptically altered by kindling. *Expl Neurol.* **64**, 469-481.
- Meyer, F. B. Anderson, R. E., Sundt Jr., T. M. and Sharbrough, F. W. (1986a). Selective central nervous system calcium channel blockers-a new class of anticonvulsants. *Mayo Clin. Proc.* **61**, 239-247.
- Meyer, F. B. Anderson, R. E., Sundt Jr., T. M., Yaks, T. L. and Sharbrough, F. W. (1987). Suppression of pentylentetrazole seizures by oral administration of a dihydropyridine calcium antagonists. *Epilepsia*. **28**, 409-414.
- Meyer, F. B. Anderson, R. E. and Sundt Jr., T. M. (1988). Anticonvulsant properties of dihydropyridine calcium antagonists. *Drugs Today*. **24** (suppl 3): 175-186.
- Meyer, F. B. Tally, P., Anderson, R. E., Sundt Jr., T. M. and Yaks, T. L. (1986b). Inhibition of electrically induced seizures by dihydropyridine calcium channel blocker. *Brain Res* **384**, 180-183.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J. and Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature*. **383**, 337-340.
- Miles, R. and Wong, R. K. S. (1984). Unitary inhibitory synaptic potentials in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J. Physiol. Lond*. **356**, 97-113.

- Miles, R. and Wong, R. K. S. (1987a). Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol. Lond.* **388**, 611-629.
- Miller, C. (1982). Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Phil. Trans. R. Soc. London.* **299**, 401-411.
- Miller, C. and Richard, E. A. (1990). In Chloride transporters (F. J. Alvarez-Leefmans and J. M. Russel, eds.) 383-405. Plenum Press, New York.
- Miller, C. and White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2772-2775.
- Minamoto, Y., Itano, T., Tokuda, M., Matsui, H., Janjua, N. A., Hosokawa, K., Okada, Y., Murakami, T. H., Negi, T. and Hatase, O. (1992). *In vivo* microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amigdaloid kindled rat. *Brain Res.* **573**, 345-348.
- Misgeld, U., Deisz, R. A., Dodt, H. V. and Lux, H. D. (1986). The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science.* **232**, 1413-1415.
- Mody, I., W. Michael, Salter and F. MacDonald. (1989). Whole-cell voltage-clamp recordings in granule cells acutely isolated from hippocampal slices of adult or aged rats. *Neuroscience Letters.* **96**, 70-75.
- Moricutti, C., Pierelli, F., Sanarelli, L., Stefano, E., Peppe, A. and Mattioli, G. L. (1986). Antiepileptic effects of a calcium antagonist (nimodipine) on cefusolin induced epileptogenic foci in rabbits. *Epilepsia.* **27**, 498-503.
- Nowak, L., Asher, P. and Berwald-Netter, Y. (1987). Ionic channels in mouse astrocytes. *J. Neurosci.* **7**, 101-109.
- Ogden, D. C., and P. R. Stanfield. (1987). Introduction to single channel recording. In microelectrode Technique. *The Plymouth Workshop Handbook*. N. B. Standen, P. T. A. Gray, and M. J. Whitaker editor. Company of Biologists Ltd., Cambridge. 63-81.
- Olney J. W. (1985). Excitatory transmitters and epilepsy-related brain damage. In J. R. Smythies, R. J. Bradley (Eds.), *International Review of Neurobiology*. Academic, London, 337-362.
- Olsen, R. W. (1981). GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.* **37**, 1-13.
- Palade, P. T. and Barchi, R. L. (1977). On the inhibition of membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acids. *J. Gen. Physiol.* **69**, 879-896.
- Palmer, K. J. and McTavish, D. (1993). Felbamate: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs.* **45**, 1041-1065.
- Parsonage, M. (1986). Problems in the classification of the paroxysmal seizures, Chap. 2. In: *What is Epilepsy?* Eds M. R. Trimble and E. H. Reynolds. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Patlak J. B. (1988). Sodium channel subconductance levels measured with a new variance-mean analysis. *J. Gen. Physiol.* **92**, 413-430.
- Purpura, D. P., Penry, J. K., Tower, D. B., Woodbury, D. M. and Walter, R. D. (Eds) (1972). *Experimental Models of Epilepsy: A Manual for the Laboratory Worker*. Raven Press: New York.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. and Jentsch, T. J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527-531.
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* **32**, 281-294.
- Racine, R. J., Milgram, N. W. and Hafner, S. (1983). Long-term potentiation phenomena in rat limbic forebrain. *Brain Res.* **260**, 217-231.

- Ribak, C. E. (1983). Morphological, biochemical and immunocytochemical changes of the cortical GABAergic system in epileptic foci. In *Epilepsy*: 109-130. Eds. A. A. Ward, J. K. Peng and D. Purpura. Raven Press: New York.
- Ribak, C. E. (1985). Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci. *Brain Res* **326**, 251-260.
- Ribak, C. E. and Anderson, L. (1980). Ultrastructure of the pyramidal basket cells in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* **192**, 903-916.
- Roberts, E. (1984). GABA-related phenomena, models of nervous system function, and seizures. *Ann Neurol* **16**(suppl.), 77-89.
- Sakmann, B., and E. Neher. (1983). *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York, NY, 503
- Sakmann, B., Noma, A. and Trautwein, W. (1983). Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature (Lond)* **303**, 250-253.
- Sanchez, D. Y. and Blatz, A. L. (1992). Voltage-dependent block of fast chloride channels from rat cortical neurons by external tetraethylammonium ion. *J. Gen. Physiol.* **100**, 217-231.
- Sansom, S. C., La, B. Q. and Carosi, S. L. (1990). Double barrelled chloride channels of collecting duct basolateral membrane. *Am. J. Physiol.* **259**, F46-F52.
- Sato, K., Morimoto, K. and Okamoto, M. (1988). Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Res* **463**, 12-20.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H. and Barnard, E. A. (1987). Sequence and functional expression of the GABA_A receptor show a ligand-gated receptor super-family. *Nature (London)* **328**, 221-227.
- Schwarze, W. and Kolb, H. A. (1984). Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes. *Pflügers Arch* **402**, 281-291.
- Shapiro, M. S. and DeCoursey, T. E. (1991). Chloride currents in bovine pulmonary artery endothelial cells. In "Ion Channels of vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial cells" (N. Sperelakis and H. Kuriyama, eds.), 327-336. Elsevier Science, Amsterdam.
- Shelton, R. C., Grebb, J. A. and Freed, W. J. (1987). Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel agonist BAY K 8644. *Brain Res* **402**, 399-402.
- Simler, S., Ciesielski, L., Maitre, M., Ranriarisoa, H. and Mandel, P. (1973). Effect of sodium *n*-dipropyl acetate on audiogenic seizures and brain GABA levels. *Biochem. Pharmac.* **22**, 1701-1708.
- Spinks, A. and Waring, W. S. 1963. Anticonvulsant drugs. *Prog. Med. Chem.* **3**: 261-331.
- Spruce, A. E., Standen, N. B. and Stanfield, P. R. 1987. Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **382**, 213-236.
- Standen, N. B., P. R. Standfield, T. A. Ward, and S.W. Wilson. (1984). A new preparation for recording single-channel currents from skeletal muscle. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **221**, 455-358.
- Standen, N. B., P. T. A. Gray, and M. J. Whitaker, editors; 1989, *Microelectrode Techniques*, pp 83-104. Company of biologist LTD., Cambridge.
- Stanfield, P. R. (1970). The differential effects of tetraethylammonium and zinc ions on the resting conductance of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (London)* **209**, 213-256.

- Steinmeyer, K., Ortland, C. and Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature (London)* **354**, 301-304.
- Storm-Mathisen, J., Leknes, A. K., Bore, A. T., Linevaaland, J., Edminson, P., Hång, F. M. S. and Ottersen, O. P. (1983). First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature London* **301**, 517-520.
- Strange, K. (1991). Volume regulating Cl⁻ loss after Na⁺ pump inhibition in CCT principal cells. *Am J Physiol* **260**, F225-F234.
- Stringer, J. L. and Lothman, E. W. (1988). Epileptiform discharges induced by altering extracellular K⁺ and Ca²⁺ in rat hippocampal slice. *Expl Neurol* **101**, 147-157.
- Sutherland, J. M. and Tait, H. (1971). *The Epilepsies*. Churchill-Livingstone: London.
- Sutula, T., Harrison, C. and Steward, O. (1986). Chronic epileptogenesis induced by kindling of the entorhinal cortex: The role of the dentate gyrus. *Brain Res* **385**, 291-299.
- Sutula, T., and Steward, O. (1987). Facilitation of kindling by prior induction of long-term-potentiation in the perforant path. *Brain Res* **420**, 109-117.
- Taube, J. S. and Schwartzkroin P. A. (1987). Hyperpolarizing responses to applications of glutamate in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci. Lett* **78**, 85-90.
- Thompson, S. M. and Gähwiler, B. H. (1989a). Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus *in vitro*. *J Neurophysiol* **61**, 501-511.
- Thompson, S. M. and Gähwiler, B. H. (1989b). Activity-dependent disinhibition. II. Effect of extracellular potassium, furosemide, and membrane potential on E_{Cl⁻} in hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol* **61**, 512-523.
- Tower, D. B. (1960). *Neurochemistry of Epilepsy* C. C. Thomas: Springfield, IL.
- Twyman, R. E. and Macdonald, R. L. (1992). Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single channel kinetic properties. *J Physiol (London)* **456**, 215-245.
- Ueda, Y. and Tsuru, N. (1994). Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. *Epilepsy* **18**, 85-88.
- Upton, N. (1994). Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: Rational design and serendipitous findings. *Trends Pharmac. Sci.* **15**, 456-463.
- Valverde, M. A., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C. and Higgins, C. F. (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature (London)* **355**, 830-833.
- Van Dongen, A., Codina, J., Olate, J., Mattera, R. and Joho, (1988). The brain protein, G_o, directly activates K⁺ channels in hippocampal pyramidal cells. *Science* **242**, 1433-1437.
- Walden, J., Speckmann, E. J. and Witte, O. W. (1985). Suppression of focal epileptiform discharges by intraventricular perfusion of a calcium antagonist. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **61**, 299-309.
- Warner, A. E. (1972). Kinetic properties of the chloride conductance of frog muscle. *J Physiol (London)* **227**, 291-312.
- Weiss, D. S. and Magleby, K. L. (1990). Voltage dependence and stability of the gating kinetics of the fast chloride channel from rat skeletal muscle. *J Physiol (London)* **426**, 145-176.
- White, M. M. and Miller, C. (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem* **254**, 10161-10166.
- Woll, K. H., Leibowitz, M. D., Neumcke, B. and Hille B. (1987). A high-conductance anion channel in adult amphibian skeletal muscle. *Pflügers Arch* **410**, 632-640.
- Woll, K. H. and Neumcke, B. (1987). Conductance properties and voltage dependence

of an anion channel in amphibian skeletal muscle. *Pflugers Arch.* **410**, 641-647.

Wood, J. H., Glaeser, B. S., Enna, S. J. and Hare, T. A. (1979). Low cerebrospinal fluid GABA content in seizure patients. *Neurology*. **29**, 1203-1208.

Woodbury, J. W. and Miles, P. R. (1973). Anion conductance of frog muscle membranes: One channel, two kinds of pH dependence. *J. Gen. Physiol.* **62**, 324-353

Yeckel, M. F. and Berger, T. W. (1990). Feed forward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: Redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5832-5836.

Zanotto, L. and Heinemann, U. (1983). Aspartate and glutamate induced reduction in extracellular free calcium and sodium concentration in area CA1 of *in vivo* hippocampal slices of rats. *Neurosci. Lett.* **35**, 79-84.