



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE RECEPTOR DELTA OPIOIDE EN CEREBRO DE RATAS CON EPILEPSIA POR KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO Y POR ACIDO KAINICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CLAUDIA IVONNE ARAIZA SALDAÑA

TUTORA: DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: " ANALISIS COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE RECEPTOR DELTA OPIOIDE EN CEREBRO DE RATAS CON EPILEPSIA POR KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO Y POR ACIDO KAINICO "

realizado por CLAUDIA IVONNE ARAIZA SALDAÑA
con número de cuenta 9325119-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

Propietario

DRA. MARIA DEL ROCIO ELIZABETH ORTIZ BUTRON

Propietario

DRA. MARIA LUISA FANJUL DE MOLES

Suplente

DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL

Suplente

BIOL. ALEJANDRO HUERTA SAQUERO

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOL



DR. EBERTO NOVELO MALDONADO DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la Institución que formó mis bases académicas y que me ha dado la satisfacción de llevar conmigo todas las vivencias de la carrera de Biología y sobre todo por crear en mí la visión que poseo de lo que es la Vida.

A la Facultad de Ciencias , a mis maestros y a mis amigos quienes hicieron de mi estancia una experiencia única.

Agradezco al Departamento de Farmacobiología de la Unidad Sur del CINVESTAV y al Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente" por permitirme llevar a cabo esta Tesis de Licenciatura en sus instalaciones.

El presente estudio se realizó con el apoyo parcial del CINVESTAV, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente", Fundación Miguel Alemán y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT proyecto 31702-M.

Este estudio se realizó con el apoyo técnico del Lic. Héctor Vázquez, la M. en C. Leticia Neri Bazán, las Técnicas Magdalena Briones, Angelita, Belén y el Sr. Arturo Franco.

AGRADECIMIENTOS:

“A mi abuelo, que aunque no pudo acompañarme en vida en este momento, representa en mí toda la fuerza, el coraje y las ganas de vivir por lo que le brindo este logro en donde quiera que se encuentre.”

A mi abuela que me cuida desde donde está. A mis viejos, por estar siempre conmigo, por esforzarse tanto en tolerarme y entenderme, por enseñarme a vivir, por haberme formado y ayudado a ser lo que soy y por todo el esfuerzo que hicieron para que obtuviera este logro. A mis hermanas, Olivia por su humor y fuerza, Carmen por su sensatez y humildad, Güeri por su sensibilidad y por escucharme.

A Alfonso, por ser como es, por todo lo que me ha dado, por dejarme compartir tanto, por cambiar mi existencia y por ser quien es en mi vida.

A Emiliano por que al venir al mundo me enseñó muchas cosas y por que siento por él un gran cariño.

A Abud por su amistad, y por apadrinarme el labo, y a Clau por hacer a Abud tan feliz. A mis amigas Ericka y Ana Martha que a pesar de tantos años siguen estando conmigo y apoyándome. A mis amigos de la Fac. que no son mencionados pero que han tenido algo que ver con mi formación como persona.

A Manolita por su sencillez, su amistad, por hacerme reír tanto y por su apoyo en todo momento. A Leo por su dedicación y entrega en lo que hace, a Lili por compartir conmigo momentos de nostalgia, Lety por contagiar su paz interna y por su afán de ayuda, por consertimos tanto, Eva por sus ocurrencias y dedicación, Chela por su atención y perseverancia, Male por su ayuda y su sonrisa siempre, a Angelita por su sencillez y compañía, al Sr. Arturo por ayudarme siempre en momentos de emergencia, a Héctor por su disposición y por complacerme con tantos y tantos artículos, a Ray por su temperamento y por escucharme. A todos por su disposición a apoyarme de la manera que lo hicieron y por hacerme sentir como lo hicieron dentro del equipo que somos.

A la Dra. Rocha por ser para mí un ejemplo a seguir, por su fuerza y conocimiento, por su forma de ser, por sus enseñanzas y consejos, por hacerme crecer, darme mucha seguridad, pulirme y ayudarme a lograr mis aspiraciones en todo momento; por ser quien es en mi vida, con mucho cariño.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA EPILEPSIA.....	7
1.2. EPILEPSIA EN LA ACTUALIDAD.....	7
1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS.....	10
1.4. SISTEMA LÍMBICO.....	11
1.5. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL.....	13
1.6. MODELOS EXPERIMENTALES DE ELT.....	14
1.6.1. "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO.....	14
1.6.2. ÁCIDO KAÍNICO.....	16
1.7. PÉPTIDOS OPIOIDES.....	19
17.2. RECEPTOR δ OPIOIDE.....	21
1.8. PÉPTIDOS OPIOIDES Y ELT.....	23
1.8.1. OPIOIDES ENDÓGENOS Y EPILEPSIA EN HUMANOS.....	24
1.8.2. OPIOIDES ENDÓGENOS Y EPILEPSIA EN RATAS.....	25
1.8.2.1. ENCEFALINAS Y "KINDLING".....	25
1.8.2.2. ENCEFALINAS Y ÁCIDO KAÍNICO.....	26
1.8.2.3. RECEPTOR δ Y EPILEPSIA EN RATAS.....	27
1.8.2.4. RECEPTOR δ , "KINDLING" Y ÁCIDO KAÍNICO.....	27

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	29
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1. ANIMALES.....	29
5.2. IMPLANTE DE ELECTRODOS.....	29
5.3. ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA TIPO "KINDLING".....	30
5.4. ÁCIDO KAÍNICO.....	30
5.5. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	31
5.6. AUTORRADIOGRAFÍA.....	32
5.7. ESTADÍSTICA.....	34
6. RESULTADOS	34
6.1. "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO.....	34
6.1.1. DESARROLLO DEL "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO.....	34
6.1.2. "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO Y RECEPTORES δ	35
6.2. ÁCIDO KAÍNICO.....	37
6.2.1. DESARROLLO DE EPILEPSIA POR ÁCIDO KAÍNICO.....	37
6.2.2. ÁCIDO KAÍNICO Y RECEPTORES δ	37
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIÓN	48
9. BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Periodos de la Epilepsia.....	9
Figura 2. Sistema Límbico Humano.....	12
Figura 3. Localización del Lóbulo Temporal en cerebro Humano.....	13
Figura 4. Fases conductuales del "kindling" Eléctrico Amigdalino.....	15
Figura 5. Estructura Química del Ácido Kaínico.....	16
Figura 6. Fases conductuales siguientes a la aplicación de Ácido Kaínico.....	18
Figura 7. Distribución del receptor δ en cerebro Humano.....	22
Figura 8. Conformación del receptor δ y su acoplamiento a proteínas G.....	23
Figura 9. Estructuras sometidas a análisis autorradiográfico.....	33
Figura 10. Estimulaciones necesarias para alcanzar las fases del "kindling".....	35
Figura 11. Cortes coronales de rata que indican niveles de receptor δ en CA2.....	36
Figura 12. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ en CA2.....	36
Figura 13. Cortes coronales de rata y niveles de receptor δ en NUBL.....	38
Figura 14. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ en NUBL.....	38
Figura 15. Cortes coronales y niveles de receptor δ en CXCING.....	39
Figura 16. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ en CXCING.....	39
Figura 17. Cortes coronales de rata y niveles de receptor δ en CXTEM.....	40
Figura 18. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ en CXTEM.....	40
Figura 19. Cortes coronales de rata y niveles de receptor δ en CXPI.....	41
Figura 20. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ en CXPI.....	41
Tabla1. Tipos de Opioides endógenos, receptores opioides y su distribución	20
Tabla2. Niveles de receptor δ en "Kindling" y AK.....	42

ABREVIATURAS

CGT: Convulsiones tónico-clónicas generalizadas

ELT: Epilepsia del Lóbulo Temporal

SNC: Sistema Nervioso Central

LTP: Potenciación a largo plazo

AK: Ácido Kaínico

EE: *Estatus Epilepticus*

NMDA: N-metil-D-Aspartato

ARNm: Ácido Ribonucleico -mensajero

AMPc: Monofosfato de Adenosina cíclico

GTP: Trifosfato de Guanosina

PET: Tomografía de Emisión de Positrones

RIA: Radioinmunoensayo

i.p.: intraperitoneal

i.c.v.: intracerebroventricular

i.m.: intramuscular

RESUMEN

La activación del receptor δ opioide produce un efecto inhibitorio en la actividad epiléptica. El "Kindling" eléctrico amigdalino y Ácido Kainico (AK) i.p. son dos modelos de epilepsia del lóbulo temporal (ELT) y activan al sistema de los opioides endógenos. Pacientes con ELT presentan un aumento significativo en los niveles de receptor δ opioide en la corteza temporal. En el presente estudio se evaluaron por autorradiografía los niveles de receptor δ en cerebro de ratas con epilepsia por "kindling" eléctrico amigdalino y por AK i.p. Se utilizaron ratas Wistar macho 250-300 gr. Para el "kindling" el grupo experimental (*KIND*: n=6) fueron ratas implantadas en la amígdala cerebral derecha y recibieron estimulación eléctrica diaria hasta establecer el estado kindled; el grupo control (*CTRKIND*: n=6) fue tratado de la misma forma pero no recibió estimulación eléctrica. A las 24 hrs. después del estado kindled los animales se sacrificaron por decapitación y sus cerebros se procesaron con autorradiografía para receptores δ . Para el tratamiento con AK el grupo experimental (*AK*: n=6) recibió una inyección de AK (10 mg/kg) en un volumen total de (1ml/kg i.p.). Los animales del grupo control (*CTRAK*: n=6) se manipularon igual que el grupo AK, excepto que se les inyectó solución salina. A los 40 días posteriores al tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación y sus cerebros se procesaron con autorradiografía para receptores δ incubando con (10 nM de $^3\text{H-DPDPE}$). El grupo de "kindling" obtuvo un decremento significativo en los niveles de receptor δ en la región CA2 derecha del hipocampo (ipsilateral al sitio de estimulación) (37%). Mientras que el grupo AK presentó niveles elevados del receptor δ en las siguientes áreas cerebrales: núcleos amigdalinos basolateral derecho (35%) e izquierdo (26%); las cortezas temporales derecha (57%) e izquierda (57%) y las cortezas del cíngulo derecha (59%) e izquierda (43%). Tres ratas (50%) del grupo AK mostraron un decremento significativo en la unión al receptor δ en las cortezas piriforme derecha (60%) e izquierda (69%). El "kindling" eléctrico amigdalino y el AK modificaron los niveles de receptor δ en forma distinta y asimétrica. Sin embargo los niveles de receptor δ producidos por AK en la corteza temporal de la rata, correlacionan de manera importante con los cambios observados en receptores δ en corteza temporal de pacientes con ELT. Los resultados obtenidos sugieren que el modelo de AK en rata, es el más óptimo para reproducir con eficiencia los cambios de los receptores δ opioide que se dan en humanos con ELT.

1.

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA EPILEPSIA

La palabra epilepsia es derivada del Griego *επιλαμβάνειν* (*epilambanein*) que significa ser tomado, ser sorprendido o ser atacado. En la antigua Grecia, como en nuestros días la gente ha hablado de tener una crisis y de haber tenido un ataque (García et al., 1999).

Las crisis convulsivas se consideraban el resultado de posesiones demoniacas, por lo que la epilepsia se consideró una enfermedad sagrada. Se atribuye a Hipócrates, alrededor del año 400 A.C., la primera definición de esta alteración cerebral que a continuación se presenta: "la epilepsia es una enfermedad del cerebro sin implicaciones religiosas que es mejor tratada por dietas y medicamentos" (Engel et al., 1984).

En el siglo XIX, cuando la epilepsia se consideraba un conjunto de trastornos manifestados por convulsiones generalizadas supuestamente asociadas a daño en la médula oblonga, Hughlings Jackson realizó la primera clasificación de la epilepsia indicando la existencia de diferentes tipos de crisis (Engel et al., 1997a). Desde entonces la epilepsia ha sido uno de los padecimientos cerebrales más estudiados. Así mismo, debido a que sus síntomas son tan evidentes y visibles, su estudio ha ayudado a la comprensión de las funciones del cerebro (Fernández, 1986).

1.2. EPILEPSIA EN LA ACTUALIDAD

En nuestros días la epilepsia se define como una enfermedad caracterizada por crisis epilépticas crónicas, recurrentes e impredecibles, originadas por descargas neuronales anormales, excesivas y sincronizadas (Engel et al., 1997c). Las crisis epilépticas, afectan al 1% de la población mundial, y se pueden asociar a cambios de conducta y manifestaciones clínicas (Engel, 1996; Cole, 2000).

En general se tiene el criterio de que las crisis epilépticas se presentan cuando un grupo de neuronas en el sistema nervioso central, descargan potenciales de acción anormales, desincronizados y secundarios a una despolarización repetitiva que interfiere con la función normal del cerebro (McNamara, 1994).

Las convulsiones pueden ser de dos tipos: "no epilépticas" cuando son producidas en un cerebro normal por tratamientos como electrochoque o la administración de convulsivantes químicos, las cuales nunca más vuelven a aparecer; y de tipo "epilépticas" cuando ocurren sin causa aparente y se presentan en forma crónica. Por otra parte, las crisis epilépticas también se clasifican en crisis parciales cuando el foco epiléptico se encuentra localizado en un solo hemisferio cerebral, y crisis generalizadas cuando el foco epiléptico genera una propagación de la actividad anormal a ambos hemisferios cerebrales. Una crisis parcial simple se asocia con la preservación de la conciencia, mientras que una crisis parcial compleja se acompaña de pérdida de la misma. Este último tipo de crisis se origina en el lóbulo temporal (McNamara, 1994).

A continuación se describen los tres periodos de la epilepsia (Fig. 1):

a) El periodo ictal (la crisis *per se*): representa una variedad de mecanismos neuronales aberrantes involucrando diferentes patrones de actividad excitatoria e inhibitoria, varios procesos de sincronización, así como diversas vías y regiones cerebrales. El evento ictal muestra una evolución, dependiendo del tipo de crisis de la cual dependerá la propagación de la descarga ictal. Generalmente se caracteriza por actividad eléctrica de alto voltaje y frecuencia rápida (Heinz et al., 1993).

b) El periodo postictal (de minutos a horas inmediatamente después de la crisis epiléptica). Este periodo se caracteriza por un incremento de los mecanismos que actúan para suprimir la crisis epiléptica, como es un incremento en la liberación de opioides endógenos (Heinz, 1993; McNamara, 1994; Rocha y col., 1994).

c) El periodo interictal (tiempo entre crisis y crisis). Representa un periodo de estabilidad y calma relativa, durante el cual, al haber sufrido un disturbio fisiopatológico, la predisposición a presentar una nueva crisis epiléptica es mínima (Engel, et al., 1997).

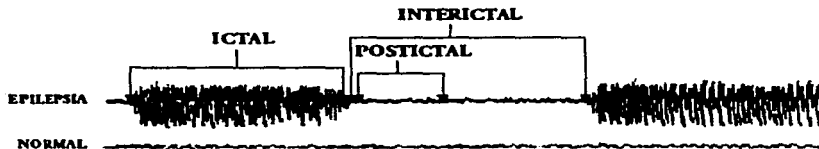


Figura 1. Registro electroencefalográfico de un paciente con epilepsia (registro superior) y un registro de un sujeto normal (registro inferior). Nótese que en el registro superior se muestran los tres periodos de la epilepsia antes descritos (Tomado de Fisher y Frost, 1991; Engel, 1997;).

En los periodos postictal e interictal, la probabilidad de producción de una crisis subsecuente disminuye. Este efecto se postula como el resultado de un aumento de mecanismos inhibidores produciendo así una elevación del umbral a la actividad epiléptica (Caldecott-Hazard, et al, 1984; Engel, 1997 a).

La epileptogénesis es un fenómeno por el cual la condición epiléptica es adquirida de manera progresiva. Dos elementos fisiológicos esenciales que representan el efecto neto del proceso de epileptogénesis son:

- a) Una excitabilidad celular aumentada, que induce a un desajuste neuronal y activación de mecanismos de despolarización que afectan la repolarización membranal.
- b) La formación de una red neuronal defectuosa la cual se deriva fundamentalmente del desarrollo de mecanismos de integración aberrantes, una sincronización anormal de poblaciones de neuronas, y propagación de las descargas epilépticas en rutas neuronales que ejercen efectos a distancia (Engel, 1989, 1997).

1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS

Las epilepsias se han clasificado y definido no sólo por los tipos de crisis manifestadas, sino también por influencia de otras características clínicas asociadas.

Los diferentes síndromes epilépticos pueden ser identificados por características como: tipos de crisis, localización del foco epiléptico, patrones de recurrencia, edad de inicio de las crisis, signos neurológicos y clínicos asociados, antecedentes familiares de la enfermedad y pronosis (Engel et al., 1997 b).

A continuación se presenta la clasificación de las crisis epilépticas dada por la Liga Internacional contra la Epilepsia, (1992).

I- Crisis Parciales

Se caracterizan por que el foco epiléptico se encuentra localizado en uno de los hemisferios cerebrales.

a) Crisis Parciales Simples (cuando no hay alteración de la conciencia)

- 1) Con signos motores.
- 2) Con síntomas somatosensoriales o sensoriales especiales.
- 3) Con signos o síntomas autonómicos.
- 4) Con síntomas psíquicos.

b) Crisis Parciales Complejas (con alteración de la conciencia)

- 1) Inicio parcial simple con deterioro posterior de la conciencia.
- 2) Con deterioro de la conciencia desde el inicio.

c) Crisis Parciales que evolucionan a Convulsiones Tónico-Clónicas Generalizadas (CGT).

- 1) Crisis parciales simples que evolucionan a CGT.
- 2) Crisis parciales complejas que evolucionan a CGT
- 3) Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas y posteriormente a CGT.

II- Crisis Generalizadas (convulsivas o no convulsivas)

- 1) Crisis de ausencias
- 2) Ausencias atípicas
- 3) Ausencia que progresa a CGT.
- 4) Crisis mioclónicas.
- 5) Crisis clónicas.
- 6) Crisis tónicas.
- 7) Crisis tónico-clónicas.
- 8) Crisis atónicas.

III- Crisis epilépticas no clasificadas:

- 1) Incluye a todas las crisis que no pueden clasificarse debido a datos incompletos o inadecuados.

IV- Adendum

- 1) Crisis epilépticas repetidas que ocurren en diversas circunstancias.
- 2) Crisis prolongadas o repetitivas (*Estatus epilepticus*): crisis persistentes por un periodo prolongado.

1.4. SISTEMA LÍMBICO

El sistema límbico está compuesto por estructuras cerebrales que forman al sustrato anatómico-funcional de la emoción y que por tanto regulan el estado interno del organismo con relación al mundo externo. Involucra a un grupo de estructuras corticales y subcorticales cuya activación produce respuestas fisiológicas, psicológicas y conductuales específicas. Entre estas estructuras se encuentran la corteza del cíngulo, la amígdala y el hipocampo (Fig. 2) las cuales se ha reportado que también están altamente involucradas en el fenómeno epiléptico (Goddard et al, 1969; Hendelman, 2000).

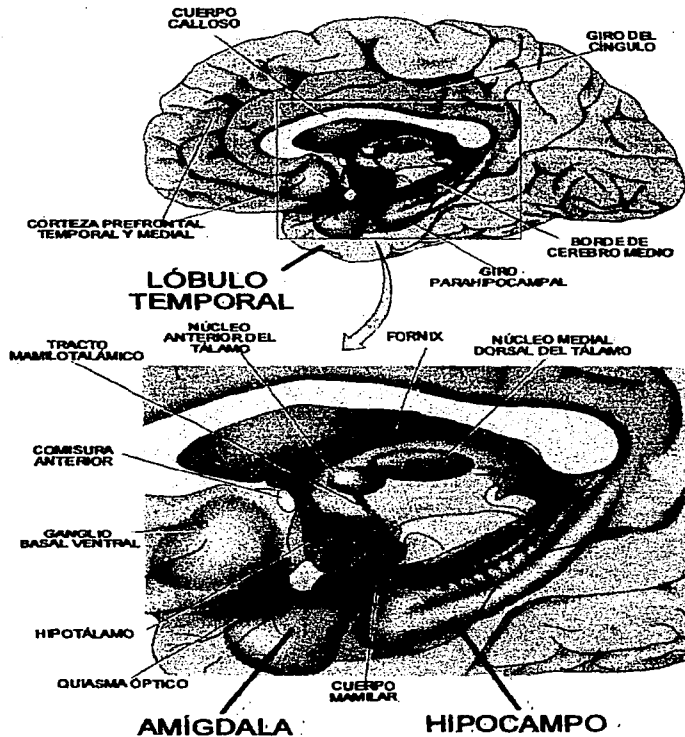


Figura 2. Diagrama que representa en color verde las estructuras cerebrales que conforman al Sistema Límbico humano (Tomado y Modificado de Hendelman, 2000).

El análisis de la organización neuronal del complejo amigdalino revela una relación muy íntima de éste con estructuras integrativas. Algunas fibras de la amígdala convergen sobre el septum y la estria terminalis y llegan a las regiones hipotalámicas por un sistema ventral amigdalohipotalámico.

Por otra parte, la amígdala envía impulsos al hipocampo a través de la corteza piriforme, la cual permite una comunicación funcional entre ambas estructuras (Cavazos, 1994). La corteza del cíngulo se encuentra cerca del cuerpo calloso y está conectada recíprocamente al giro hipocampal. Estas conexiones, que se unen a varias porciones del sistema límbico, son conocidas como circuito de Pápez. Las proyecciones de este circuito al lóbulo frontal constituyen una base anatómico-funcional de las emociones (Makram, 1981).

1.5. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

El 40% de los pacientes con epilepsia presentan Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT), que es la forma más común de epilepsia en adultos y es frecuentemente idiopática, es decir de origen desconocido (Sperberg et al., 1992; Engel, 1996). A continuación se muestra la ubicación del lóbulo temporal en el cerebro humano.

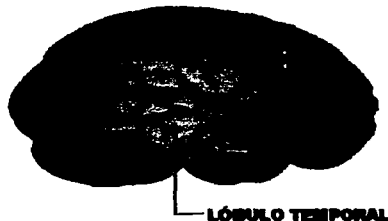


Figura 3. Vista lateral de hemisferio cerebral humano en donde se indica la localización del Lóbulo Temporal (Tomado de Hendelman, 2000).

La ELT se caracteriza por crisis parciales complejas recurrentes que se inician con auras (alteraciones de la percepción) visuales, auditivas y/o cognoscitivas. Los pacientes se distraen, tienen amnesia retrógrada, presentan automatismos como movimientos de labios, frotamiento de manos y búsqueda sin objeto (Heinz et al., 1993).

Las crisis parciales complejas pueden durar desde segundos hasta minutos (Engel, 1989) e involucran estructuras límbicas del lóbulo temporal (Fig. 3), incluyendo al hipocampo, amígdala y estructuras extralímbicas como la neocorteza temporal. La ELT es un padecimiento causado por diferentes etiologías pero está frecuentemente acompañado por una lesión neuropatológica característica que es la esclerosis hipocampal, la cual se refiere a pérdida neuronal y gliosis en hipocampo (Engel, 1996; Heinz, 1993). La asociación de la epilepsia con este patrón de daño fue inicialmente reconocido por examinación histológica en el siglo XIX (Sperber et al., 1992).

Aunado a lo anterior, se sabe que entre las características clínicas de la ELT existe un bajo umbral para la producción de postdescargas de estructuras como la amígdala, así como la aparición de agresividad. Así mismo, las manifestaciones interictales de la ELT se entienden en términos de excitabilidad amigdalina, como los brotes súbitos y violentos de irritabilidad (Makram, 1981).

1.6. MODELOS EXPERIMENTALES DE ELT

Se han desarrollado modelos experimentales de epilepsia en animales que reproducen los cambios que involucra la ELT en humanos. A continuación se describen dos de ellos: el "kindling" eléctrico amigdalino y la aplicación de ácido kaínico vía i.p.

1.6.1. KINDLING ELÉCTRICO AMIGDALINO

El modelo "kindling" (encendido) es generado en un animal normal por la aplicación diaria de estímulos eléctricos inicialmente subconvulsivos, que de forma progresiva favorecen el establecimiento de una condición epiléptica permanente (Goddard et al, 1969).

En la rata, el "kindling" eléctrico se caracteriza por cambios conductuales progresivos que se dividen en cinco fases (Fig. 4), las cuales se describen a continuación:

Fases del "kindling" eléctrico amigdalino

- I.- Movimientos faciales.
- II.- Fase I y movimientos de cabeza.
- III.- Fase II más mioclonias de miembros anteriores.
- IV.- Fase III y posición de canguro.
- V.- Fases anteriores y pérdida de la postura con movimientos tónico-clónicos generalizados (Racine, 1972).



II



III



IV



V

Figura 4. Imágenes correspondientes a cuatro fases conductuales (II,III,IV,V) del "kindling" eléctrico amigdalino en la rata.

El "kindling" es producido por estimulación eléctrica de estructuras cerebrales específicas, entre las cuales se encuentran algunas áreas del sistema límbico. Estructuras como la amígdala cerebral poseen un tamaño que facilita la colocación estereotáctica de un electrodo de estimulación y de registro. Así mismo, esta estructura requiere de un bajo número de estimulaciones eléctricas para inducir el "kindling" (Fernández-Guardiola, 1986).

La evolución del fenómeno "kindling" se ha asociado a un proceso de LTP (Potenciación a largo plazo) que es un aumento acentuado (horas *in vitro*, días o semanas *in vivo*) de la transmisión sináptica a largo plazo que ocurre en el SNC como consecuencia de una estimulación presináptica corta y de alta frecuencia (100 Hz) (Rang, 2001).

1.6.2. ÁCIDO KAÍNICO

El ácido kaínico (AK) (Fig. 5) fue aislado del alga *Digenea simplex*, la cual se localiza alrededor de las islas subtropicales del sur de Japón. Esta alga se usaba originalmente por los japoneses con fines medicinales para tratamiento contra *Ascaris I.* (Coyle, 1983).

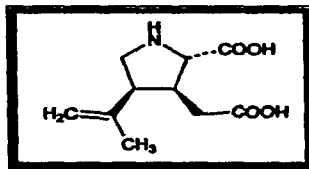


Figura 5. Estructura química del ácido kaínico (Tomado de Delgado et al, 1998)

Sinozaki y Konishi en 1970 dieron la primera evidencia de los potentes efectos neuroexcitatorios del AK (Nadler et al, 1981). Dada la analogía conformacional de esta sustancia con el L-glutamato, Nadler y cols., en 1979, sugirieron que el AK podría actuar directamente como agonista de los receptores a glutamato. Actualmente se sabe que el AK es un agonista de los receptores a glutamato tipo kainato (Delgado et al., 1998).

El receptor tipo kainato se encuentra acoplado a canales catiónicos y se encarga de la transmisión excitatoria rápida provocando una marcada despolarización (Rang,2001). Es por esto, que la interacción del AK con glutamato provoca una potenciación del efecto excitatorio de ambos (Coyle et al, 1983).

La distribución de los receptores a glutamato es principalmente dendrosomal. Se ha postulado que los efectos tóxicos de dosis pequeñas de AK son selectivos de sinápsis glutamatérgicas (Nadler, 1981; Coyle et al, 1983). El AK provoca rearborización de axones, muerte neuronal y gliosis, esta última se refiere a un estado asociado con la proliferación excesiva de células de la neuroglia, como son astrocitos, oligodendrocitos y microglia (Fisher et al, 1989). El AK tiene efectos excitotóxicos regionales específicos, principalmente en poblaciones neuronales pertenecientes al Sistema Límbico (Nadler, 1979;Nadler et al., 1981). Se ha encontrado también que, como en la ELT, la severidad de las crisis después de la administración de AK está correlacionada con una extensa muerte neuronal en la formación hipocampal y en otras áreas límbicas (Nadler et al., 1980, Lothman y Collins, 1981; Cavazos et al., 1994).

La administración sistémica de AK puede inducir diferentes signos conductuales. Cinco minutos después de su aplicación, los animales asumen una posición catatónica y de reposo, conducta que dura aproximadamente 1 hora. Posteriormente, se presentan movimientos de masticación, mioclonias de cara, cabeza y miembros superiores. Después, se observan sacudidas de perro mojado de 7-8 por minuto. Entre 90 a 120 minutos después de la administración de AK, aparecen crisis límbicas severas que involucran a todo el cuerpo con levantamiento y pérdida de la postura. Estas últimas conductas se acompañan de salivación abundante. Finalmente, se establece el *estatus epilepticus*, que consiste en crisis generalizadas consecutivas durante aproximadamente 3 horas o más (Lothman y Collins, 1981).

Posteriormente, las crisis disminuyen y los animales se muestran exhaustos, aunque algunos presentan irritabilidad durante y después de las crisis generalizadas. Varias semanas después se producen crisis límbicas recurrentes y espontáneas (Sperk, 1994). A continuación se indican las principales fases conductuales posteriores a la aplicación i.p.de AK.(Fig. 6):

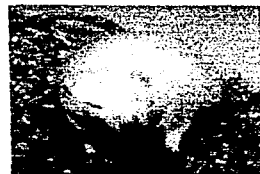
- I- *Catatonía* la rata no responde a nuevos estímulos y permanece inmóvil, presenta respiración prominente y movimientos de acicalamiento.
- II- *Sacudidas de perro mojado* que incrementan en su frecuencia, la rata presenta actividad motora estereotipada, automatismos que incluyen movimientos faciales, de masticación, de husmeo y guiños.
- III- *Crisis límbicas leves* durante las cuales las ratas presentan mioclonias, guiños y movimientos no sincronizados en ambos miembros superiores.
- IV- *Crisis límbicas severas*, caracterizadas por crisis generalizadas, acompañadas por salivación, producción de espuma, clonias bilaterales de extremidades superiores, levantamiento (posición de canguro) y pérdida de la postura corporal.
- V- *Estatus epileptico (EE)*: Es un periodo durante el cual se presentan crisis límbicas de manera repetida y a intervalos cortos de tiempo durante 3 horas o más. Posterior a este estado, la frecuencia de las crisis declina, los animales se presentan hiperecitables



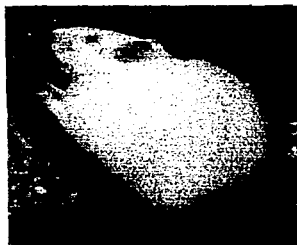
I



II



III



IV



V

Figura 6. Imágenes correspondientes a las cinco fases conductuales (I-V) posteriores a la administración de AK i.p. en rata.

Varias semanas después de haber presentado *estatus epilepticus*, las ratas presentan crisis límbicas espontáneas (Lothman y Collins, 1981; Sperk, 1994).

Existen estudios que apoyan que el AK ejerce excitotoxicidad en neuronas con un bajo umbral a las crisis, provocando descargas epileptiformes y *estatus epilepticus* así como neurodegeneración (Nadler et al, 1980; Ben Ari, 1985). Varias semanas posteriores al *estatus epilepticus*, se produce un daño neuronal mayor asociado a la aparición de crisis límbicas recurrentes y espontáneas (Ben-Ari, 1980; Sperk, 1994). La actividad epileptiforme por la administración i.p. de AK aparece primeramente y es más sostenida en el complejo amigdalino. Algunos de los signos durante las crisis generalizadas y su progresión posterior a la aplicación de AK, son muy similares a los cambios descritos en el "kindling" eléctrico amigdalino (Ben Ari, 1992; Sperk, 1994).

Aproximadamente dos meses posteriores a la aplicación de AK i.p., las ratas presentan muerte neuronal bilateral con gliosis en corteza piriforme, en la neocorteza capas III, V, VI, en tálamo, corteza entorhinal y en las capas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo (Ben-Ari, 1980; Nadler, 1980). Adicionalmente, se ha encontrado que la corteza piriforme es una estructura extremadamente sensible a la acción del AK dado que después de su administración presenta un marcado patrón de necrosis (Nadler, 1980; Ben-Ari, 1980).

1.7. PÉPTIDOS OPIOIDES

La primera referencia indiscutible al jugo de la amapola se encuentra en los escritos de Teofrasto del siglo III A.C. El opio, cuyo término deriva del nombre griego que significa "jugo", se obtiene del jugo de la amapola *Papaver somniferum* (Goodman et al., 1990). El opio contiene más de 20 alcaloides distintos. En 1806, Sertürner informó el aislamiento de una sustancia pura contenida en el opio a la que denominó morfina, en honor a Morfeo, dios griego de los sueños (Pasternak, 1986). Los opiáceos son fármacos derivados del opio, con estructuras no peptídicas como son morfina, codeína y una gran variedad de congéneres semisintéticos derivados de ellas (Goodman et al, 1990; Almeida et al., 1991).

El término opioide es más amplio, pues se aplica a todos los agonistas y antagonistas con actividad del tipo de la morfina, lo mismo que a los péptidos opioides naturales (Rang, 2001).

Una evidencia directa de que los opioides actúan en receptores específicos fue dada por Snyder y sus colegas en 1973. Posteriormente se confirmó la existencia de tres clases de receptores a opioides denominados μ , κ y δ , los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de los mamíferos (Pasternak et al., 1986).

Los péptidos opioides endógenos o agonistas a los receptores antes mencionados se dividen en tres familias principales: las dinorfinas, las β -endorfinas y las encefalinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y presenta una distribución anatómica característica. La pro-opiomelanocortina es el precursor de las endorfinas; la prodinorfina da origen a las dinorfinas; y la proencefalina es el precursor de las encefalinas (Goodman et al, 1990; Almeida et al., 1991) (Tabla 1).

OPIOIDES ENDÓGENOS

PRECURSOR	OPIOIDE ENDÓGENO	RECEPTOR	DISTRIBUCIÓN EN CEREBRO
PRO-OPIOMELANOCORTINA	ENDORFINAS	μ	AMÍGDALA HIPOCAMPO, CORTEZA ESTRIADO, TÁLAMO, SUSTANCIA NEGRA
PRODINORFINA	DINORFINAS	κ	AMÍGDALA HIPOCAMPO HIPOTÁLAMO TÁLAMO, CORTEZA
PROENCEFALINA	ENCEFALINAS	" δ "	AMÍGDALA HIPOCAMPO CORTEZA TEMPORAL CORTEZA DEL CÍNGULO

Tabla 1. Tipos de opioides endógenos, sus precursores, receptores a los que presentan mayor afinidad y su principal distribución en el cerebro humano (Tomado y Modificado de Pasternak et al, 1986; Deigado et al., 1988; Almeida et al., 1991).

La proencefalina se encuentra relativamente limitada en el SNC, presenta concentraciones altas en fascículos de fibras encefalinérgicas largas, pertenecientes a interneuronas que se proyectan con amplitud hacia áreas límbicas (Makram, 1991). Las encefalinas, descubiertas por Hughes y cols. en 1975, se dividen en dos tipos: Leu-encefalina y Met-encefalina las cuales difieren en uno de sus aminoácidos:

Leu-encefalina : Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Met-encefalina : Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Pasternak et al., 1986).

Las encefalinas son los ligandos endógenos por excelencia de los receptores δ y se unen con menor afinidad al receptor μ (Almeida et al., 1991 Rang, 2001).

1.7.1 RECEPTOR L OPIOIDE

Su nombre " δ " (delta), se origina de su efecto inhibitorio en la contracción inducida eléctricamente en el conducto deferente del ratón (Pasternak, 1986). El receptor δ y su RNAm se han encontrado a altas concentraciones en estructuras del sistema límbico. La presencia del receptor δ en dichas estructuras sugiere que está involucrado en la regulación de la actividad epiléptica por activación del sistema de los opioides endógenos (Pasternak et al., 1986; Almeida et al., 1991).

En el cerebro humano se han encontrado niveles de receptores δ en amígdala y en las regiones anterior, antero-medial, medial-posterior y posterior de del lóbulo temporal (Mayberg et al, 1990; Madar et al., 1997), en cortezas frontal, del cíngulo, parietal, occipital y olfatoria, en tálamo, puente, médula oblonga e hipotálamo, entre otras estructuras (Ver Fig. 7) (Almeida et al., 1991).

En cerebro de rata la distribución regional del receptor δ es principalmente en las capas II, III, y V de la corteza cerebral, en la amígdala, el tubérculo olfatorio, el núcleo pontino, el estriado, la sustancia gris periacueductal, las cortezas temporal y del cíngulo, el núcleo accumbens, la sustancia negra pars reticulata y el hipocampo.

La densidad de los receptores δ en áreas límbicas aumenta la posibilidad de una asociación de estos sitios con efectos conductuales y afectivos (Pasternak et al., 1986; Almeida et al, 1991).

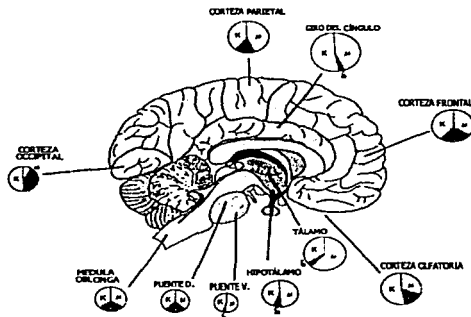


Figura 7. Corte sagital y medial del cerebro humano donde se muestra la distribución de los receptores a opioides y su proporción entre ellos. En azul se indica la proporción del receptor δ (Tomado de Almeida et al., 1991).

Los principales agonistas endógenos para el receptor δ son: Met-enkefalina, Leu-enkefalina y endorfinas; los agonistas sintéticos DADLE (D-Ala²,D-Leu⁵) enkefalina, DSLET(D-Ser²,Leu-⁵) enkefalina-Thr⁶, DAMEA(D-Ala²,Met⁵) enkefalinamida, DAMPGO (D-Ala²,MePhe⁴,Gly-(ol)⁵enkefalina y "DPDPE" (D-Pen²,D-Pen⁵) enkefalina, entre otros. En cuanto a los antagonistas sintéticos más utilizados se encuentran la Naloxona, el IC1154129 y [¹¹C] MeNTI metil naltrindol (Pasternak et al., 1986).

El receptor δ está compuesto de 380 aminoácidos distribuidos en siete dominios transmembranales y es un receptor acoplado a proteínas G (Fig. 8-A) (Nestler et al., 2001). Al activarse el receptor δ se inhibe a la adenilato ciclasa por mecanismos que involucran la hidrólisis de GTP, lo que provoca reducción del AMPc (Fig.8-B). Por otra parte el receptor δ se encuentra asociado a canales de potasio voltaje dependientes, facilitando su apertura y provocando así una marcada hiperpolarización (North et al., 1987).

La proteína cinasa y la proteína cinasa C dependientes de AMPc no están directamente involucradas en el acoplamiento del receptor opioide y el canal de potasio. Aunado a esto la activación del receptor δ inhibe la apertura de canales de calcio bloqueando así la liberación de neurotransmisores (Rang, 2001).

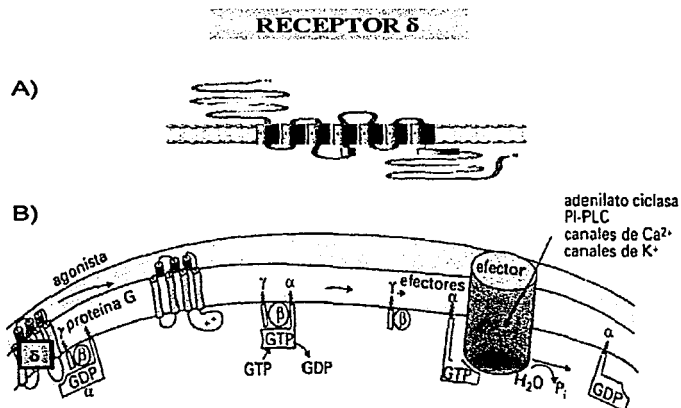


Figura 8. A) Esquema que muestra los siete dominios transmembranales del receptor δ opioide, C y N terminal son los extremos amino y carboxi del receptor. B) El receptor δ está acoplado a proteínas G, donde la unión del agonista induce el cambio conformacional de los dominios citosólicos del receptor. La proteína G se une entonces al receptor intercambiando el GDP por GTP en su subunidad α . Las subunidades β y γ se separan de la subunidad α -GTP y ésta interacciona con las enzimas generadoras de segundos mensajeros, o directamente con los canales iónicos. La acción GTPasa de la propia subunidad α transforma al nucleótido en GDP y las tres subunidades vuelven a asociarse, estando de nuevo en situación de ser reconocidas por un receptor activado. Los anclajes de las subunidades β y γ en la membrana plasmática se efectúan a través de residuos de isopreno (Tomado y Modificado de Delgado et al., 1998; Nestler et al., 2001).

1.8. OPIOIDES Y ELT

Durante las últimas décadas se han realizado un extenso número de estudios usando modelos experimentales de epilepsia para investigar los efectos de sustancias opioides exógenas y endógenas. Existen evidencias del papel del sistema opioide en la supresión de crisis en modelos experimentales en varias especies (Fernández, 1986; Tortella et al., 1988 a). Por otra parte, existen otros

reportes que sugieren que los opioides endógenos tienen efectos proepilépticos (Urca et al., 1977; Frenk et al., 1979).

La naloxona por su parte es un antagonista de los receptores μ y δ que "revierte" los efectos anticonvulsivantes de estos péptidos opioides. Dichos efectos han sido documentados por estudios en ratón, rata, conejo y babuinos, mediante el uso de modelos experimentales eléctricos, químicos, y genéticos de epilepsia humana. (Tortella et al., 1988 a).

1.8.1. OPIOIDES ENDÓGENOS Y EPILEPSIA EN HUMANOS

En pacientes epilépticos se presenta un aumento significativo en los niveles de Leu y Met-enkefalina. Ambos péptidos han sido detectados en el líquido cefalorraquídeo posterior a crisis epilépticas (Cheng et al., 1990). Se sabe también que la naloxona afecta la actividad electroencefalográfica ictal e interictal en pacientes con epilepsia. Por su parte Molaie y Kadzielawa en 1989 estudiaron el efecto de la infusión continua durante la noche de 10 mg de naloxona sobre las descargas epileptiformes focales interictales en pacientes con crisis parciales complejas. Los pacientes mostraron un incremento del 67% en las descargas interictales durante la infusión de naloxona. Estos datos obtenidos en humanos sustentan el bloqueo que la naloxona produce sobre el sistema inhibitorio endógeno de péptidos opioides y la posible existencia de un sistema anticonvulsivante endógeno mediado por receptores μ opioides en la epilepsia humana.

Estudios utilizando la Tomografía de Emisión de Positrones (PET), realizados en pacientes con ELT en los que se administra un antagonista selectivo para el receptor δ Metilnaltrindol [^{11}C] MeNTI, revelaron un incremento focal y extrafocal en los niveles de receptores δ opioide en corteza temporal (Madar et al, 1997). En cuanto a los receptores μ , dichos pacientes muestran un decremento de los niveles en el foco epiléptico y un aumento en la corteza temporal periférica al mismo (Frost et al, 1988).

1.8.2. OPIOIDES ENDÓGENOS Y EPILEPSIA EN RATAS

Experimentos utilizando diferentes modelos animales de epilepsia han mostrado que las crisis inducen un incremento en los niveles de RNAm que codifica al precursor de encefalinas en el hipocampo (Gall, 1988). Este efecto se asocia a un aumento en el índice de biosíntesis de encefalinas (Hong, 1993; Naranjo et al, 1986). En neuronas del locus cerealis y en el plexo submucoso de cobayo la Met-encefalina produce una concentración dependiente de la hiperpolarización de membrana, efecto asociado a la activación del receptor δ y su acoplamiento a un canal de potasio voltaje dependiente, el cual facilita la salida de iones K^+ para contrarrestar una despolarización (North et al., 1987).

1.8.2.1. ENCEFALINAS Y KINDLING

En experimentos usando el modelo "kindling" eléctrico amigdalino, que es un modelo experimental de ELT, se ha encontrado que los niveles de Met-encefalina y Leu-encefalina se elevan hasta un 40% en ambos hemisferios cerebrales de ratas, después de la última crisis tipo Kindled. El aumento en los niveles de Leu-encefalina durante el proceso Kindling comienzan primero en el hemisferio estimulado y después se propaga bilateralmente, mientras que los niveles de Met-encefalina se ven inalterados hasta que los animales experimentan 5 veces fase V (Vindrola et al., 1981). En 1989, Talavera y cols. reportaron los cambios específicos en Leu- y Met-encefalinas a las 24 hrs después de 10 veces crisis fase V. Así también encontraron que en áreas como el hipocampo la Met-encefalina y la Leu-encefalina aumentan un 52% y 93%, respectivamente.

En cuanto a la liberación de encefalinas durante el kindling eléctrico amigdalino, se sabe que en el sitio de estimulación durante las crisis parciales existe un aumento de la liberación de Met-encefalina, mientras que en las crisis generalizadas existe un decremento de los niveles extracelulares de los opioides endógenos (Rocha et al., 1994). Por otra parte, en el hipocampo, el kindling eléctrico amigdalino induce aumento de la liberación de Leu-encefalina, Dinorfina (1-6) y Dinorfina (1-8), tanto en las crisis parciales como en las generalizadas (Rocha y col., 1997).

En cuanto a receptores a opioides, se sabe que a las 24 horas después de la última crisis kindled fase V, aumentó la unión al receptor μ en la corteza frontoparietal (73%) y del cíngulo (165%), en la amígdala anterior (42%), caudado putamen (35%), y núcleo talámico ventromedial (56%). La unión en ratas pretratadas con naloxona es significativamente mayor con respecto al grupo control, dado que la exposición crónica de un antagonista a su receptor induce una "up-regulation" o (sensibilización) (Rocha et al., 1993).

1.8.2.2. ENCEFALINAS Y ÁCIDO KAÍNICO

Existen estudios que indican que el AK induce crisis y activa al sistema de los opioides endógenos (Douglass, et al, 1991) lo cual se asocia a un incremento compensatorio en la biosíntesis de Met-encefalina en hipocampo y corteza entorhinal (Kanamatsu et al., 1986). Se ha observado que los niveles tisulares de Met-encefalina se elevan al doble por lo menos dos semanas después de múltiples crisis producidas por AK i.p. (Hong, 1993). Experimentos de microdiálisis revelaron una liberación significativa de péptidos opioides en el hipocampo 90 a 150 min (100%) y 270 a 300 min (50%) posteriores a la administración de AK y durante el *estatus epilepticus*. Los péptidos liberados fueron identificados como Met-encefalina, Leu-encefalina, Dinorfina A(1-6) y Dinorfina A(1-8). Un nivel reducido en péptidos inmunoreactivos se detectó 28 días después del *estatus epilepticus* (38% comparado con el grupo control) (Rocha y Maidment, 2002).

En ratas, 40 días posteriores al *estatus epilepticus*, se han encontrado incrementos de los receptores μ , en corteza sensoriomotora (45%), en los núcleos amigdalinos anterior (39%), medial (65%), basolateral (202%) y central (32%), en el giro dentado (80%), CA2 (80%), y CA3 (49%) del hipocampo. (Pérez C. C. y Rocha L. 2001).

1.8.2.3. RECEPTOR δ Y EPILEPSIA EN RATAS

Los efectos de los opioides peptídicos y no peptídicos en la epilepsia, son mediados a través de los receptores a opioides μ , κ y δ .

De manera más específica, se ha demostrado que la activación de los receptores δ por agonistas específicos como DADLE (una encefalina sintética) en estructuras como la corteza cerebral, hipocampo y áreas septales de ratones, reduce el número y duración de las crisis epilépticas (Tortella et al., 1984, 1988 b). DPDPE, que es otra encefalina sintética selectiva para el receptor δ , induce efectos anticonvulsivantes que son revertidos por naloxona. Este antagonismo se caracteriza por disminución en el umbral de crisis (Tortella et al., 1983) así como un aumento en la frecuencia, duración y severidad de las convulsiones inducidas en ratas (Tortella et al., 1988 b). Por otra parte la activación del receptor δ no intensifica la neurotoxicidad inducida en hipocampo por AK (Lason et al, 1988).

La encefalina sintética DADLE (D-Ala²-D-Leu⁵ encefalina), otro ligando selectivo para el receptor δ , produce un incremento del 117% en el umbral de crisis inducidas por Fluorothyl. Dicho efecto es atenuado por ICI 154129, que es un antagonista opioide con selectividad tanto *in vivo* como *in vitro* por los receptores δ opioides (Tortella et al., 1983). Análisis neuronal a través de registro intracelular, muestra que los agonistas del receptor δ poseen la capacidad de suprimir la despolarización característica de las descargas eléctricas en las crisis (North et al., 1987; Tortella et al., 1988 a).

1.8.2.4. RECEPTOR δ , KINDLING Y ÁCIDO KAÍNICO

La formación hipocampal muestra decrementos en la unión al receptor δ , 24 hrs después de la última crisis tipo kindled. Dicha disminución se ve acentuada en el estrato molecular del giro dentado, entre 12- 13 %. A los 7 días después de la última crisis kindled, se produce un decremento de entre 11-17 %, mientras que a los 28 días no hay diferencias significativas (Crain et al., 1987).

Cabe resaltar que no hay evidencias respecto a cambios en los niveles de receptor δ por "kindling" en estructuras como las cortezas del cíngulo, piriforme y temporal, así como en el núcleo basolateral de la amígdala y en CA2 del hipocampo ventral.

Por otra parte hasta el momento no existen estudios que analicen los niveles de receptor δ por AK i.p a los 40 días en estructuras como: las cortezas del cíngulo, piriforme y temporal, así como en el núcleo basolateral de la amígdala y en la región CA2 del hipocampo ventral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento no existen evidencias que sustenten que tanto el modelo "kindling" eléctrico amigdalino como el modelo de ácido kaínico, reproduzcan los cambios en receptores δ observados en humanos con Epilepsia de Lóbulo Temporal.

3. HIPÓTESIS

Los modelos ácido kaínico y "kindling" eléctrico amigdalino producen cambios en receptor δ opioide similares a los producidos en la Epilepsia del Lóbulo Temporal en Humano.

4. OBJETIVOS GENERALES

Evaluar los niveles de receptores δ opioide en dos modelos de epilepsia del lóbulo temporal: "kindling" eléctrico amigdalino y ácido kaínico en cerebro de rata.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Cuantificar por la técnica de autorradiografía los niveles de receptores δ opioide en cerebro de rata, sometida a proceso de epileptogénesis por "kindling" eléctrico amigdalino.
- ❖ Analizar por autorradiografía los niveles de receptores δ opioide en el cerebro de rata, sometida a proceso de epileptogénesis por administración de ácido kaínico i.p.

5.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 300-350g, las cuales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua; se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-22°C) en una habitación con aire acondicionado y ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs.

5.2. A) IMPLANTE DE ELECTRODOS

Los animales se anestesiaron con una combinación de ketamina (100mg/kg i.p.) y xilacina (20 mg/kg i.m.). Se utilizó un electrodo bipolar formado por dos hebras torcidas de alambre de acero inoxidable, aislado excepto en la punta, el cual se implantó estereotácticamente en la amígdala derecha. Las coordenadas en milímetros con referencia a bregma fueron las siguientes: AP, -1.5; ML, + 5.0; DV, +8.8 (Paxinos y Watson; 1986). Tornillos de acero inoxidable se fijaron en el cráneo sobre la corteza y cerebelo, los cuales sirvieron para registro de electrocorticograma y como electrodos de referencia. Los electrodos se acoplaron a un conector tipo amfenol y se fijaron al cráneo con acrílico dental.

Posteriormente las ratas se dejaron recuperar de la cirugía por un periodo de siete días durante los cuales los animales se habituaron a la manipulación. Al terminar este periodo se inició la estimulación eléctrica tipo kindling.

5.3. B) LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA TIPO KINDLING

Se aplicaron diariamente, durante un segundo, un tren de pulsos cuadrados de 1 ms de duración a 60 Hz., con una intensidad de 200 μ A. Dicha estimulación se generó por un estimulador modelo Grass S-48 que se hizo pasar por una unidad de aislamiento de corriente constante tipo Grass. La estimulación eléctrica se aplicó diariamente para inducir un avance gradual de las fases I a la V del Kindling eléctrico amigdalino (aproximadamente por 21 días), hasta alcanzar el estado kindled esto es, 5 crisis fase V de manera consecutiva. Estos cambios conductuales se evaluaron de acuerdo a la escala descrita por (Racine, 1972) (Ver Pag. 15).

5.4. ÁCIDO KAÍNICO

Inicialmente se llevó a cabo la habituación de las ratas a la manipulación, la que consistió en la aplicación diaria de una inyección de solución salina (1 ml/kg i.p.) durante siete días. Posteriormente, se aplicó AK (Sigma, St. Louis, MO.) disuelto en solución salina a una dosis de (10 mg/kg, i.p.) en un volumen total de (1 ml/kg).

Los cambios conductuales producidos por la administración de AK fueron evaluados con relación a las fases descritas por (Lothman y Collins, 1981) las cuales ya han sido mencionadas con anterioridad (Pag. 18). Se ha descrito que aproximadamente treinta minutos posteriores a la inyección de AK las ratas presentan *estatus epilepticus* que dura aproximadamente tres horas y es seguido de la aparición de crisis límbicas recurrentes que prevalecen los días siguientes (Sperk 1994).

5.5. GRUPOS EXPERIMENTALES

- **KINDLING**: (n=5) En estas ratas se realizó implante de electrodos, así como habituación y aplicación diaria de estimulación eléctrica. Una vez establecido el estado kindled, se dejaron pasar 24 horas para llevar a cabo el sacrificio de los animales por decapitación. Los cerebros se procesaron para autorradiografía.
- **CTRKIND**: (n=5) Los animales se manipularon de acuerdo a lo antes descrito, excepto que no recibieron estimulación eléctrica. Los animales de los grupos KINDLING y CTRKIND se sacrificaron simultáneamente.
- ◆ **KAINICO**: (n=7) Este grupo lo conformaron ratas que fueron habituadas durante siete días con solución salina i.p. y al octavo día recibieron una inyección única de AK i.p. Cuarenta días posteriores a la inyección de AK, los animales se sacrificaron por decapitación.
- ◆ **CTRAK**: (n=6) Los animales fueron manipulados de igual manera que el grupo anterior pero en lugar de AK se les inyectó solución salina.

5.6. AUTORADIOGRAFÍA

Los animales se sacrificaron por decapitación y los cerebros se extrajeron inmediatamente para ser almacenados a (-70°C) en hielo seco. Se obtuvieron secciones coronales de 20 µm de grosor utilizando un crióstato (Leica modelo 1510-3). Los cortes obtenidos se colocaron en portaobjetos gelatinizados y posteriormente se mantuvieron a -70 °C.

Las rebanadas se lavaron con amortiguador de Tris-HCL a una concentración de 50 mM, ajustado a un pH de 7.4, durante 30 min a temperatura ambiente (22°C) con el fin de remover los ligandos endógenos de los receptores. Posteriormente las rebanadas se incubaron 60 min a temperatura de (22°C) en una solución 10nM de 3H-DPDPE (D-Pen2-D-Pen5-encefalina)(40.7Cimmol; Amersham), que es una agonista para δ, disuelto en amortiguador de Tris-HCl.

Al terminar la incubación con ligando marcado, las rebanadas se pasaron a un baño de solución amortiguador Tris-HCl durante 3 minutos 2 veces a 4°C y por último se enjuagaron en agua destilada por 2 segundos, inmediatamente después se secaron con aire frío.

Las rebanadas y los estándares de radioactividad fueron expuestos a películas sensibles a tritio (3H-Hiperfilm) en magazines de rayos X, durante 16 semanas en oscuridad y a temperatura ambiente. Se procesaron con revelador Kodak D11 y fijador rápido.

Las distintas regiones anatómicas del cerebro se identificaron con referencia al atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1986) y los autorradiogramas se evaluaron con un sistema de análisis de imágenes (Java Jandel Software de análisis de Video) para determinar la densidad óptica (DO) de las estructuras analizadas que comprendén (Fig. 9):

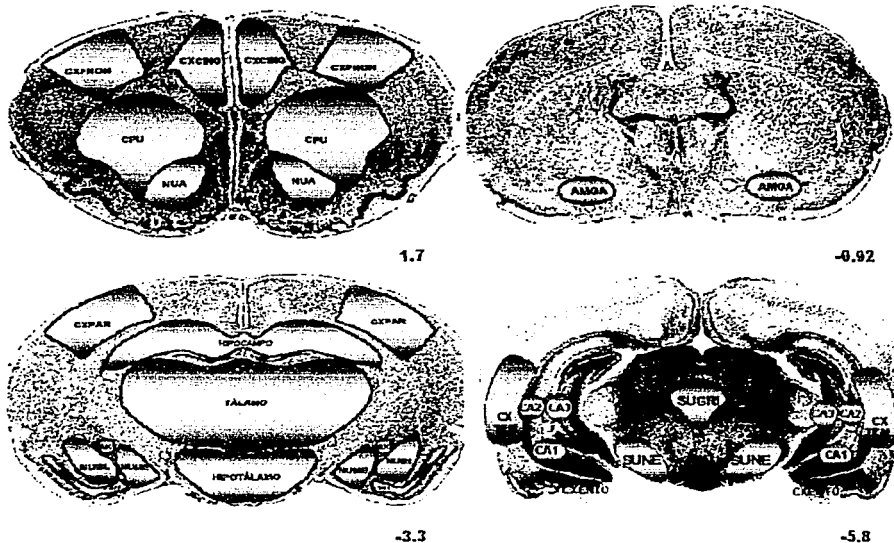


Figura 9. Diagramas que representan cortes coronales de cerebro de rata tomados del Atlas de Paxinos y Watson (1986), en las que se identifican en morado las estructuras cerebrales analizadas por autorradiografía. En la parte inferior de los cortes se indican los mm. de localización con respecto al Bregma.

AMÍGDALA

Amígdala anterior (AMGA)
 Núcleo central amigdalino (NUCE)
 Núcleo medial amigdalino (NUME)
 Núcleo basolateral amigdalino (NUBL)

CORTEZAS

Corteza Temporal (CXTEM)
 Corteza Frontal (CXFRO)
 Corteza del Cíngulo (CXCING)
 Corteza Parietal (CXP)
 Corteza Piriforme (CXPI)
 Corteza Entorhinal (CXENTO)

HIPOCAMPO

Hipocampo dorsal (HPO)
 Hipocampo ventral (CA1)
 Hipocampo ventral (CA2)
 Hipocampo ventral (CA3)

ESTRUCTURAS ASOCIADAS

Caudado Putamen (CPU)
 Núcleo Accumbens (NUA)
 Tálamo (TAL)
 Hipotálamo (HPT)
 Sustancia Gris (SGRI)
 Sustancia Negra (SUNE)

Las 20 estructuras antes mencionadas se analizaron tanto para el tratamiento de AK como para el kindling eléctrico amigdalino. A cada estructura se le realizaron 10 lecturas pareadas, es decir 10 lecturas para cada hemisferio cerebral. Posteriormente y con base en los estándares, los datos se procesaron para la obtención de fmol/mg de proteína.

5.7. ESTADÍSTICA

- ◆ Los valores obtenidos se analizaron mediante una prueba T-student de una vía. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. KINDLING ELÉCTRICO AMIGDALINO

6.1.1 DESARROLLO DEL "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO

El kindling eléctrico amigdalino indujo cambios conductuales progresivos que culminaron con crisis generalizadas. A continuación se indica el número de estimulaciones (promedio y error estándar) que se aplicaron para alcanzar las diferentes fases (Fig. 10):

Fase I: 3.6 ± 0.40

Fase II: 4.8 ± 0.48

Fase III: 9 ± 0.44

Fase IV: 11 ± 0.31

Fase V: 15.8 ± 0.37

Edo. "Kindled": 19.8 ± 0.37

El grupo control no mostró cambios conductuales aparentes.

Cabe mencionar que el sitio de implante de los electrodos se localizó en el núcleo central amigdalino (NUCE), en todos los animales.

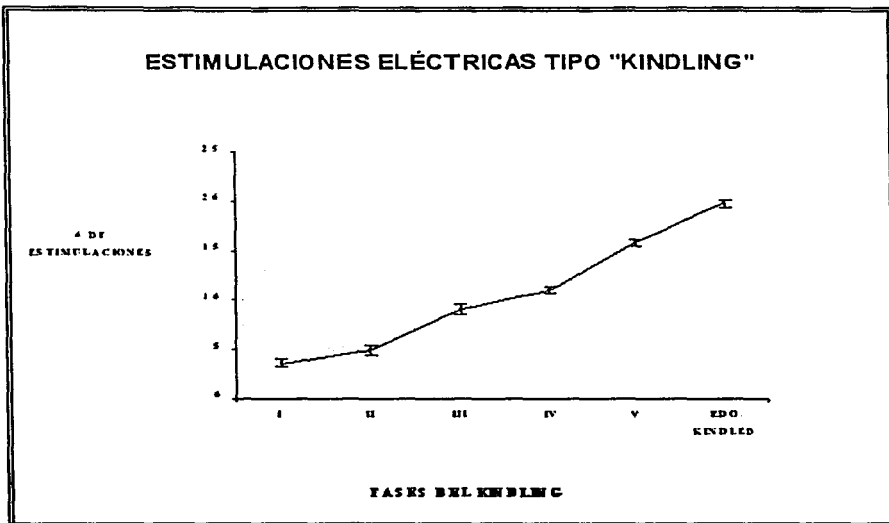
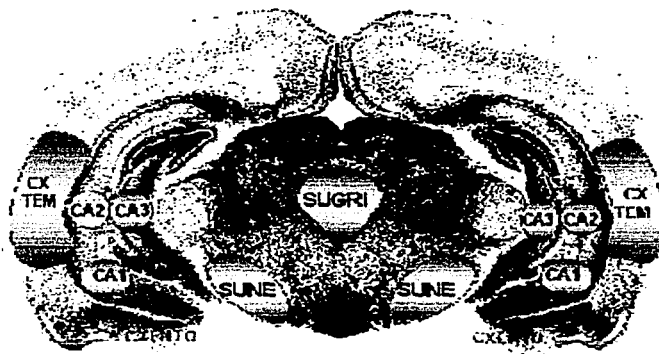


Figura 10. Fases conductuales del "kindling" y estimulaciones eléctricas (promedio \pm error estándar) necesarias para alcanzar cada una de las fases y el establecimiento del estado "kindled".

6.1.2. "KINDLING" ELÉCTRICO AMIGDALINO Y RECEPTORES δ

El análisis autorradiográfico de las estructuras cerebrales evaluadas mostró que los niveles del receptor δ en ratas con "kindling" eléctrico amigdalino disminuyeron (37%) en la región CA2 derecha del hipocampo ventral es decir la región ipsilateral al sitio de estimulación (Fig. 11 y 12).

En las estructuras restantes se encontraron decrementos en los niveles de los receptores δ . Sin embargo los valores no fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control (Tabla 2).



-5.8

Figura 11. Corte coronal del cerebro de rata donde se muestra en color verde la localización de la región CA2 derecha (ipsilateral al sitio de estimulación), estructura que mostró en el grupo "kindling" un decremento significativo en el número de receptores δ .

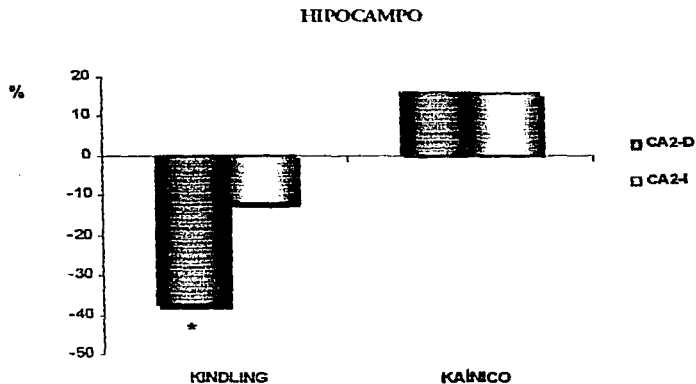


Figura 12. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ opioide en el área CA2 del hipocampo ventral. En el eje de las abscisas se muestran los tratamientos aplicados, i.e., "kindling" y AK; en el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de cambio con respecto al grupo control. * $p < 0.05$ con respecto a su grupo control.

6.2. ÁCIDO KAÍNICO

6.2.1. DESARROLLO DE EPILEPSIA POR ÁCIDO KAÍNICO

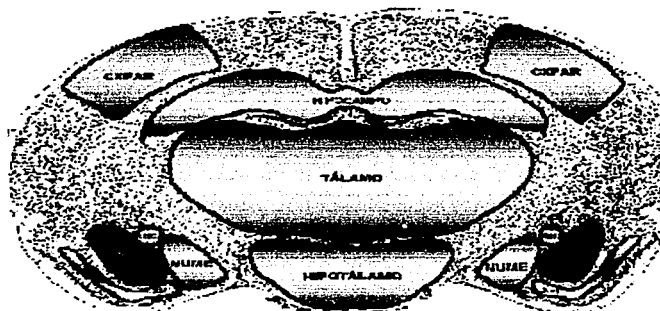
En seis de las siete ratas, el AK indujo sacudidas de perro mojado y crisis generalizadas desde los 90 a los 150 min después de su administración. A los 180 min se inició el *estatus epilepticus*, con una duración de 147 ± 13.7 minutos. Una de las ratas se omitió del estudio por que no presentó *estatus*, aunque presentó una crisis corta (30 seg) a los 90 minutos después de la inyección de AK.

A las 24 hrs después del *estatus epilepticus*, los animales no presentaron crisis. Sin embargo, las ratas mostraron conductas motoras explosivas y saltos inducidos por el manejo de los mismos, una respuesta considerada como conducta excitatoria durante el periodo postictal. A lo largo del tiempo después del *estatus epilepticus*, los animales se mostraron hiperexcitables, aunque no presentaron crisis epilépticas espontáneas.

6.2.2. ÁCIDO KAÍNICO Y RECEPTORES δ

El tratamiento con AK en general, elevó los niveles de receptor δ en áreas cerebrales específicas con respecto a su grupo control (Ver Tabla 1).

Las estructuras que presentaron cambios fueron las siguientes: núcleo basolateral amigdalino derecho (NUBL-D) (35%); núcleo basolateral amigdalino izquierdo (NUBL-I) (26%) (Fig. 13 y 14); las cortezas del cíngulo derecha (CXCING-D) (59%) e izquierda CXCING-I (43%)(Fig. 15 y 16); las cortezas temporales derecha (CXTEM-D) (57%) e izquierda (CXTEM-I) (57%)(Fig. 17 y 18). Cabe mencionar que tres ratas (50%) mostraron un decremento significativo en la unión al receptor δ en las cortezas piriforme derecha (CXPI-D) (60%) e izquierda (CXPI-I) (69%) (Fig. 19 y 20). El resto de los animales no mostraron cambios significativos en esas áreas.



-3.3

Figura 13. Diagrama de un corte coronal de cerebro de rata donde se indica en color rojo la localización del Núcleo Basolateral Amigdalino NUBL, estructura que presentó en el grupo de AK un incremento en el nivel de receptores δ con respecto a su grupo control.

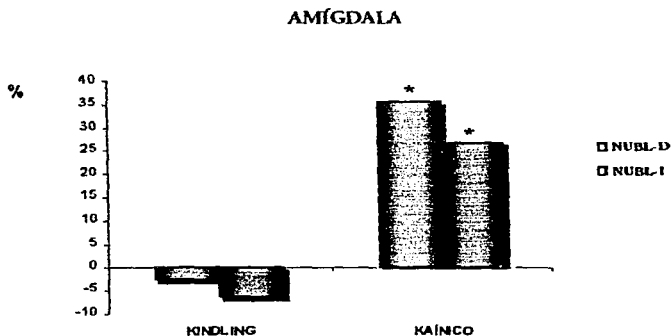
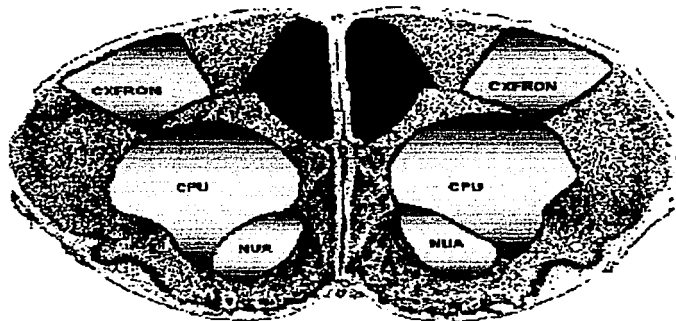


Figura 14. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ opioide en el Núcleo Basolateral Amigdalino, en el eje de las abscisas se muestran los tratamientos aplicados "kindling" y AK, en el eje de las ordenadas se indica el porcentaje de cambio en los receptores con respecto al grupo control. * $p < 0.05$ con respecto a su grupo control.



1.7

Figura 15. Diagrama de un corte coronal de cerebro de rata donde se indica en color rojo la localización de la Corteza del Cíngulo CXCING, estructura que mostró un incremento significativo en los niveles de receptores δ con el tratamiento de AK.

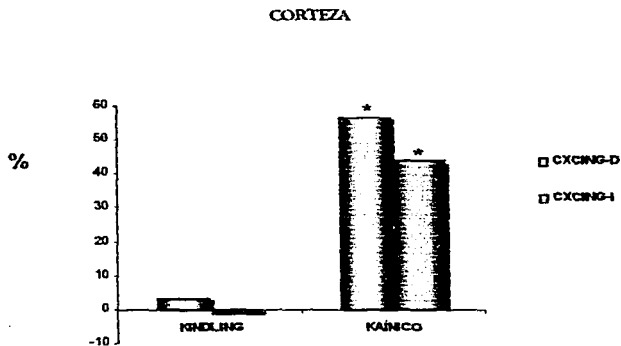


Figura 16. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ opioide en Corteza del Cíngulo; en el eje de las abscisas se muestran los dos tratamientos aplicados, i.e., "kindling" y AK. * $p < 0.05$ con respecto a su grupo control.

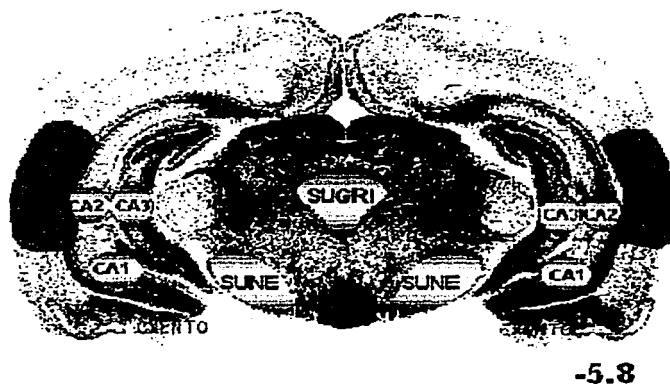


Figura 17. Diagrama de un corte coronal de cerebro de rata, que muestra la localización de la corteza temporal CXTEM, estructura cerebral en la que se encontró un aumento significativo en los niveles de receptores δ con el tratamiento de AK.

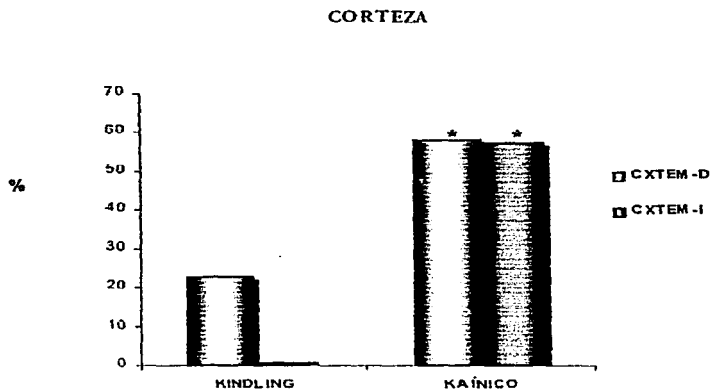
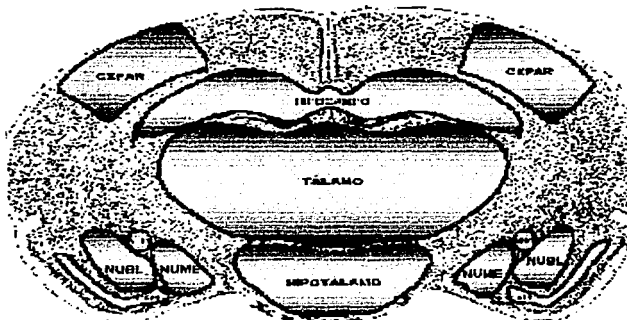


Figura 18. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ , en la corteza temporal. En el eje de las abscisas se indican los dos tratamientos aplicados i.e., "kindling" y AK. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.



-3.3

Figura 19. Diagrama de un corte coronal de cerebro de rata, en color verde se indica la localización de la corteza piriforme CXPI estructura cerebral en donde se mostró un decremento en el número de receptores δ con el tratamiento de AK.

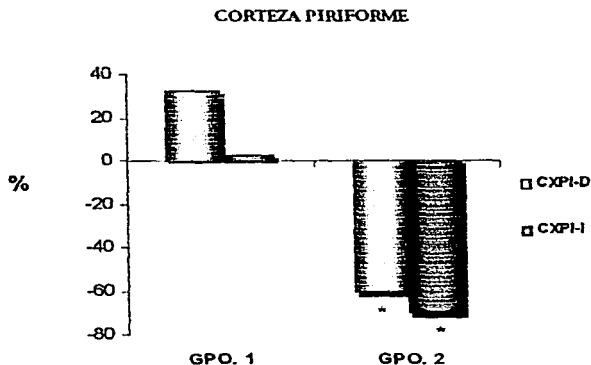


Figura 20. Porcentaje de cambio en los niveles de receptor δ opioide en corteza piriforme; en el eje de las abscisas se indican los dos grupos formados con el total de sujetos experimentales, para el tratamiento de AK. * $p < 0.05$ con respecto a su grupo control.

Tabla 2. Niveles de unión al receptor delta opioide en amígdala, hipocampo, cortezas y estructuras asociadas, los valores se representan en fmol/mg de proteína; en animales con "kindling" (Izquierda) y con AK (Derecha), los cambios en porcentaje se indican en las columnas de la derecha de cada tratamiento

ESTRUCTURAS	CONTROL	KINDLING	% CAMBIO
-------------	---------	----------	----------

AMÍGDALA			
ESTRUCTURAS	CONTROL	KINDLING	% CAMBIO
AMGA-D	75±11	83±6	10.66
AMGA-I	83±6	82±8	-1.2
NUCE-D	76±8	69±9	-9.21
NUCE-I	65±9	50±20	-23.07
NUME-D	173±26	148±19	-14.45
NUME-I	168±19	130±26	-22.61
NUBL-D	198±28	130±27	-2.52
NUBL-I	190±21	130±28	-6.31

ESTRUCTURAS	CONTROL	KÁINICO	% CAMBIO
-------------	---------	---------	----------

AMÍGDALA			
ESTRUCTURAS	CONTROL	KÁINICO	% CAMBIO
AMGA-D	150±31	101±33	-32.66
AMGA-I	155±30	107±32	-30.96
NUCE-D	167±35	134±14	-19.76
NUCE-I	156±35	112±17	-28.2
NUME-D	198±27	220±27	11.11
NUME-I	193±26	203±29	5.18
NUBL-D	212±24	287±29 *	35.37
NUBL-I	213±24	270±26 *	26.76

HIPOCAMPO

ESTRUCTURAS	CONTROL	KINDLING	% CAMBIO
HPO-D	66±11	89±25	34.84
HPO-I	72±14	92±11	27.77
CA1-D	117±11	89±16	-23.93
CA1-I	106±11	96±26	-9.43
CA2-D	120±16	75±18 *	-37.5
CA2-I	92±10	81±18	-11.95
CA3-D	95±19	57±21	-40
CA3-I	67±17	60±23	-10.44

ESTRUCTURAS	CONTROL	KÁINICO	% CAMBIO
HPO-D	169±27	180±26	6.5
HPO-I	168±26	179±29	6.54
CA1-D	179±28	215±34	20.11
CA1-I	179±27	212±23	18.43
CA2-D	165±30	191±36	15.75
CA2-I	167±24	193±33	15.56
CA3-D	171±28	202±35	18.12
CA3-I	172±27	194±27	12.7

CORTEZAS

ESTRUCTURAS	CONTROL	KINDLING	% CAMBIO
CXCING-D	168±17	173±17	2.97
CXCING-I	172±12	171±18	-0.58
CXTEM-D	127±16	156±26	22.83
CXTEM-I	149±12	150±25	0.67
CXFRON-D	167±12	170±17	1.79
CXFRON-I	180±14	149±15	-17.22
CXP-D	158±21	185±37	17.08
CXP-I	143±27	181±37	26.57
CXPI-D	65±12	81±8	24.61
CXPI-I	64±13	65±8	1.56
CXENTO-D	96±11	98±12	2.08
CXENTO-I	68±14	84±19	23.52

ESTRUCTURAS	CONTROL	KÁINICO	% CAMBIO
CXCING-D	182±6	285±25 *	56.59
CXCING-I	201±15	289±26 *	43.78
CXTEM-D	185±33	292±41 *	57.83
CXTEM-I	194±31	305±52 *	57.21
CXFRON-D	211±28	291±46	37.91
CXFRON-I	218±27	262±42	20.18
CXP-D	236±26	273±29	15.67
CXP-I	228±19	260±18	14.03
CXPI-D	153±36	132±29	-13.72
CXPI-I	158±36	126±20	-20.25
CXENTO-D	153±31	128±13	-16.33
CXENTO-I	157±22	149±32	-5.09

ESTRUCTURAS ASOCIADAS

ESTRUCTURAS	CONTROL	KINDLING	% CAMBIO
CPU-D	249±18	206±22	-17.26
CPU-I	237±12	209±22	-11.81
NUA-D	139±14	113±10	-18.7
NUA-I	134±14	106±12	-20.89
TAL-D	80±30	52±6	-35
TAL-I	77±19	46±6	-40.25
HPT-D	64±12	50±7	-21.87
HPT-I	64±14	53±11	-17.18
SGRI-D	106±7	98±7	-7.54
SGRI-I	96±9	95±9	-1.04
SUNE-D	45±15	33±14	-26.66
SUNE-I	62±11	40±14	-35.48

ESTRUCTURAS	CONTROL	KÁINICO	% CAMBIO
CPU-D	252±30	325±49	28.96
CPU-I	274±38	299±38	9.12
NUA-D	210±30	248±28	18.09
NUA-I	211±40	224±36	6.16
TAL-D	173±31	193±41	11.56
TAL-I	171±30	198±37	15.78
HPT-D	159±33	133±11	-16.35
HPT-I	161±31	147±21	-8.69
SGRI-D	172±28	195±33	13.37
SGRI-I	164±28	176±26	7.31
SUNE-D	156±24	130±26	-16.66
SUNE-I	157±21	131±29	-16.56

(*) (*) p<0.05 Con respecto al grupo control correspondiente. Ver abreviaturas en la pag. 33
La -D; Derecha. -I; Izquierda

En nuestro estudio encontramos que tanto el "kindling" eléctrico amigdalino como el AK modifican los niveles del receptor δ en el cerebro de rata. Sin embargo, ambos modelos producen cambios diferentes.

El "kindling" eléctrico amigdalino produjo una disminución de los niveles de los receptores δ en la región CA2 derecha de la región del hipocampo ventral, ipsilateral al sitio de estimulación. Dado que la exposición prolongada de un agonista con su receptor induce una disminución en el número de receptores existentes para dicho agonista (Tao P.-L. et al., 1991), proponemos que la exposición prolongada y repetida del receptor δ con su agonista endógeno, las encefalinas, induce un decremento en el número de estos receptores en la región CA2 del hipocampo a las 24 hrs después del estado "kindled". El decremento de receptores δ puede deberse a un exceso en la liberación de encefalinas en el hipocampo durante las crisis epilépticas generalizadas, es decir cuando el estado "kindled" está completamente establecido (Naranjo et al., 1986). Por otra parte se ha demostrado en animales en libre movimiento utilizando la técnica de microdiálisis, que existe una liberación importante de Leu-encefalina y Dinorfinas en el hipocampo de ratas con "kindling" eléctrico amigdalino durante las crisis parciales y generalizadas (Rocha y col., 1997). También se describe que el contenido de encefalinas en dicha estructura se incrementa al doble en ratas 24 hrs después de la última crisis tipo "kindled" (Iadarola, 1986).

Llama la atención que los cambios se detectan específicamente en CA2, en comparación con CA3 y CA1. Es posible que el decremento en receptores δ que observamos en CA2 se asocie a la baja vulnerabilidad de esta estructura al daño neuronal causado por las crisis epilépticas. Cavazos y cols. en 1994, describieron que la estimulación eléctrica repetida que induce crisis tipo "kindled" produce muerte neuronal progresiva en hipocampo principalmente en áreas susceptibles como CA3 y CA1 y eventualmente en poblaciones neuronales "resistentes" como son las células granulares de giro dentado y la región CA2 del hipocampo.

Por lo tanto, la disminución en los niveles de receptor δ en CA2 no puede ser atribuida a procesos de muerte neuronal, por que a las 24 hrs posteriores al estado "kindled" esta región no presenta daño (Cavazos et al., 1994).

Es interesante el hecho de que aún cuando existe aumento del contenido tisular de opioides en ambos hipocampos (ipsi- y contralateral al sitio de estimulación) a las 24 hrs después de la última crisis fase V (Talavera et al., 1989), los cambios en los receptores sean de mayor significancia en el hipocampo ipsilateral. Lo anterior indica que la síntesis de opioides no se correlacionan con las alteraciones de los niveles de sus receptores. Estos resultados pueden estar relacionados con la existencia de asimetría cerebral, como se ha indicado para otros procesos neuronales (Nance et al., 1982; Nance et al., 1983) De igual forma, los cambios en los receptores δ difieren de los producidos en los receptores μ durante el "kindling". Rocha y cols. en 1993 reportaron un aumento de receptores μ en las cortezas del cíngulo y frontal, caudado putamen, amígdala anterior y núcleo talámico medial a las 24 hrs después de la última crisis fase V. Las evidencias antes presentadas indican, que si bien, el "kindling" eléctrico amigdalino altera al sistema de opioides endógenos en su síntesis, liberación y receptores, cada uno de estos procesos se modifica de manera diferente. Lo anterior sugiere que los opioides endógenos pueden estar mediando diferentes efectos en cada región cerebral dependiendo del estado de epileptogénesis, de la estructura evaluada, así como del receptor analizado.

Puesto que las encefalinas producen efectos excitatorios en el hipocampo por una inhibición de interneuronas inhibitorias (Zieglgänsberger et al., 1979; Nicoll et al., 1980), la baja en el número de receptores δ podría indicar la acción de un mecanismo homeostático que disminuye el efecto proconvulsivante que inducen las encefalinas en el hipocampo (Frenk et al., 1979; Böhme et al., 1987). Es probable que de esta forma, las regiones neuronales menos afectadas durante las crisis inducidas por el "kindling" jueguen un papel protector ante la sobreexcitación existente con el propósito de restablecer la actividad normal del cerebro.

Es necesario en el futuro implementar nuevas técnicas para detectar los mecanismos por los que existe un decremento de receptores δ , como son técnicas de medición de "binding" en membranas o procesos de internalización por microscopía confocal entre otros.

Es importante mencionar que los estudios existentes de receptores δ opioide en humanos con ELT no demuestran cambios significativos en la región CA2 del hipocampo (Madar et al., 1997). Por lo anterior, sugerimos que el modelo "kindling" eléctrico amigdalino no es el más apropiado para reproducir los cambios en los niveles de receptor δ que se dan en humanos con ELT.

En lo que se refiere a los cambios en los niveles de receptor δ con el tratamiento de AK, encontramos que estructuras cerebrales como el núcleo basolateral amigdalino y las cortezas temporal y del cíngulo, tanto derechas como izquierdas, mostraron incrementos significativos que se pueden atribuir a diferentes factores. Rocha y Maidment (2002) encontraron que a los 28 días después del *estatus epilepticus* inducido por AK existe una disminución de la liberación de encefalinas y dinorfinas en hipocampo, efecto que puede estar mediando el incremento de receptores δ varios días después del evento ictal. Otra posible causa de dichos cambios puede ser una prolongada exposición a antagonistas endógenos a opioides (Neisewander et al, 1989) como son MIF-1, Tyr-MIF-1 (Galina et al., 1986), la nociceptina, la colecistocinina (Faris et al., 1982) y la hormona estimulante de la tiroides TRH, estos péptidos actúan de manera similar que la naloxona produciendo una hipersensibilidad o aumento de receptores a opioides.

Es importante mencionar que en hipocampo, la estructura en donde el AK actúa principalmente para inducir *estatus epilepticus*, no se observaron cambios significativos en los niveles del receptor δ a los 40 días después del tratamiento, mientras que, áreas periféricas al hipocampo como son: núcleo basolateral amigdalino, cortezas temporal y del cíngulo presentaron un incremento significativo. A este tiempo, los animales se encuentran en un periodo de silencio durante el cual no presentan crisis espontáneas (Sperk, 1994).

Es posible que el incremento de receptores δ en áreas periféricas al foco epiléptico juegue un papel protector evitando la propagación de la actividad epiléptica durante ese periodo de silencio.

Es probable que la disminución de los receptores δ en la corteza piriforme posterior al tratamiento con AK, se deba a la presencia de necrosis en esta región cerebral (Ben-Ari, 1980). Sin embargo, no se debe descartar que este decremento posiblemente sea consecuencia de mecanismos de muerte neuronal, internalización y/o disminución de afinidad, entre otros.

Con respecto a los receptores μ , se sabe que 40 días posteriores al tratamiento con AK aumentan sus niveles en los núcleos amigdalinos anterior, medial, basolateral y central, corteza sensoriomotora, giro dentado y áreas CA2 y CA3 de hipocampo (Pérez C. et al., 2001). Lo anterior indica que los cambios en los receptores δ y μ inducidos por AK son diferentes, excepto en el núcleo basolateral amigdalino en donde ambos receptores presentan un incremento significativo.

Es posible que el aumento de los receptores δ y μ en el núcleo basolateral amigdalino esté asociado a un decremento en la liberación de encefalinas semejante al que se da en hipocampo de ratas 40 días posterior a la aplicación de AK i.p. (Rocha y Maidment., 2002)

También se sugiere que el aumento de los receptores δ en el modelo de AK se asocie a un efecto antiepiléptico. Lo anterior se fundamenta en que las encefalinas administradas vía sistémica inducen un efecto anticonvulsivante en ratas (Tortella et al., 1983; Tortella et al., 1988 b), lo cual indica que estos péptidos puedan estar mediando una inhibición en estructuras extrahipocampales.

A diferencia del "kindling" eléctrico amigdalino, en donde el foco epiléptico se localizó en la amígdala cerebral y los cambios en el receptor δ se identificaron en hipocampo; en el modelo de AK se detectaron cambios en áreas periféricas al foco, que se localiza inicialmente en el hipocampo, además es importante resaltar que los aumentos encontrados en áreas corticales posiblemente nos indican la acción de un mecanismo que impide la propagación de la actividad epiléptica a otras estructuras cerebrales.

Lo anterior sugiere que las alteraciones en el receptor δ dependen del tipo de modelo experimental de epilepsia y se asocian principalmente a áreas fuera del foco epiléptico.

En humano el incremento en los niveles de receptores δ se presenta en áreas cerebrales hipometabólicas paralelas a las observadas con AK (Madar et al., 1997). Por todo esto y por los resultados encontrados con este tratamiento podemos sugerir que el modelo de epilepsia por AK, a diferencia del "kindling" eléctrico amigdalino es óptimo para reproducir los cambios en los niveles de receptores δ opioides que se dan en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.

Se considera conveniente realizar futuros experimentos utilizando el "kindling" y el AK, para obtener un índice de muerte neuronal, internalización de receptores, o para saber el grado de función de los receptores existentes así como su afinidad. También será interesante evaluar cambios temporales en segundos mensajeros que estén acoplados a los receptores a opioides así como la expresión de genes encargados de la síntesis de los receptores y analizar los niveles de antagonistas endógenos liberados a diferentes tiempos con ambos tratamientos.

Llama la atención que en el grado de epileptogénesis por "kindling" evaluado en el presente estudio, los cambios se restringieron a CA2. Sería conveniente en un futuro evaluar a los receptores delta en diferentes etapas del "kindling". Es posible que el patrón de cambio de receptores en el "kindling" con inducción de crisis espontáneas sea similar al producido por AK varios meses después cuando se producen también crisis espontáneas.

8.

CONCLUSIONES

El modelo de "kindling" eléctrico amigdalino en rata no reproduce los cambios encontrados en receptores δ en humano, ya que solamente indujo un decremento significativo en los niveles de receptor δ en la región CA2 del hipocampo ventral, ipsilateral al sitio de estimulación.

En lo que respecta al AK i.p. en ratas, este tratamiento incrementó significativamente los niveles de receptor δ en el núcleo basolateral amigdalino, cortezas del cíngulo y temporal, tanto en estructuras derechas como izquierdas. Sin embargo, para el caso de la corteza piriforme derecha e izquierda, se detectó un decremento significativo en el 50% de los animales, que posiblemente puede ser atribuido a un proceso de necrosis en esta región.

Con todo esto se concluye que, a diferencia del "kindling" eléctrico amigdalino, el modelo de AK i.p. en rata reproduce con mayor eficiencia los cambios en los niveles de receptor δ opioide observados en humanos con ELT. Este punto es de suma importancia por que el esclarecer los mecanismos de acción del receptor δ , es de utilidad para diseñar tratamientos alternativos para contrarrestar la ELT a través del sistema de los opioides endógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida O.F.X. and T.S. Shippenberg. (1991). "Neurobiology of Opioids". Ed. Springer Verlag. Alemania. p.p.:254-332.
- Ben-Ari Y., E. Tremblay, O.P. Ottersen and B.S. Meldrum. (1980). "The role of Epileptic activity in hippocampal and 'Remote' cerebral lesions induced by Kainic Acid" Brain Research. 191:79-97.
- Ben-Ari Y. (1985). "Limbic Seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human Temporal Lobe Epilepsy. Neuroscience. Vol. 14:375-403.
- Ben-Ari Y., A. Represa, E. Tremblay, O. Robain, G. Legal Lasalle, C. Rovira, M. Gho and E. Cherubini. (1992). "Epileptogenesis and neuronal plasticity: studies on kainate receptor in the human and rat hippocampus". Elsevier Science. Vol. 8:369-373.
- Böhme G., J.M. Stutzmann, B.P. Roques and J.Ch. Blanchard. (1987). "Effects of selective μ - and δ -opioid peptides on Kindled amygdaloid seizures in rats". Neuroscience Letters. 74:227-231.
- Caldecott Hazard, R.F. Ackermann, and J. Engel Jr. (1984). "Opioid Involvement in Postictal and Interictal Changes in Behavior". Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy II. 10:305-314.
- Cavazos J.E., Indrinil Das, and Thomas P. Sutula. (1994). "Neuronal Loss Induced in Limbic Pathways by Kindling: Evidence for Induction of Hippocampal Sclerosis by Repeated Brief Seizures". The Journal of Neuroscience. 14(5):3106-3121.
- Cheng Jianguo and Xie Xuekong. (1990). "A Study on opioid peptides in CFS of patients with epilepsy". Epilepsy Research. 6:141-145.
- Cole A.J., (2000). "Is Epilepsy a Progressive Disease? The Neurobiological Consequences of Epilepsy". Epilepsia 41(Suppl 2.):S13-S22.
- Coyle J. (1983) "Neurotoxic Action of Kainic Acid". Journal of Neurochemistry. 41(1): 1-11.
- Crain B.J., K.J. Chang and J. O. McNamara. (1987). "An in vitro autoradiographic analysis of mu and delta opioid binding in the hippocampal formation of kindled rats". Brain Research. 412: 343-351.

- Delgado J.M., A. Ferrús, F. Mora, F.J. Rubia.(1998)."Manual de Neurociencia".Ed. Síntesis S.A. España.p.p.:235-245.
- Douglass J., L.Grimes, J. Shook, P.H. Lee and J.S. Hong.(1991)."Systemic administration of kainic acid differentially regulates the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNA and peptides in the rat hippocampus". Molecular Brain Research. Vol 9: 79-86.
- Engel J. Jr., Sally Caldecott-Hazard, Harry T. Chugani, and R.F. Ackermann.(1984)."Neuropeptides, Seizures, and Epilepsy".Advances in Epileptology: XVth Epilepsy.25-30.
- Engel J., Jr., and Timothy A. Pedley, M.D.(1996) "Introduction to temporal lobe epilepsy".Epilepsy Research.26: 141-150.
- Engel J. Jr.,M.A. Dichter, P.A. Schwartzkroin.(1997a)."Epilepsy". Ed. Lippincott-Raven.USA.Vol.1.p.p:419-426.
- Engel J. Jr. , and Timothy A. Pedley, M.D.(1997b)."Epilepsy". Ed. Lippincott-Raven.USA.Vol.2.p.p:1137-1154.
- Engel J. Jr. , and Timothy A. Pedley, M.D.(1997c)."Epilepsy".Ed. Lippincott-Raven.USA.Vol.3.p.p:2419-2426.
- Engel J. Jr.(1989)"Seizures and Epilepsy".Davis Company.Ed. USA.p.p:3-55.
- Fernández G.A.(1986). "Modelos Experimentales de Epilepsia".Psiquiatria.2:59-68.
- Faris P.L., Komisaruk, B.R., Watkins L.R. and Mayer D.J.(1982)."Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia.Science.219:310-312.
- Fisher R.S.(1989)."Animal models of the epilepsies" Brain Research Review.14:245-278.
- Frenk H., J. Engel, Jr., r. F.Ackermann, Y. Shavit and J. C. Liebeskind.(1979)."Endogenous opioids may mediate post-ictal behavioral depression in amygdalaoid-kindled rats".Brain Research.167:435-440.
- Frost J., Helen Mayberg, rRobert Fisher, Kenneth Douglass, Robert Dannals, Jonathan Links, Alan Wilson, et al. (1988)."Mu-opiate Receptors Mesasured by Positron Emission Tomography Are Increased in Temporal Lobe Epilepsy".Ann Neurol. 23: 231-237.
- Galina Z.H. and Kastin A.J.(1986)."Existence of antiopiate systems as illustrated by MIF-1, Tyr MIF-1".Life Science".39:2153-2159.

- Gall Ch.(1988). "Seizures Induce Dramatic and Distinctly Different Changes in Enkephalin, Dinorphin, and CCK Immunoreactivities in Mouse Hippocampal Mossy Fibers" *The Journal of Neuroscience*. 8(6):1852-1862.
- García E. et al.(1999). "Historia de la Epilepsia". Ed. Masson. Barcelona.p.p.:9-15.
- Goddard G.V., D.C. McIntyre, C.K. Leech.(1969). "A Permanent Change in Brain Function resulting from Daily Electrical Stimulation". *Experimental Neurology*. 25:295-330.
- Goodman G.A. et al.(1990). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed. Pergamon. USA. pp:486-499.
- Heinz G.W., J. Engel, P.D. Williamson, T.L. Babb, P. Gloor.(1993). "Surgically Remediable Temporal Lobe Syndromes. Surgical Treatment of the Epilepsies". Second Edition. 49-62.
- Hendelman W.(2000). "Atlas of Neuroanatomy" Ed. CRC Press. USA. p.p.:185-209.
- Hong J.S., P.H. K. Lee, C.W. K. Xie, and C.L. Mitchell.(1993). "Relationship between hippocampal opioid peptides and seizures". *Progress in Neurobiology*. Vol.40:507-528.
- Iadarola M., C. Shin, J.O. McNamara, and H. Y.T. Yang.(1986). "Changes in Dynorphin, Enkephalin and Cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling". *Brain Research*. 365:185-191.
- Kanamatsu T., J. Obie, J.F. McGinty, K. Yoshikawa, S. Sabol and J.S. Hong.(1986). "Kainic Acid Alters the Metabolism of Met-Enkephalin and the level of Dinorphin a in the Rat Hippocampus" *The Journal of Neuroscience*. 6(10):3094-3102.
- Lason W. et al. (1988). "Mu but not Delta Opioid Receptor Stimulation Intensifies Kainic Acid-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampus". *Neuropeptides*. 12:89-94.
- Lothman E. and Collins R. (1981). "Kainic Acid induced limbic seizures: Metabolic, Behavioral, Electroencephalographic and Neuropathological correlates". *Brain Research*. 218: 299-318.
- Madar I., R.P. Lesser, G. Krauss, J.K. Zubieta, J.R. Lever Ch. Kinter, T.R. Hyden, J.L. Musachio, W.B. Mathews, R. Dannals, and J.J. Frost.(1997). "Imaging of δ and μ -Opioid Receptors in Temporal Lobe Epilepsy by Positron Emission Tomography". *Ann. Neurol*. 41:358-367.

- Makram G. et al. (1981). "Neural substrates of Limbic Epilepsy". Warren & Green, USA. p.p.:3-15
- Mayberg H., B. Sadzot, C. C. Meltzer, R.S. Fisher, R.P. Lesser et al. (1990). "Quantification of Mu and Non-Mu Opiate Receptors in Temporal Lobe Epilepsy Using Positron Emission Tomography". Ann Neurol. 30:3-11.
- McNamara J. (1994). "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy". The Journal of Neuroscience. 14(6): 3413-3425.
- Molaie M., and Kadzielawa K. (1989). "Effect of Naloxone Infusion on the Rate of Epileptiform Discharges in Patients with Complex Partial Seizures". Epilepsia. 30(2):194-200.
- Nadler J.V., B.W. Perry and C.W. Cotman. (1980). "Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid". Brain Research. 112:1-9.
- Nadler J.V. (1979). "Kainic Acid: Neurophysiological and Neurotoxic actions". Life Sciences. Vol. 24:289-300.
- Nadler J.V. (1981). "Kainic acid as tool for the study of Temporal Lobe Epilepsy". Life Sciences. Vol 29:2031-2042.
- Nance M.J.P. (1982). "Ipsilateral Hypotalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following Hemicastration". Brain Research. Bull. 8:299-302.
- Nance M.J.P. (1983). "Neural Regulation of the Ovary: Evidence for hypotalamic asymmetry in endocrine control". Brain Research. Bull. 10:353-355.
- Naranjo J.R., M.J. Iadarola, and E. Costa. (1986). "Changes in the Dynamic State of Brain Proenkephalin-Derived Peptides During Amygdaloid Kindling". Journal of Neuroscience Research 16:75-87.
- Neisewander J.L., A.J. Nonneman, S.A. McDougall and M.T. Bardo. (1989) "Up-regulation of Opiate Receptors Following Chronic Naloxone Treatment in Aged Rats". Neurobiology of Aging. Vol. 10:55-58.
- Nestler E.J. et al. (2001). "Molecular Neuropharmacology". Ed. Mc Graw Hill, USA. p.p.:444, 144-148.

- Nicoll R.A., B.E. Alger and C.E. Jahr.(1980)."Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. *Nature*. Vol 287: 22-25.
- North R.A.,J.T. Williams,A.Surprenant and Ch.J. McDonald.(1987)."μ and δ receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels".*Neurobiology*.Vol. 84: 5487-5491.
- Pasternak G.W.et al.(1986)."The Opiate Receptors".Ed.The Humana Press,USA.p.p.:46-52,17,99,115.
- Paxinos G.et al.(1986)."The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates". Academic Press,USA. p.p.30,31,35.
- Pérez C.C. & Rocha L. (2001). " Kainic Acid Modifies Mu Receptor Binding in Young, Adult and Elderly Rat Brain". *J.Comp.Neuron*. En prensa.
- Racine R. J.(1972)."Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure".*Electroenceph.Clin. Neurophysiol*.32:281-294.
- Rang J.et al.(2001)."Pharmacology".Ed. Mc Graw Hill,USA.p.p.:1112-1129.
- Rocha L., R.F.Ackermann, Y.Nassir, H.T. Chugani and J. Engel Jr.(1993)."Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: an autoradiographic study".*Epilepsy Research*.14:195-208.
- Rocha L., N.T. Maidment, C.J. Evans, R.F. Ackermann, and J. Engel Jr.(1994). "Microdialysis Reveals Changes in Extracellular Opioid Peptide Levels in the Amygdala Induced by Amygdaloid Kindling Stimulation". *Experimental Neurology*.126: 277-283.
- Rocha L.,C.J. Evans and N.T. Maidment. (1997). "Amygdala Kindling Modifies Extracellular Opioid Peptide Content in Rata Hippocampus Measured by Microdialysis". *Journal of Neurochemistry* Vol. 68 No. 2. 616-623.
- Rocha L. and Maidment N.T. (2002)."Opioid Peptide Release in the Rat Hippocampus Following Kainic Acid-Induced Status Epilepticus".*Hippocampus*. En prensa.
- Sperberg.E.F., P.K. Stanton, Hass R.F., Ackermann and S.L. Moshé.(1992)."Developmental differences in the neurobiology of epleptic brain damage". *Molecular Neurobiology of Epilepsy*.*Epilepsy Res. Suppl.* 9:67-76.
- Sperk G.(1994)."Kainic Acid Seizures in the Rat". *Progress in Neuroscience*. Vol. 42:1-32.

- Talavera E., Omaña- Zapata, I., Asai, M. and Condés Lara, M.(1989). "Regional brain IR-Met-,IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling". Brain Resarch.485:141-148.
- Tao .P.L.,Chiu.Lan Tsai,L.R. Chang, and Horace H-Loh.(1991). "Chronic effect of DPDPE on rat brain opioid receptors". European Journal of Pharmacology. 201:209-214.
- Tortella F.C., E. Echevarría, L. Robles, H. I. Mosberg and J. W. Holaday.(1988). "Anticonvulsant Effects of Mu (DAGO) and Delta (DPDPE) Enkephalins in rats".The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 1.No 9: 1177-1181.
- Tortella F.C.and J.B. Long.(1988). "Characterization of opioid peptide-like anticonvulsant activity in rat cerebrospinal fluid". Brain Research. 456: 139-146.
- Tortella F.C., L.E. Robles, J.W. Holaday and A. Cowan.(1983). "A selective role for δ receptors in the regulation of opioid-induced changes in seizure threshold". Life Sciences. Vol. 33. Suppl. 1: 603-606.
- Tortella F.C.et al. (1984). "Electroencephalographic assessment of the role of δ receptors in opioid peptide-induced seizures". Neuropeptides.5:213-216.
- Urca G., Frenk H., J. C. Liesbeskind.(1977). "Morphine and Enkephalin: Analgesic and Epileptic Properties". Science. Vol. 197.No.2: 83-86.
- Vindrola O., R. Briones, M. Asai y A. Fernández.(1981) "Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in the rat brain" Neuroscience Letters. 21:39-43.
- Zieglansberger W., E.D. French, G.R. Siggins and F.E. Bloom.(1979). "Opioid Peptides May Excite Hippocampal Pyramidal Neurons by Inhibiting Adjacent Inhibitory Interneurons". Science.Vol.205:415-417.