

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA
Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ



**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE DIVERSOS
AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS E INMUNOMODULADORES SOBRE EL
DESARROLLO DE UN GRANULOMA AMIGDALINO CEREBRAL Y LA
INDUCCIÓN DE EPILEPSIA CON LA INYECCIÓN DE DOSIS
SUBUMBRALES CRECIENTES DE PENTILENTETRAZOL EN RATAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN NEUROCIRUGÍA

PRESENTA:

DR. MAURICIO MARTÍNEZ MORENO

TUTOR:

DRA. MARÍA LUCINDA AGUIRRE CRUZ

México D.F., 01 de agosto del 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

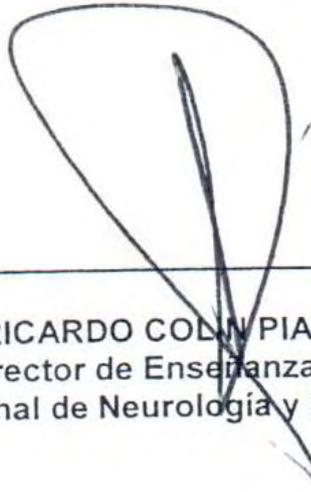


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DR. RICARDO COLÍN PIANA
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía



DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR
Subdirector de Neurocirugía
Profesor Titular del Curso
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía



DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
Directora de Investigación
Tutora de Tesis
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía



INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIURUGIA
DIRECCION DE ENSEÑANZA

DEDICATORIA

A mi madre y a mi hermano por su apoyo, amor y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A todos los familiares, amigos y colaboradores que han influido en mi formación profesional y a lo largo de mi vida.

A los maestros que pacientemente me enseñaron cómo debo hacer mi trabajo, en especial a mi tutora, por el apoyo para realizar esta tesis y por su afecto.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Epilepsia.....	7
1.1 Definición.....	7
1.2 Clasificación.....	7
1.3 Epilepsia secundaria.....	8
1.3.1 Infecciones del sistema nervioso y epilepsia.....	8
1.3.2 Tumores cerebrales.....	9
1.3.3 Malformaciones vasculares del cerebro.....	10
1.3.4 Accidentes vasculares cerebrales y crisis.....	10
1.3.5 Epilepsia Posttraumática.....	11
2. Experimentales de epilepsia.....	12
2.1 Modelos de epilepsia experimental	12
2.2 Fenómeno de <i>Kindling</i>	13
2.3 <i>Kindling</i> eléctrico.....	14
2.4 <i>Kindling</i> químico.	14
2.4.1 ¿Qué modela el <i>kindling</i> químico?	14
2.4.2 Métodos de generación.....	15
2.4.2.1 Infusiones Intracerebrales.....	15
2.4.2.2 Administración sistémica de quimioconvulsivantes.....	15
2.4.2.3 Consideraciones de la metodología.....	17
2.4.3 Aspectos clínicos/conductuales	18
2.4.4 Aspectos electrográficos... ..	18
2.4.5 Estructura de las redes.....	19
2.1.6 Neuropatología	19
3. Inflamación cerebral.....	20
3.1 Inflamación cerebral aguda.....	21
3.2 Inflamación cerebral crónica.....	22
3.2.1 Astrogliosis.....	22

3.2.2 Fibrosis	23
3.3 Inflamación y epileptogénesis	24
3.4 Antiinflamatorios e inmunomoduladores	24
3.4.1 Antiinflamatorios esteroideos.....	25
3.4.2 Ciclosporina-A.....	25
3.4.3 Colchicina.....	26
3.4.4 Talidomida.....	27
OBJETIVO.....	29
MÉTODOS	30
Inducción de granuloma por cirugía estereotáctica.....	30
Administración de tratamientos.....	30
<i>Kindling</i> químico con petilentetrazol.....	31
Implantación de electrodos corticales para registro electrográfico.....	31
Obtención de cerebros y procesamiento para análisis subsecuente	33
Análisis histológico.....	33
Determinación de colágena.	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS.....	35
Inducción de granuloma.....	35
<i>Kindling</i> químico	35
Análisis histológico.....	41
Determinación de colágena	41
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV: Accidente Cerebro-Vascular; Col: Colchicina; Cs: Ciclosporina-A; CTCG: Crisis Tónico Clónico Generalizada; Ctrl: control; EMT: Esclerosis Mesial Temporal; GABA: Ácido Gama-aminobutírico; H-E: Hemtoxilina y Eosina; ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia; IM: Intramuscular; IP: Intraperitoneal; KE: Kindling eléctrico; KQ: Kindling químico; MAV: Malformación Arterio Venosa; MP: Acetato de metilprednisolona; PM: Primera Mioclonía; RM: Resonancia Magnética; SNC: Sistema Nervioso Central; TAC: Tomografía Axial Simple; Tali: Talidomida; VO: Vía Oral; WHO: World Health Association; 3M: Tricrómico de Masson.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes y concentraciones de la curva tipo utilizada en la cuantificación de hidroxiprolina en la determinación experimental de colágena (p. 35)

Tabla 2 Tiempos de latencia para PM y CTCG; dosis de PTZ inductora de PM y CTCG y números de postdescargas encontrados en los animales observados y con registro de la actividad eléctrica cerebral (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (p. 37).

Tabla 3. Análisis de variables en la epilepsia inducida con PTZ en ratas con granuloma amigdalino tratadas con Tali o vehículo. * $p < 0.05$, t Student; ** $p, 0.01$, t Student (p. 40).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de cirugía estereotáctica para inducción de granuloma amigdalino.

Figura 2. Implantación de electrodos corticales y registro de actividad electrográfica.

Figura 3. Granuloma en el núcleo basolateral de la amígdala cerebral derecha. Imagen microscópica con tinción de HE, 100x.

Figura 4. Granuloma en el núcleo basolateral de la amígdala cerebral derecha, realizado mediante IMR para demostrar la localización.

Figura 5. Tiempo de latencia transcurrido desde la aplicación del proconvulsivante hasta la aparición de la PM (*p < 0.05).

Figura 6. Dosis de PTZ necesaria para inducir la primera CTCG (*p < 0.05; **p < 0.01).

Figura 7. Tiempo de latencia requerido para presentación de la primera CTCG (*p < 0.05; **p < 0.01).

Figura 8. Registro electrográfico en las diferentes aplicaciones de dosis subumbales crecientes de PTZ (k1-k7) en ratas con granuloma amigdalino.

Figura 9. Actividad eléctrica representativa de ratas con granuloma en amígdala cerebral, tratadas crónicamente (45 días) con los distintos inmunomoduladores.

Figura 10. Microfotografía del granuloma amigdalino en cerebro de rata (HE y 3M).

Figura 11. Curva tipo de Hidroxiprolina.

Figura 12. Concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido cerebral encontrado en los animales de los distintos grupos experimentales. (*p < 0.05; **p < 0.01).

RESUMEN

Antecedentes: La epilepsia es un problema de Salud Pública mundial, caracterizado por crisis paroxísticas recurrentes que resultan de una descarga excesiva de las neuronas cerebrales, causando deterioro físico y psicológico progresivo en el paciente. De acuerdo a su presentación clínica, se clasifica en dos tipos: primaria o idiopática, condicionada por diversas alteraciones genéticas, es generalizada y no evidencia daño estructural que la produzca; y la secundaria o sintomática, que es caracterizada por un daño cerebral focal demostrable y representa la mayor parte de las epilepsias del adulto. La epilepsia secundaria es causada por lesiones inflamatorias crónicas por procesos infecciosos, tumorales, traumáticos y accidentes cerebrovasculares, aceptándose que la inflamación juega un papel importante en la epileptogénesis.

Objetivo: evaluar el efecto del tratamiento crónico con antiinflamatorios e inmunomoduladores, sobre el desarrollo del granuloma cerebral inducido en ratas y su repercusión funcional en la inducción de epilepsia experimental con inyecciones subumbrales crecientes de pentilentetrazol (PTZ) ("*kindling* químico"). **Métodos:** Mediante la inyección estereotáctica de silicato de aluminio se indujo un granuloma en la amígdala cerebral derecha de 70 ratas Wistar, macho, que inmediatamente después de la cirugía se comenzaron a tratar con: ciclosporina (Cs), colchicina (Col), metilprednisolona (MP), talidomida (Tali) o vehículo (agua, agua-alcohol 2% y aceite)(Ctrl), durante 45 días. Al finalizar el tratamiento se indujo epilepsia mediante la inyección de dosis subumbrales crecientes de PTZ y se midió el tiempo de latencia y dosis necesarios para la presentación de la primera mioclonía (PM) y crisis tónico clónico generalizada (CTCG). Previo al *kindling*, ratas de cada grupo fueron implantadas con electrodos corticales para registro encefalográfico y análisis de la actividad eléctrica. Se midió la duración de la PM y CTCG, y el número de postdescargas. Luego de la presentación de CTCG, los animales fueron sacrificados y perfundidos para el procesamiento histológico para la obtención de cortes y su tinción con hematoxilina y eosina (H-E) y con tricrómico de Masson (3M). Además, se determinó la colágena tisular mediante la medición de hidroxiprolina (método de Woessner modificado).

Resultados: Se registró una latencia de 2.19 minutos para el desarrollo de la PM en el grupo control (n = 9) frente a 3.97 en el grupo de talidomida (n= 3) ($p < 0.01$). El número de postdescargas promedio tras la primera dosis de PTZ fue de 30 en el grupo control y de 10 en el grupo de ratas que recibió tratamiento con talidomida sin que esta relación fuera estadísticamente significativa. La dosis acumulada de PTZ requerida para el desarrollo de CTCG fue de 164.8 mg en el grupo control, de 255 mg el grupo que recibió tratamiento con metilprednisolona ($p < 0.05$) y de 290 mg las ratas que recibieron talidomida ($p < 0.01$). La latencia acumulada para la presentación de la primera CTCG fue de 107.85 minutos en el grupo de ratas control, de 143.94 minutos el grupo que recibió metilprednisolona y de 155.92 minutos el grupo de talidomida ($p < 0.04$, 0.02, respectivamente). La cantidad de colágena (mg de hidroxiprolina / gr de tejido) cuantificada fue significativamente menor en todos los grupos tratados (Cs, 14.65 mg/gr, $p < 0.05$; Col, 9.24 mg/gr, $p < 0.01$; MP, 6.37 mg/gr, $p < 0.001$; Tali, 14.71 mg/gr, $p < 0.05$) respecto a los controles (Ctrl, 24.93 mg/gr). **Conclusiones:** La talidomida disminuye la deposición de colágena durante la formación de un granuloma cerebral inducido en ratas, y aumenta los requerimientos de pentilene tetrazol (PTZ) necesarios en los animales para el desarrollo de mioclonías y crisis convulsivas tónico-clónico generalizadas.

INTRODUCCIÓN

1. Epilepsia.

1.1 Definición.

La epilepsia es un problema de salud pública internacional que afecta alrededor de 38 millones de individuos (WHO, 2002). Se caracteriza por crisis paroxísticas, recurrentes, de origen multifactorial, que resultan de una descarga excesiva de las neuronas cerebrales y que causan deterioro físico y psicológico progresivos en el paciente (Rubio, 2002). La epilepsia representa una proporción significativamente alta en la carga mundial por todas las enfermedades (Murray, 1994) y su costo económico, social y personal se debe principalmente a la falta de control de las crisis (Begley y col., 2000).

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) considera como *crisis epiléptica* a la aparición transitoria de signos y/o síntomas debido a actividad neuronal excesiva y sincrónica en el cerebro. La *epilepsia* es un desorden crónico del cerebro caracterizado por la predisposición permanente a presentar crisis epilépticas y por las alteraciones neurobiológicas, cognitivas, psicológicas, y sociales derivadas de esta condición (Chang y Lowenstein, 2003; Fisher y col 2005).

1.2 Clasificación.

La clasificación actual de la LIAE divide a la epilepsia en *generalizada* y *focal*, dependiendo si la actividad epiléptica se origina simultáneamente en ambos hemisferios cerebrales o se localiza en alguna parte de un hemisferio, respectivamente. De acuerdo al mecanismo que origina la epilepsia puede dividirse en *idiopática* o *hereditaria*, cuando existe una alteración genética condicionante de las crisis, sin una alteración estructural que pueda justificarlas; y *secundaria* o *sintomática*, cuando la actividad eléctrica anormal resulta de lesiones estructurales o metabólicas del sistema nervioso central (SNC), que pueden ser: *adquiridas*, como en procesos infecciosos del SNC (Calvillo, Paz y Sotelo, 1996; Stringer, 2006; Vázquez y Sotelo, 1992); accidentes vasculares cerebrales (De Reuk JL, 2007; Vercueil L, 2007); y traumatismos craneoencefálicos, TCE (Annegers y col., 1998; Ates y col., 2005). Pueden ser *endógenas*, como la epilepsia derivada del desarrollo tumores cerebrales (Salanova y col., 1995; Panda y col., 2005;) o por la presencia de malformaciones congénitas (Hauser y Mohr, 2011; Josephson y col., 2011); o *genéticos*, en los casos de síndromes que en espectro condicionan alteraciones

estructurales o trastornos metabólicos que desencadenan como en la esclerosis tuberosa o fenilcetonuria. Se reserva el término de *epilepsia criptogénica* para aquellas crisis cuya causa no ha podido determinarse. Se estima que más de la mitad de las epilepsias son sintomáticas y corresponden a las de mayor dificultad en el control de las crisis (Engel J, 2001). La más común de las formas de epilepsia humana es la esclerosis mesial temporal (EMT) con esclerosis hipocampal que se considera una epilepsia adquirida por una lesión ocurrida en el período perinatal y los 5 primeros años de vida, y que probablemente condiciona la muerte selectiva de neuronas hipocampales (Wieser y col., 2004).

1.3 *Epilepsia secundaria.*

Se denomina epilepsia secundaria o sintomática a la presencia de crisis que resultan de lesiones estructurales y alteraciones metabólicas del sistema nervioso central, que pueden ser demostrables mediante estudios de imagen. Se debe principalmente a las siguientes causas:

1.3.1 Infecciones del sistema nervioso y epilepsia.

Las infecciones del sistema nervioso central están asociadas a un riesgo significativamente mayor de desarrollar epilepsia (Labar y Harden, 1998). Las crisis pueden presentarse como la primera o la única manifestación de un proceso infeccioso cerebral. Las infecciones que más comúnmente se asocian con crisis convulsivas incluyen: herpes simplex, citomegalovirus, arbovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), cisticercosis, malaria, toxoplasmosis, meningitis bacterial, y abscesos cerebrales. Durante una infección las crisis pueden ser causadas por la invasión directa del tejido cerebral por el organismo infectante, la producción de toxinas por el patógeno o la producción cerebral de mediadores inflamatorios. Las infecciones sistémicas que resultan en hipoxia u otros desajustes metabólicos severos pueden desencadenar el desarrollo de crisis eplécticas. Aproximadamente 5% de los pacientes con alguna infección del SNC experimentará algún tipo de crisis epiléptica (Annegers y col., 1988), mientras que el 15% de todas las crisis convulsivas secundarias que se presentan de manera aguda corresponden a procesos infecciosos del SNC (Eisenschenk y Gilmore, 2001).

1.3.2 Tumores cerebrales.

Aproximadamente 127,000 nuevos casos de cancer del sistema nervioso central son diagnosticados cada año en todo el mundo (Parkin y col, 1999). Se presentan clínicamente con signos y síntomas generales o focales, los primeros generalmente en relación al aumento en la presión intracraneal, como son cefalea y náuseas; los segundos reflejan la localización de la tumoración en el cerebro, como puede ser la presencia de una paresia o afasia. Las crisis son usualmente el primer síntoma de un tumor intracraneal y pueden preceder a otros síntomas o al propio diagnóstico por varios años. No es infrecuente que al momento aparecer las crisis, la tomografía simple se aprecie normal y en la resonancia magnética existan sólo cambios sutiles que pueden pasar desapercibidos. Se estima que las crisis convulsivas se presentan en pacientes con diagnóstico de tumor cerebral con una frecuencia de 20-60% (Liigan y col., 2001), aunque se reporta que puede ir de 15-95%, dependiendo del tipo tumoral y la localización cerebral de la neoplasia (De Angelis, 2001). Se observan crisis en alrededor del 90% de los pacientes portadores de oligodendroglioma; en 65-95% de los pacientes con gliomas de bajo grado; en el 15-25% de los pacientes con gliomas malignos (WHO III-IV); en el 30-40% de los pacientes con meningiomas; en aproximadamente 10% de los pacientes con linfoma primario del sistema nervioso; en 20-40% de los pacientes con metástasis cerebrales; y en más del 15% de los pacientes con metástasis leptomeningeas (Gorji A y Speckmann E, 2006; de Angelis, 2001). La resección tumoral “completa” de la neoplasia permite un adecuado control de las crisis convulsivas hasta en un 42.8% de los casos (Guilioni, 2009). Se considera que la epilepsia que persiste luego de la resección quirúrgica de una tumoración cerebral es consecuencia de la presencia de tejido residual no aparente al cirujano en el momento de la cirugía, a gliosis desencadenada por el acto quirúrgico o a la presencia de displasia cortical adyacente a la tumoración, no considerada preoperatoriamente o no incluida en el tejido reseado (Tian y col., 2011).

1.3.3 Malformaciones vasculares del cerebro.

Las malformaciones vasculares con mayor repercusión clínica son las malformaciones arterio venosas (MAV) y los angiomas cavernosos o cavernomas (CA), son entidades bien reconocidas por su capacidad para producir crisis convulsivas, entre otros síntomas. Al igual que los pacientes con tumor cerebral, las crisis epilépticas pueden ser la primera o la única manifestación clínica en estos pacientes (Hauser y Mohrt, 2011). La forma de presentación de las crisis difiere entre los pacientes con diagnóstico de MAV y CA, aunque aproximadamente un 25% de ambos tipos de pacientes debutarán clínicamente con crisis convulsivas. En los casos de MAV, un 50% adicional de los pacientes que debutaron con crisis se diagnosticará por presentar hemorragia o algún déficit neurológico focal. Un 50% los pacientes con CA que presentaron crisis epilépticas serán diagnosticados de manera incidental, generalmente en abordaje diagnóstico de síntomas inespecíficos como cefalea o náuseas. Aproximadamente un 15% de los pacientes de ambos grupos, que se manifestaron con hemorragia, habrán experimentado al menos una crisis al momento del ictus. De la misma forma que en otras patologías cerebrales (traumatismos, infartos o infecciones), la presencia temprana de crisis convulsivas será predictora de epilepsia subsecuente. Es también importante considerar otros factores como el volumen de la lesión, su localización y el antecedente de sangrado subclínico previo. Es importante informar al paciente y familiares además de los riesgos vasculares inherentes a estas patologías, sobre la posibilidad del desarrollo de epilepsia o sobre el curso que puedan seguir sus crisis si ya se han presentado (Josephson y col., 2011).

1.3.4 Accidentes vasculares cerebral y crisis epilépticas.

Las crisis convulsivas y el estado epiléptico pueden presentarse como una complicación temprana (<7-14 días) o tardía (>14 días) de un accidente cerebrovascular (AVC), hemorrágico o isquémico (Ferro y Pinto, 2004). Actualmente no existen guías estandarizadas con relación a los factores de riesgo, el diagnóstico y el tratamiento de las crisis convulsivas secundarias a un AVC. La división entre crisis de inicio temprano y tardío, es aún arbitraria pues otros autores consideran como tardías las crisis que se presentan un mes después del ictus, principalmente entre los 30 días y los seis meses (Vercueil, 2007). Varios factores de riesgo han sido identificados para el desarrollo de

crisis posteriores a un AVC. Las crisis tempranas son más frecuentes con eventos isquémicos o hemorrágicos más severos e inhabilitantes, o en aquellos con involucro cortical. Aproximadamente un 4% de los pacientes con un AVC agudo tendrán al menos una crisis, en cualquier momento de su evolución, y de estos, la mitad desarrollará epilepsia. Aproximadamente un 10.6% de los pacientes con AVC hemorrágico desarrollarán crisis epilépticas, frente a un 8.6% de aquellos que presentaron un evento isquémico (Bladin y col., 2000). Si bien tanto las crisis de aparición temprana como las de inicio tardío no parecen tener un impacto significativo en la mortalidad de los pacientes, la presencia de un estado epiléptico es habitualmente un fuerte predictor de fatalidad. La decisión de si iniciar tratamiento antiepiléptico después de una primera crisis o esperar a que exista recurrencia es aún controversial, y se debe considerar entre otros factores, el riesgo de interacción farmacológica en pacientes habitualmente polit-tratados y críticamente enfermos (Ferro y Pinto, 2004; De Reuk JL, 2007).

1.3.5 Epilepsia postraumática.

Las contusiones traumáticas y la hemorragia cerebral conducen a encefalomalacia local, depósito de hemosiderina y en algunos pacientes, a crisis epilépticas crónicas y recurrentes o epilepsia postraumática (Frey, 2003). La mayor información que se tiene sobre el riesgo del desarrollo de epilepsia postraumática proviene de estudios realizados con heridos en combates militares (Caveness y col., 1962). Sin embargo, el riesgo en la población civil no está del todo establecido. En un estudio que evaluó 5984 episodios de traumatismo craneoencefálico, Annegers y col. reportan que el riesgo relativo para el desarrollo de epilepsia postraumática fue de 1.5 (95% de intervalo de confianza, 1.0-2.2) en los casos de traumatismo leve, definido por la pérdida de la conciencia o amnesia menores a 30 minutos, sin que existiera un incremento del riesgo a 5 años. En los pacientes con trauma craneoencefálico moderado (pérdida de la conciencia mayor a 30 minutos y menor a 24 horas, o la presencia de fractura craneal), el riesgo relativo fue de 2.9 (95% de intervalo de confianza, 1.9-4.1). El riesgo relativo atribuido a traumatismos severos (pérdida del estado de conciencia mayor a un día, hematoma subdural o contusión cerebral) fue de 17.2% (95% de intervalo de confianza, 12.3-23.6). Los factores de riesgo significantes fueron: contusión cerebral con hematoma subdural,

fractura craneal, pérdida del estado de despierto o amnesia mayor a 1 día y edad mayor a 65 años (Annegers y Coan, 2000; Annegers y col., 1998).

2.0 Epilepsia experimental.

2.1 Modelos animales de epilepsia.

Los modelos animales de epilepsia son utilizados para investigar mecanismos neuronales fundamentales en la función cerebral anormal (principalmente epilepsia) e indenne. Estos modelos son utilizados también para evaluar nuevos abordajes diagnósticos específicamente diseñados para cada trastorno, o para probar la eficacia de nuevas drogas antiepilépticas. Actualmente están siendo utilizados también en el estudio de estrategias que permitan prevenir la epileptogénesis. Es posible argumentar que los estudios en humanos serían ideales. Sin embargo, además de que existen consideraciones éticas obvias que salvaguardan la integridad de los pacientes sobre todo en relación a la utilización de métodos invasivos que proberían sin duda de respuestas a preguntas científicas importantes. El control de las variables y manejo de los datos en estudios clínicos resulta complicado, pues se requiere de grandes poblaciones para fortalecer el poder estadístico de estos estudios, así mismo, los costos de investigación restringen la posibilidad de llevarlos a cabo en muchos países del mundo. Hasta antes del avance imagenológico vigente, la mayor parte de la información sobre los mecanismos de la epilepsia fue obtenida de estudios en animales, que han aportado también conocimiento sobre el funcionamiento cerebral normal (Engel y Schwartzkroin, 2006) .

Se describen modelos que reproducen crisis epilépticas agudas y modelos de epilepsia crónica. Los primeros se basan principalmente en la aplicación al animal de descargas eléctricas máximas (electrochoques), la administración de distintos quimioconvulsivantes, y mediante otros métodos que conducen a crisis convulsivas como el choque de insulina o traumatismos creaneales directos. Estos modelos permiten obtener información sobre los mecanismos de reclutamiento neuronal y las características de iniciación, descarga, propagación y cese de la actividad eléctrica (Engel, 1992). Los modelos de epilepsia crónica permiten investigar distintos mecanismos importantes con posible repercusión clínica como la excitotoxicidad, la reorganización sináptica, las alteraciones en los canales voltaje-dependientes, el

desarrollo de nuevos receptores y la activación astrocítica y microglial. Se denomina “*kindling*” al desarrollo progresivo de crisis epilépticas en respuesta a un estímulo previamente subconvulsivante, administrado de manera intermitente y repetida. Estos modelos incluyen la aplicación sistémica o local de quimioconvulsivantes como pilocarpina, ácido kaínico o pentilinetetrazol (*kindling* químico, KQ), y la estimulación eléctrica de estructuras cerebrales que conduce a estados permanentes de crisis epilépticas (*kindling* eléctrico, KE) (Goddard y col., 1969; Schwartzkroin, 1997).

2.2 Fenómeno de “*kindling*”

El *kindling* fue descrito en 1967 y nombrado dos años más tarde por Graham Goddard. Parece un fenómeno simple que se produce al provocar crisis focales comúnmente por estimulación eléctrica específica de ciertas áreas del cerebro, y se manifiesta con cambios progresivos claramente identificables en la respuesta diaria del animal a dichos estímulos. El primer día que se estimula al animal se produce una postdescarga (PD) de corta duración y baja intensidad a nivel de la punta del electrodo, asociada a una respuesta conductual mínima. No obstante, al pasar los días y repetir las dosis, la complejidad del fenómeno se vuelve evidente, estímulos de la misma magnitud son capaces de disparar PD's de gran duración y alto voltaje asociadas a una respuesta clínica severa (Goddard y col, 1969), y que llegan a presentarse en ocasiones de manera espontánea (Pinel y col., 1975). Esta progresión es rápidamente evidente cuando se estimula cualquier estructura límbica y un gran número de sitios neocorticales, pero su desarrollo es especialmente dramático cuando se estimulan estructuras del lóbulo temporal como la amígdala y cortezas adyacentes, incluyendo la prepiriforme, perirrinal, insular y entorrinal (McIntyre, 1979). En realidad lo que define al *kindling* es su incremento progresivo en la severidad de la respuesta diaria, conductual y electroencefalográfica. El fenómeno inicia modelando crisis parciales simples pero con la progresión diaria termina remedando crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, que como ya se mencionó pueden presentarse de manera espontánea, en ese momento se dice que el animal ha sido “*kindleado*”, y se le considera un animal epiléptico (Goddard y col, 1969).

2.3 “*Kindling*” eléctrico

Las crisis inducidas eléctricamente tienen una ventaja: el agente epileptogénico actúa sólo durante la activación de la descarga y la actividad epiléptica desencadenada no se ve “contaminada” por este agente. Por otro lado tiene el inconveniente de que la corriente eléctrica estimula a todas las células, neuronas y no neuronales, dentro del área de tejido estimulado. Las crisis eléctricamente inducidas pueden dividirse de acuerdo al modelo de estimulación que siguen en dos tipos principales: las provocados con la estimulación cerebral total (crisis por electrochoque), y aquéllas inducidas por la estimulación eléctrica de estructuras cerebrales bien definidas (postdescargas epilépticas) mediante la implantación estereotáctica de electrodos de descarga. Este tipo de *kindling* modela crisis parciales complejas secundariamente generalizadas por lo que reproduce alguno tipos de epilepsia humana como la que se manifiesta con crisis parciales complejas, por ejemplo la epilepsia del lóbulo temporal mesial (Wieser, 2004). El KE puede elicitar crisis con patrón clónico de baja intensidad o mínimo, condicionando sacudidas de la cabeza y extremidades anteriores; y máximo, condicionando crisis convulsivas tónico-clónico generalizadas que involucran pérdida de los reflejos posturales y caída del animal (Mares y Kubová, 2006) .

2.4 “*Kindling*” químico

La estimulación repetida con un agente químico produce crisis epiléptica manifestadas conductual y electrográficamente. Se utiliza principalmente como un modelo de epilepsia clínica particularmente

2.4.1 ¿Qué modela el “*kindling*” químico?

El *kindling* químico modela típicamente a la epilepsia parcial compleja con generalización secundaria, aunque recientemente se ha descrito un modelo de crisis de ausencia utilizando inyecciones repetidas de dosis bajas de PTZ o gamma-hidroxi-butirato que comparten algunas características con los paradigmas del KQ tradicional (Wieser, 2004).

2.4.2 Métodos de generación

Los roedores son los animales típicamente utilizados en ensayos de KQ. En un experimento típico de KQ, los animales son inyectados bajo un esquema intermitente con una droga con propiedades convulsivas, a una dosis por debajo de de la concentración umbral en todos los animales. Se observa en los sujetos las manifestaciones conductuales de la hiperexcitabilidad y la actividad convulsiva. La tasa de desarrollo del KQ puede ser variable, depende de la droga, la dosis, la vía de administración, la duración del tratamiento y el intervalo entre las administraciones. El desarrollo del *kindling* puede ser caracterizado por el número de animales que presentan crisis clónicas a un cierto número de tratamientos, el número promedio de tratamientos requeridos para inducir crisis clónicas, o el registro promedio de las crisis después de un número definido de tratamientos. En general existen dos formas de lograr el KQ:

2.4.2.1 Infusiones intracerebrales

Los estudios que emplean la introducción intracerebral directa de un quimioconvulsivante en regiones límbicas o corticales se orientan típicamente a las características electrográficas y conductuales de la respuesta convulsiva. En la mayoría de los trabajos, el sitio de inyección es la amígdala, lo que permite comparar directamente con los paradigmas del KE, que han utilizado rutinariamente a la amígdala como el foco principal del *kindling*. Los quimioconvulsivantes son inyectados lentamente a través de cánulas implantadas permanentemente para evitar el daño neuronal inducido por la perfusión en el sitio de la inyección. La actividad eléctrica en el sitio es monitorizada simultáneamente por medio de un electrodo pegado en la cánula de inyección. Esta forma de KQ se parece mucho a los procedimientos del *kindling* eléctrico (Gilbert y Goodman, 2006) .

2.4.2.2 Administración sistémica de quimioconvulsivantes

La administración sistémica de agentes convulsivantes es la forma más común de KQ. Los procedimientos son los siguientes: a los animales se les dosifica, IV, IP, SC o en el alimento, en intervalos de 24-72 hs anotando

los signos conductuales. Es posible realizar monitoreo electrográfico de la actividad cerebral para detectar la descarga de la crisis durante el *kindling*, sin embargo no siempre se lleva a cabo, por lo que se deja de conocer información electrográfica valiosa para la interpretación de las manifestaciones conductuales o clínicas secundarias a las descargas paroxísticas. La aparición gradual de los indicios conductuales de la actividad eléctrica subyacente son tomados en cuenta como evidencia del *kindling*, aunque en realidad corresponden a un efecto, por lo que estas evaluaciones son más subjetivas que las basadas en el análisis de los registros electroencefalográficos de los animales. Mediante ensayos específicos es posible utilizar estudios de KQ con evaluación observacional para determinar las propiedades pro y anticonvulsivantes de algunos agentes. Los parámetros que se pueden registrar en los estudios de KQ basados en observaciones conductuales incluyen: la severidad de la respuesta de la crisis, la frecuencia de una respuesta conductual particular dentro de un periodo de registro dado (típicamente de 30-60 minutos, dependiendo de la droga y de la vía de administración), la latencia de inicio de las manifestaciones conductuales, la duración de la respuesta conductual y el número de tratamientos de drogas requeridos para inducir una respuesta convulsiva (Gilbert y Goodman, 2006). El agente más común es el PTZ, aunque también son efectivas para el *kindling* otras sustancias que interfieren con la función del ácido gamma-aminobutírico (GABA). El PTZ es un bloqueador selectivo del canal de cloruro acoplado al receptor de GABA y está asociado con una reducción de la neurotransmisión mediada por el receptor-GABA en el SNC. La ventaja del PTZ es su efecto dosis-respuesta de tal manera que una dosis puede ser identificada cuando es subumbral y su evolución hasta ser disparadora de crisis intensas. Por lo tanto, una aparición gradual en la respuesta clínica a las crisis es fácilmente identificable, y con las suficientes repeticiones, la mayoría de los animales progresan hacia las crisis clónicas. En los animales kindleados con PTZ, es mantenida una aumentada sensibilidad a las convulsiones por varias semanas sobre la provocación con una dosis baja de PTZ o de una

variedad de otros inhibidores de la función GABAérgica central (e.g. picrotoxina, bloqueador del canal de cloruro, ligandos del receptor a benzodiazepinas, FG-7142 y RO15-4513, y el inhibidor de la síntesis de GABA isoniazida) (Corda, 1991).

2.4.2.3 Consideraciones de la metodología

Las interpretaciones del KQ pueden ser confundidas por cuestiones metodológicas hasta admitir falsos positivos. Una incrementada sensibilidad en la crisis puede resultar de la acumulación del químico en el cuerpo; la edad avanzada del animal puede llevar a una incrementada sensibilidad a los agentes convulsivantes; el incremento del peso corporal durante el período de dosificación puede resultar en una mayor dosis absoluta requerida; y alteraciones en la farmacocinética pueden llevar al incremento de los niveles plasmáticos y cerebrales. Por lo tanto, se debe reunir algunos criterios en un experimento de KQ para concluir que un número de exposiciones repetidas a un químico produjo *kindling*: 1) El KQ debe empezar con una dosis inicial subconvulsiva del químico de interés con el objeto de monitorizar la aparición gradual de la respuesta conductual ante la aplicación repetida. 2) Se debe mantener una relación entre la respuesta conductual y los hallazgos electrográficos tras la dosis inicialmente subconvulsiva con un período de lavado de suficiente duración que permita la eliminación del químico del cuerpo. 3) La exposición repetida del químico inductor de *kindling* debe demostrar una transición positiva al *kindling* eléctrico, es decir, obtener respuestas en el animal químicamente kindleado con relativa facilidad mediante estímulos eléctricos y al revés, desencadenar respuestas conductuales y eléctricas con la aplicación de químicconvulsivantes en animales eléctricamente kindleados (Mori y col, 1989). Cuando se generalicen los hallazgos de los modelos del KQ se debe tener en mente que existe una rápida distribución del fármaco y que la activación de la circuitería se mantiene relativamente sostenida luego de administra sistémicamente el proconvulsivante. En contraste con la estimulación eléctrica focal en los paradigmas tradicionales del *kindling*,

la administración sistémica de un quimioconvulsivante como el PTZ produce un acceso rápido a todas las áreas cerebrales sin necesidad de disrupción en la barrera hematoencefálica, permitiendo la activación simultánea de toda la circuitería de las crisis (Gilbert, 2006).

2.4.3 Aspectos clínicos/conductuales

Las crisis inducidas por la administración repetida de PTZ se originan en el cerebro anterior, cuando los animales han sido bien kindleados, se desarrollan eventualmente algunos elementos en el cerebro posterior. Para caracterizar al KQ muchos reportes publicados han utilizado la escala de progresión de las crisis motoras de 5 estadios de Racine (Racine, 1972). Se han introducido modificaciones a este sistema de registro para capturar características más sutiles del progreso conductual que ocurren durante la repetición de dosis subumbrales de los quimioconvulsivantes (Becker, 1999). La variabilidad asociada con el desarrollo del KQ es influida nuevamente por la droga, la dosis, el intervalo de administración y la vía que se use. Las dosis de 25-45 mg/kg de PTZ han sido utilizadas para el KQ, el desarrollo más rápido ocurre generalmente con las dosis mayores. Sin embargo, muchos de estos estudios reportan crisis clónicas en subgrupos de animales con la administración inicial y por lo tanto, no son realmente representativos del proceso *kindling*. La interpretación de los efectos de la manipulación experimental bajo investigación sobre el proceso epileptogénico se pueden comprometer bajo estas circunstancias.

La mortalidad asociada con el *kindling* por PTZ no se reporta por lo general, pero crisis severas y la muerte pueden ser más prevalentes con convulsivantes con una curva dosis-respuesta muy pendiente. Como con el *kindling* eléctrico, es mantenida la alta sensibilidad a los niveles subumbrales de los quimioconvulsivantes durante varias semanas (Corda y col., 1991).

2.4.4 Aspectos electrográficos

Aunque muchos reportes publicados han registrado la actividad cerebral durante el desarrollo del KQ, esto es más la excepción que la regla. Dependiendo de la dosis, el intervalo y la potencia del quimioconvulsivante, los signos conductuales comienzan a aparecer después de 10-15 inyecciones. En las inyecciones iniciales pueden ser

evidentes espigas aisladas en los registros corticales o límbicos, aparecen descargas breves, algunas quizá acompañadas por un signo conductual. Pueden registrarse clonus acompañados por descargas punta-onda en áreas límbicas y corticales (Gilbert, 1995).

2.4.5 Estructura de las redes

La rápida inducción de la actividad del proto-oncogen *c-fos* se ha aplicado ampliamente como un marcador de la distribución espacial de las redes multisinápticas en una gran variedad de paradigmas experimentales. El patrón espacial de la expresión de *c-fos* durante el KQ identifica la propagación de la actividad convulsiva y mapea a la expresión conductual de las crisis con un alto grado de resolución celular y anatómica (Samoriski, 1998). Se ha observado la expresión temprana del ARNm de *c-fos* en estructuras límbicas en los estados previos al clonus del *kindling*, mientras que la activación bilateral de los sitios límbicos y corticales acompaña a las crisis generalizadas inducidas por el *kindling* (Clark, 1991). Esta propuesta ha sido aplicada en una extensión mucho más limitada en los modelos del KQ, la expresión del ARNm del *c-fos* está incrementada bilateralmente en la corteza, núcleo caudado, núcleos septales, amígdala e hipocampo de animales kindleados con PTZ o cocaína. En los animales kindleados con PTZ que expresan crisis generalizadas tonico-clónicas, el patrón de expresión de *c-fos* es indistinguible de las crisis agudas inducidas por una dosis convulsiva de PTZ. Las manifestaciones conductuales de las sacudidas mioclónicas al principio del proceso son comunes en el KQ, y sugieren un involucramiento cortical.

2.4.6 Neuropatología

Durante varios años, se pensaba que el *kindling* eléctrico y las crisis inducidas por el *kindling* no conducían a muerte celular. El objetivo de las primeras investigaciones fue identificar los cambios neuroanatómicos responsables del proceso *kindling*, más que los mecanismos sobre el daño neuronal que producía la epilepsia. Varios estudios no reportaban evidencias de pérdida celular o gliosis reactiva después del *kindling* eléctrico. Posteriormente se logró identificar los cambios anatómicos que pueden acompañar al *kindling* eléctrico. Sutula y colaboradores demostraron los cambios inducidos por el *kindling* en el hipocampo, especialmente en el giro dentado, el cual evidencia pérdida celular neuronal en el giro dentado y la reorganización sináptica de las fibras musgosas

del la capa molecular interna (Cavazos y col, 1990). Este grupo ha reportado recientemente que neuronas inmunoreactivas a colecistoquinina y al transportador de GABA GAT-1 son particularmente vulnerables al *kindling*, esto puede explicar el decremento en los mecanismos neuronales inhibitorios a los que conduce el *kindling*. Se ha reportado también que hay una disminución en la densidad neuronal de la amígdala y la corteza amigdalina de ratas kindleadas (von Bolen, 2004), y existe evidencia de que las crisis kindleadas pueden inducir pérdida de células granulares del dentado por apoptosis (Bengzon, 1997). Se ha hipotetizado que el incremento en el área hilar después del *kindling* es debido al incremento en la gliosis reactiva. A pesar de estas observaciones, todavía permanece en debate la naturaleza y magnitud de los cambios estructurales y si estas son causa o consecuencia de la actividad convulsiva (Adams, 1998). Existen varios reportes de pérdida neuronal y reorganización sináptica en animales kindleados por la administración sistémica de PTZ. Se observó la pérdida de células neuronales en hipocampo de células kindleadas con PTZ, acompañado de un aumento en la inmunoreactividad de la PGFA (GFAP), un marcador de astrocitos. El incremento en la tinción de GFAP sugiere un incremento de la gliosis reactiva (Franke, 2001). Además de la gliosis reactiva y muerte neuronal, se ha reportado que el *kindling* con PTZ induce un incremento en los brotes de fibras musgosas, y un brotamiento en CA1 y el subiculum de las ratas (Gilbert, 2006).

3. Inflamación cerebral

La inflamación participa en la promoción de un gran número de procesos neurológicos agudos y crónicos. Recientemente se ha considerado la importancia de la inflamación en la patogénesis de la epilepsia y el daño cerebral inducido por las propias crisis. Se ha demostrado ya el desarrollo de procesos inflamatorios como la activación de astrocitos y microglia, y la producción de citocinas proinflamatorias, tanto en cerebros de pacientes con epilepsia como en modelos experimentales de la misma. La respuesta al tratamiento con antiinflamatorios esteroideos en algunos pacientes con epilepsias de difícil control ha puesto de manifiesto el papel funcional que la inflamación cerebral

posee. Así mismo, muchas enfermedades inmunológicas en niños se acompañan de crisis convulsivas. Cada día hay más información que demuestra el papel de la inflamación en la epileptogénesis, sin embargo, es también la epilepsia fuente de inflamación por lo que resta mucho para entender con claridad la relación entre inflamación y epilepsia (Lerner-Natoli, 2011; Temkin, 2009).

3.1 Inflamación cerebral aguda

Se ha demostrado la elevación de citocinas proinflamatorias en los cerebros de animales sometidos a epilepsia experimental, así como en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con AVC y epilepsia. Esta liberación conduce a una regulación a la alza de moléculas de adhesión endotelial y de neutrófilos, y favorece la migración leucocitaria a través del endotelio y la barrera hematoencefálica. El reclutamiento leucocitario inicia cascadas de señalización que resultan en una desorganización de las uniones estrechas de las células endoteliales y un colapso en la integridad de la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente la mayor parte de los estudios que evalúan el papel de la inflamación aguda en la epilepsia, se enfocan al estudio de las repercusiones inflamatorias del fenómeno eléctrico (Ravizza, 2011). Existen distintos mecanismos que justifican la hiperexcitabilidad del tejido nervioso secundaria a un proceso inflamatorio agudo, como el efecto de las citocinas sobre canales iónicos y otros receptores. Se ha demostrado que las citocinas pueden alterar rápidamente la función de los neurotransmisores mediante la modulación del ensamblaje y fosforilación de su receptor a nivel de la membrana neuronal (Viviani, 2007); por incremento en la concentración de glutamato, por reducción de la recaptura de glutamato por los astrocitos mediante la inhibición de la glutamina sintetasa, y mediante la inducción de la liberación de glutamato de las células gliales por la vía del óxido nítrico (Hu, 2000); por alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; y de la excitabilidad mediada por prostaglandinas (Ravizza, 2011).

3.2 Inflamación cerebral crónica

La inflamación cerebral crónica se acompaña de la activación de procesos de reparación tisular, que favorecen el desarrollo de fibrosis y cicatrización, limitantes del daño tisular, pero que ocasionan alteraciones estructurales y funcionales en el parénquima cerebral (Gilroy, 2000; Golarai y col., 2001; Santhakumar y col., 2001; Mathews, Oommen y Francel, 2001). Los mediadores del proceso inflamatorio y de reparación tisular actúan conjuntamente en redes complejas de regulación autocrina y paracrina (Erich y col., 1977; Prockop y col., 1979; Vázquez y Sotelo, 1992; Bedossa, 1993, Calvillo, Paz y Sotelo, 1996; Cotran y col., 1998; Aguirre-Cruz y Sotelo, 2002). Algunos de tales mediadores son: citocinas, factores de crecimiento, proteasas, eicosanoides y cininas (Cotran y col., 1998; Ginard y Warren, 2003). Entre los principales mediadores inflamatorios del sistema nervioso central se encuentran: la IL-1 β , la IL-6 y los factores de necrosis tumoral (TNF) α y β , los cuales modulan la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y astrocitos, inducen la liberación de otras citocinas, incrementan la expresión de moléculas MHC I y la de su propio receptor para TNF- α y favorecen la astrogliosis (Benveniste, 1997; Gordon, 1992; y Peetre y col., 1986); y el factor- β de crecimiento transformante (TGF- β), que modula la actividad de astrocitos y microglia, actúa como agente quimiotáctico de astrocitos y microglia (Lerner-Natoli, 2011) y favorece el acúmulo de proteínas de matriz extracelular (tales como fibronectina y colágena) mediante la inhibición de la producción de colagenasas y el incremento en la expresión de inhibidores de metaloproteinasas (Ignatz y Massagué, 1986; Edwards y col., 1987; Flanders y col., 1993; Border y Noble, 1994; Cotran y col., 1998; Blobel, Schiemann y Lodish, 2000).

3.2.1 Astrogliosis

Por más de 100 años la proliferación astrogliosa ha sido vista como un hallazgo patognomónico en las muestras de hipocampo de pacientes sometidos a lobectomía temporal por epilepsia de difícil control. Actualmente ya no representa un proceso simple de cicatrización cerebral cuando existe degeneración neuronal pues estudios recientes demuestran que tienen un papel importante en el establecimiento y propagación de actividad eléctrica cerebral anormal (Tian, 2005). Los astrocitos son un componente crítico de la barrera hematoencefálica y

participan activamente en la recaptura de potasio y glutamato, y en la producción de factores de crecimiento, citocinas y proteínas de matriz extracelular (Edkahl, 2003). La estimulación directa de los astrocitos por fotólisis induce despolarizaciones paroxísticas y tiempos de despolarización anormalmente alargados en modelos de epilepsia experimental. El estudio mediante cultivo de astrocitos ha permitido conocer que tienen potenciales de membrana en reposo normalmente despolarizados y que son capaces de generar potenciales de acción. Los astrocitos se activan inicialmente por descarga neuronal excesiva, mediante vías calcio dependientes, sin embargo, una vez activados, no requieren subsecuentemente del estímulo neuronal para perpetuar su actividad inducida, lo que sugiere que participan activamente en procesos epilépticos crónicos (Choi, 2008). Luego de la activación astrogliar se producen nuevos astrocitos con cambios importantes a nivel de los receptores y canales membranales, favoreciendo así que el fenómeno de hiperexcitabilidad se mantenga vigente. Los cambios que denotan son principalmente: alteraciones en los receptores GluR1; afectación en la recaptura de potasio; sobreexpresión de adenosin cinasa; subexpresión de glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y transportador de GABA glial (Kang, 2006) .

3.2.2 *Fibrosis*

La fibrosis inducida por una lesión tisular sustituye a las células parenquimatosas no regeneradas por tejido conectivo (Bedossa, 1993; Cotran y col., 1998). La molécula principal de este proceso es la *colágena* (Prockop y col., 1979), constituyente de una familia de proteínas de la matriz extracelular relacionadas estrechamente, que son los componentes fibrilares del tejido conectivo (Vuorio, 1990; Mayne y Brewton, 1993; Prockop y Kivirikko, 1995; Brown y Timpl, 1995). Actualmente, más de 20 tipos de colágena constituyen el andamio de soporte de todos los tejidos conectivos (van der Rest, 1991; Brown y Timpl, 1995). Mientras que las colágenas mayores (Tipo I, II y III) se agregan formando fibrillas rígidas que poseen gran fuerza de tensión, las colágenas menores desempeñan diversas funciones accesorias (Mayne y Brewton, 1993). Otros elementos con

propiedades quimiotácticas, opsónicas y adherentes a la matriz extracelular son: las membranas basales que forman la interfase entre las células y el estroma, contienen colágena Tipo IV y en el SNC son sólo vasculares; la laminina adherente de células con receptor específico; la fibronectina, glicoproteína con dominios especializados con sitios de fijación específicos que le permiten fijarse con avidez a colágena, fibrinógeno, fibrina y otras superficies celulares; y los proteoglicanos, formados por largas cadenas no ramificadas de polisacáridos que se unen a colágena, fibras elásticas y fibronectina, organizando la matriz extracelular y constituyendo los componentes de depósito que predominan en las fases iniciales de la reparación, antes de que la concentración de colágena se torne prominente (Martínez-Hernández, 1990).

3.3 Inflamación y epileptogénesis

La fisiopatología del tejido cerebral lesionado no se conoce del todo, pero se cree que en el sitio dañado se produce una descarga paroxística local, por liberación excesiva de glutamato o aspartato y mayor actividad del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), que se transmite desde el sitio original a través de una red dendrítica anormal, carente de mecanismos inhibitorios, generándose así una descarga excitatoria que escapa a la acción de los mecanismos inhibitorios (Sloviter, 1994). Algunos estudios con modelos de daño focal en el cerebro, evidencian pérdida progresiva de algunas neuronas, hiperexcitabilidad de otras y reorganización sináptica (Golarai y col., 2001 y Santhakumar y col., 2001; Mathews y col., 2001; Dudek y Shao, 2002).

3.4 Antiinflamatorios e inmunomoduladores.

A pesar del uso difundido de agentes farmacológicos clásicos e innovadores, que inciden sobre canales iónicos, transmisión de aminoácidos y receptores para controlar la epilepsia (Solbrig y Koob, 2004; Kelso y Cock, 2005), no existen terapias preventivas de epilepsia secundaria a infecciones persistentes, resecciones quirúrgicas extensas, lesiones traumáticas o vasculares del sistema nervioso central, condiciones que se han asociado comúnmente a respuestas refractarias al tratamiento (Singhvi y col. 2000; Solbrig y Koob, 2004; Panda y col., 2005).

Algunos agentes farmacológicos con propiedades anti-inflamatorias que podrían tener actividad potencial para prevenir el desarrollo de epilepsia secundaria a una lesión cerebral son: los corticosteroides, la colchicina, la talidomida y la ciclosporina-A.

3.4.1 Antiinflamatorios esteroideos

La administración complementaria de corticosteroides, reduce la morbilidad y mortalidad en pacientes con padecimientos agudos o crónicos, que cursan con inflamación cerebral (Koroshetz y Swartz, 1998; Sheld, 1998; y Gilroy, 2000). Los corticoesteroides incluyen moléculas naturales y sintéticas que se utilizan para el tratamiento de trastornos de la función suprarrenal y de procesos inflamatorios e inmunitarios (Goldfiel, 1998). De especial interés, es el efecto de varios glucocorticoides sobre tejidos conectivos diversos (Cutroneo, Rokowski y Counts, 1981; Oikarinen y Uitto, 1985), en los que se ha encontrado disminución del depósito de colágena. (Stevanovic, 1972; Smith, Wehr y Chalker 1976; Booth y col., 1982; Aguirre-Cruz, Calvillo y Sotelo, 1998) y reducción de IL-1 β (; Koroshetz y Swartz, 1998; Sheld, 1998; Gilroy, 2000). Un estudio de la acción de la administración crónica de acetato de metilprednisolona sobre el desarrollo de un granuloma cerebral demostró la utilidad de este agente para limitar la lesiones inflamatorias (Aguirre-Cruz, Calvillo y Sotelo, 1998). No obstante, el uso prolongado de corticosteroides puede producir cataratas subcapsulares, glaucoma con posible daño de los nervios ópticos, síndrome de Cushing y facilitar el desarrollo de infecciones secundarias.

3.4.2 Ciclosporina-A

Otro agente inmunomodulador prometedor en la actualidad es la Ciclosporina-A (Cs), el cual es utilizado ampliamente en el campo clínico para disminuir el rechazo tisular secundario a transplante de órganos (Riess y col., 2001). Muchas de sus acciones inmunosupresoras no han podido ser esclarecidas. Ha sido propuesto que es útil para limitar el daño cerebral inducido por traumatismo craneal, (Riess y col., 2001; Okonkwo y col., 2003). La ciclosporina actúa

mediante su unión a las ciclofilinas, un grupo de proteínas de la familia de las inmunofilinas, a las que se ligan drogas inmunosupresoras tales como el FK506, rapamicina y la propia ciclosporina (Avramut, 2003). Se ha vinculado a las inmunofilinas con varias funciones generales entre las que se incluyen regulación de la permeabilidad mitocondrial, modulación de la estabilidad de los canales iónicos y actividad chaperonina (Udina, 2002). Se reporta que la acción inmunosupresora de la ciclosporina deriva de inhibición de la calcineurina fosfatasa mediante la unión del complejo Cs-inmunofilina a dicha enzima, actuando como un potente inhibidor del daño mitocondrial inducido por calcio (Sabatini, Lai y Snyder, 1997; Buki, Okonkwo y Povlishock, 1999; Alessandri y col., 2002). Se ha demostrado que la administración de Cs no solamente favorece el mantenimiento de la integridad funcional de la mitocondria al administrarlo posterior al traumatismo, previniendo con esto el desarrollo y la progresión del daño axonal difuso (Buki, Okonkwo y Povlishock, 1999). No obstante, es necesario estudiar los efectos de su administración a largo plazo.

3.4.3 Colchicina

Otro agente con actividad anti-inflamatoria potencial es la colchicina que es el alcaloide activo de varias especies de *Colchicum* (Aguirre-Cruz, Calvillo y Sotelo, 1998; Salai y col., 2001; Al-Fayyad y col., 2002). Este agente se ha utilizado tradicionalmente en el tratamiento de la gota, la fiebre mediterránea familiar (García-González y Weisman, 1992; Chappey y col., 1994), en la enfermedad de Paget del hueso (Theodors, Askari y Wieland, 1981), y en otras artritis. La colchicina forma parte de un grupo de compuestos biológicos con la capacidad de unirse a los microtúbulos, ocasionando inestabilidad del enrejado microtubular y supresión de su dinámica, mediante la formación preferencial de conexiones y polímeros alternos en los extremos del enrejado (Correia y Lobert, 2001) e interfiriendo así con diferentes funciones microtubulares, tales como el mantenimiento de la forma celular, la translocación cromosomal durante la mitosis, el transporte de macromoléculas extracelulares y la exocitosis de varias sustancias como histamina, insulina y melanina (Kersenobich y col., 1990). A nivel

articular, la colchicina modula la producción de quimiocinas y prostanoïdes e inhibe las moléculas de adhesión de células endoteliales y neutrófilos interfiriendo con el inicio y la amplificación de la respuesta inflamatoria (Molad, 2002). Experimentos diversos con colchicina, desarrollados en modelos de inflamación crónica en hígado, pulmón y vías biliares muestran un efecto preventivo de la fibrosis (Kersenobich, 1990; Zhang y col., 1992; Marcovici, Brill y Scommegna, 1993; Peters y col., 1993; Poo y col., 1993; Montasser y col., 1994; Katz y col., 1994; Ghayad y Thome, 1995; Sobh y col., 1995; Frysak y Hrcckova, 1996). En el cerebro, la administración crónica de colchicina en animales con un granuloma amigdalino evidenció un efecto limitante de la fibrosis perilesional (Aguirre-Cruz, Calvillo y Sotelo, 1998). No obstante, es necesario determinar si la limitación de la fibrosis tiene repercusiones funcionales sobre la actividad eléctrica del cerebro y hacer estudios cuantitativos de sus efectos a nivel celular.

3.4.4 Talidomida.

El resurgimiento de la talidomida, a pesar de su historia como teratógeno, la sitúa como un compuesto con actividad inmunosupresora y anti-inflamatoria potencial en el tratamiento de los procesos inflamatorios ocasionados por infecciones, problemas reumatológicos y diversos cánceres, que se atribuye a su capacidad de inhibir la producción de factor de necrosis tumoral alfa (Sampaio y col., 1991; Franks y col., 2004), pero cuyo mecanismo de acción no se conoce por completo (Sheskin, 1965; Bernal y col., 1992; Hauschild y col., 1997; Oliver y col., 1998; Ehrenpreis y col., 1999; Oliver y col., 1999; LaDuca y Gaspari, 2001). La talidomida es un derivado sintético del ácido glutámico cuya molécula consiste en un anillo de phthalimida orientado a la izquierda y un anillo de glutarimida orientado a la derecha y que existe como mezcla racémica de ambos isómeros, S(-) y R(+) (Eriksson y col., 1995; Franks y col., 2004). Fue sintetizada en 1954 por la compañía farmacéutica CIBA y prescrita como sedante, tranquilizante y antiemético para malestares matutinos. Químicamente es similar a los barbituratos y causa anomalías en las extremidades (focomelia, dismelia y amelia) y otras alteraciones congénitas en los productos de madres que lo

ingieren en las 3 a 8 semanas después de la concepción, por lo que fue retirado del mercado en 1961. No obstante, además de sus propiedades sedantes es inmunomodulador, anti-inflamatorio y antiangiogénico, por lo que se considera un agente promisorio para el tratamiento de diversas condiciones infecciosas e inflamatorias (Ng y col., 2003; Franks y col., 2004).

OBJETIVO

Buscar terapias que permitan prevenir el desarrollo de epilepsia secundaria a una lesión cerebral estructural derivada de un proceso inflamatorio crónico. En este trabajo probamos el efecto de la administración prolongada en ratas de: acetato de metilprednisolona (esteroide de depósito), ciclosporina-A, colchicina y talidomida, sobre el desarrollo de un granuloma en amígdala cerebral y su repercusión funcional en la inducción de epilepsia experimental por *kindling* químico, en ratas.

Analizar y estadificar la respuesta de los animales al *kindling* químico.

Medir la latencia de la primera mioclonía y crisis tónico generalizada, inducidas por “*kindling*” químico.

Analizar el registro de la actividad eléctrica de los animales y correlacionarlo con los hallazgos conductuales.

Analizar el número de postdescargas y las características morfológicas de las mismas en los animales administrados con los distintos anti-inflamatorios e inmunomoduladores

Analizar histológicamente la lesión granulomatosa inducida por la inyección estereotáctica de silicato de aluminio en la amígdala cerebral derecha.

Determinar la cantidad de colágena en la lesión mediante cuantificación bioquímica cuantitativa de hidroxiprolina.

MÉTODOS

Inducción de granuloma amigdalino por cirugía estereotáctica.

Setenta ratas Wistar de 280 g se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg, IP) y xilacina (12 mg/kg, IM) y se sometieron a cirugía estereotáctica (en equipo estereotáctico Stolting) para inyección de 20 μ g de kaolin (SIGMA, St. Louis Missouri, USA) en el núcleo amigdalino basolateral derecho (Ant, 6.5 mm, Lat. 5.0 mm y Alt. 8.5 mm, según el atlas de Paxinos y Watson), tomando como referencia la línea interaural. Finalmente, se administró una dosis única IM, de 12 mg/kg de peso de gentamicina (Ikatin, Lab. Pisa, México D.F.). Esta técnica ha sido estandarizada por nuestro equipo (Fig. 1).

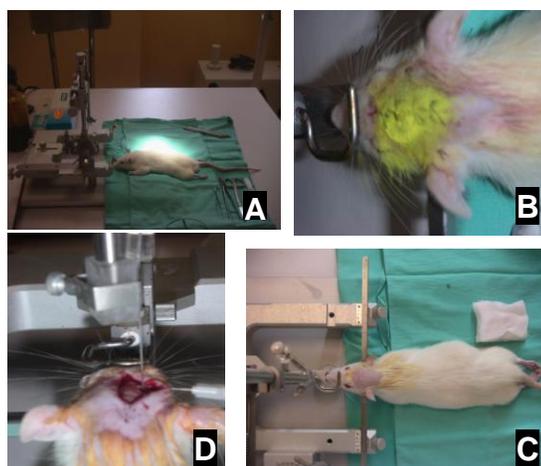


Fig. 1 Imágenes de cirugía estereotáctica para inducción de granuloma amigdalino. **A.** Equipo estereotáctico; **B.** y **C.** Montaje y sujeción del animal; **D.** Inyección estereotáctica en amígdala.

Administración de tratamientos.

Las ratas inyectadas con kaolin, se distribuyeron al azar en cinco grupos (cuatro grupos experimentales, $n = 10$, y tres grupos control, $n = 10$). Inmediatamente después de la cirugía iniciaron tratamiento durante cuarenta y cinco días con: vehículo (agua, IM; agua alcohólica al 5%, VO; o aceite de maíz, VO: *grupos control*); 4 mg/kg/semana IM de acetato de metilprednisolona, MP (Radilem, Lab. Lemery, D.F., México); 300 μ g/kg/día VO de colchicina, Col (SIGMA, St. Louis Missouri, USA), disuelta en agua-alcohólica al 5%; 160 mg/kg/día VO de talidomida, Tali (Talizer, Lab. Serral, D.F., México),

suspendida en aceite vegetal; 10 mg/kg VO de ciclosporina-A, Cs (Neolem, Lab Lemery), disuelta en agua alcohólica al 5%; mediante una sonda para alimentación intragástrica de 50.8 mm (Daigger & Co, Inc). Los tratamientos que recibieron los animales por vía oral fueron administrados en volúmenes de 200 μ L mientras que los tratamientos intramusculares fueron de 0.2 ml.

“*Kindling*” químico con pentilentetrazol

Posterior al tratamiento inmunomodulador las ratas se sometieron a la inyección IP con dosis subumbrales crecientes de pentilentetrazol, PTZ (SIGMA, St Louis, Missouri , USA), cada 48 h, iniciando con una dosis de 20 mg/kg de peso, con incrementos de 5 mg/kg de peso en cada aplicación (“*kindling*”¹, k1, 20mg/kg; “*kindling*”², k2, 25 mg/kg; “*kindling*”³, k3, 30 mg/kg, y así sucesivamente hasta) hasta la aparición de la primera crisis tónico-clónico generalizada, CTCG. En 7 ratas de cada grupo, se cronometró la latencia de la primera mioclonía y CTCG, observadas. La latencia se consideró como el tiempo transcurrido desde la aplicación del convulsivante hasta el desarrollo de la manifestación epiléptica. La identificación de mioclonías y CTCG se realizó en base a la clasificación de manifestaciones del *kindling* de Racine modificada por Becker: Fase 0, asintomática; Fase I, mioclonías faciales, fasciculaciones de ojos y orejas, movimiento de vibrisas; Fase II, sacudidas micolónicas sin reparo; Fase III, sacudidas mioclónicas con reparo; Fase IV, caída lateral, crisis tónico-clónica; Fase V, caída sobre el dorso, crisis tónico-clónico generalizada (Becker, 1999) y se registró la dosis acumulada de PTZ inductora de CTCG en cada uno de los animales. Tres ratas de cada grupo experimental, se implantaron con electrodos corticales para registro electrográfico, antes del “*kindling*”, en estos animales se midió además de las variables señaladas para el resto de los animales, la duración de la PM y de la primera CTCG así como el número de postdescargas registrados en el estadio k1.

Implantación de electrodos corticales para registro electrográfico

Dos semanas después de finalizar el tratamiento farmacológico, tres ratas de cada grupo se anestesiaron con ketamina-xilacina (10 y 12 mg/kg. IP e IM, respectivamente), se colocaron en el aparato estereotáctico (Stolting) y con técnicas de asepsia y antisepsia se rasuró la cabeza del animal y se hizo una incisión en la línea media para

descubrir el cráneo. Se disecó por planos y se retiró el tejido conjuntivo para dejar sólo el hueso y visualizar el punto de intersección entre las suturas sagital y frontoparietal (punto Bregma). Se marcaron sobre el cráneo, tres puntos (*tierra*: anterior a la sutura frontoparietal; *positivo* y *negativo*, posteriores a la sutura frontoparietal) paramediales, derechos. Con fresa del No. 2, se realizaron tres trépanos sobre el cráneo para colocar dos electrodos de acero inoxidable en la corteza motora para el registro electrográfico y uno más en el hueso frontal como tierra (Fig. 2). Por último se colocaron dos tornillos de acero inoxidable (Small Parts Inc.) en el cráneo. Los electrodos se soldaron a un conector hembra, fabricado en el laboratorio y todo el dispositivo se fijó con acrílico dental. Al final de la cirugía se aplicó una dosis IM única de gentamicina (12 mg/kg de peso) y se suturó la piel. Los animales implantados se dejaron en recuperación en cajas individuales de acrílico durante siete días antes de inducir el *kindling* químico.

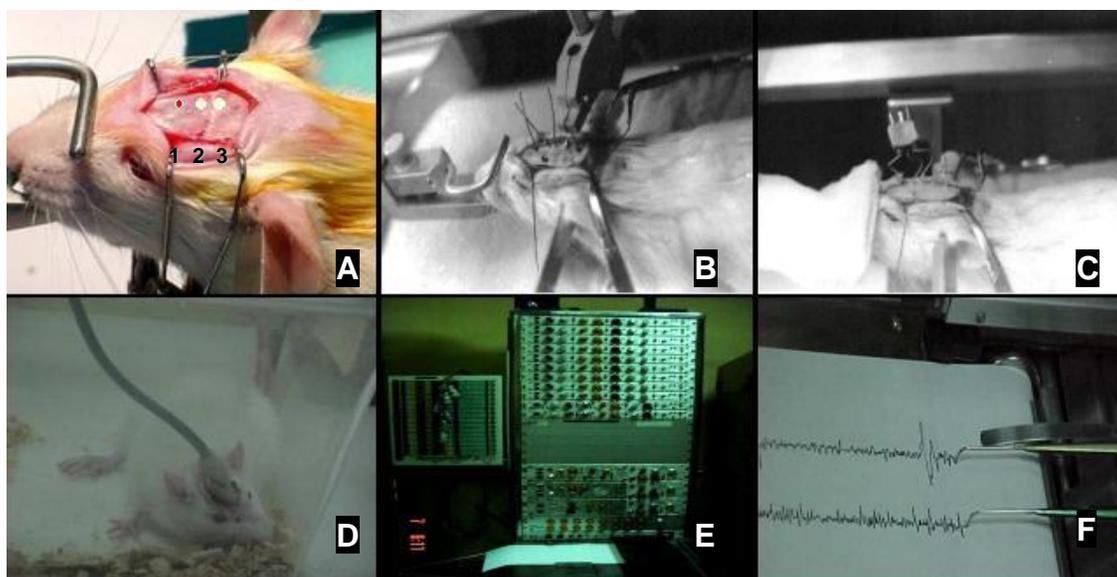


Fig. 2 Implantación de electrodos corticales y registro de actividad electrográfica. **A.** Sitios de implantación de electrodos corticales (1, tierra; 2, positivo; 3, negativo), proyectados a la corteza motora del animal; **B.** Electrodos de acero inoxidable implantados; **C.** Colocación de conector “hembra” y fijación del mismo con acrílico dental; **D.** Rata en caja de observación conectada al sistema poligráfico. **E.** Polígrafo Grass 78D, calibrado para registro electrográfico; **F.** Registro electrográfico sobre papel.

Para el registro de cada dosis del *kindling*, los animales se colocaron individualmente, en cajas de observación de acrílico transparente de 30 X 30 X 30 cm, se conectaron a un polígrafo Grass 78D mediante un cable aislado y se registró la actividad eléctrica basal, con una sensibilidad de entre 15 y 50 mV y una velocidad del papel de 10 mm/seg, en los animales despiertos y en libre movimiento durante 3.5 minutos (registro basal, control). Posteriormente, se inyectó la dosis de PTZ correspondiente, según el número de aplicación de PTZ (k1-k12) y se continuó el registro durante otros 20 minutos. Esta técnica ha sido estandarizada por nuestro grupo.

Obtención de cerebros y procesamiento para análisis posteriores. Una vez inducida la CTCG, se inyectaron las ratas con una sobredosis IP de pentobarbital y se extrajeron sus cerebros previa perfusión secuencial con un solución al 0.1% de PBS/heparina (1000 UI/ml) y formol al 10%, para análisis histológico y estudios de imagen por resonancia magnética, RM; o sin profundir para determinación de colágena.

Análisis histológico. Previa inclusión en parafina de los cerebros, se realizaron cortes de 5 μ m de espesor, que incluían la amígdala lesionada y la amígdala contralateral normal, que se tiñeron con las técnicas convencionales de hematoxilina y eosina (HE) y tricrómico de Masson (TM).

Imagen por resonancia magnética: Adicionalmente se realizó en 2 ratas de cada grupo una secuencia básica de T1 en una sonda para muñeca para documentar la localización de la lesión.

Determinación de colágena. Se utilizaron los cerebros frescos de los animales, una vez extraídos fueron resecados el tallo y cerebelo, al igual que los bulbos olfatorios, el resto del encéfalo se pesó y homogenizó con 2 ml de HCl 6N por gramo de tejido. El tejido homogenizado se transfirió a una ampolleta de vidrio y fue sellada con mechero. Posteriormente, se completó la hidrólisis de la muestra a 100-120°C durante 24hrs. Se procedió a romper las ampolletas para permitir el secado de las muestras. El material adherido a la ampolleta fue resuspendido con 2 ml de una solución amortiguadora de ácido cítrico y acetato de sodio pH 6. La muestra fue transferida a tubos de ensaye graduados, donde fueron neutralizadas hasta alcanzar un pH de 6.5-7.5, utilizando NaOH 12N ó saturado. y se anotó el volumen final. Se trabajo con 2 ml de la muestra neutralizada en un tubo de vidrio con tapa de rosca, al cual se le agregó 1ml de cloramina T y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente

se agregó 0.5 ml de una solución de tiosulfato de sodio 2M, y se agitó en vórtex, luego fue agregado 1 ml de NaOH 1N y agitado en vortex. La solución se saturó con 2 gr. NaCl y fue nuevamente agitada en vortex durante 2 min exactos, con una velocidad constante. A continuación se realizaron dos extracciones consecutivas con tolueno, agregando 6 ml, agitando en el vortex por 30 segundos y retirando el sobrenadante. Una vez realizada la segunda extracción, los tubos se hirvieron durante 30 minutos y fueron enfriados con agua corriente, para finalmente realizar una tercera extracción con 3 ml de tolueno, de la cual se obtuvo 1 ml del sobrenadante conteniendo la hidroxiprolina, que se hizo reaccionar con 4 ml de reactivo de Erlich, previamente preparado. Se agitó la solución vigorosamente en vortex y se dejó reposar por 30 minutos, para realizar por último la lectura de las densidades ópticas de cada tubo en el espectrofotómetro, en cubeta de cuarzo, a 560.

Los valores obtenidos fueron extrapolados a una curva tipo que se preparo a partir de una solución estándar de hidroxiprolina (1 µg/ml), con los volúmenes mencionados en la Tabla 1.

Tubos	Sol STD	[Hidroxiprolina]	Agua destilada
Blanco	-----	0 µg	2.0 ml
1 – 2	200 µl	2 µg	1.8 ml
3 – 4	400 µl	4 µg	1.6 ml
5 – 6	600 µl	6 µg	1.4 ml
7 – 8	800 µl	8 µg	1.2 ml
9 – 10	1000 µl	10 µg	1 ml

Tabla 1. Volúmenes y concentraciones de la curva tipo utilizada en la cuantificación de hidroxiprolina.

Análisis estadístico. Se analizaron los resultados para determinar la significancia estadística mediante ANOVA para comparaciones entre grupos y *t* de Student para comparaciones de medias entre dos grupos, con el programa SPSS versión 17.0.

RESULTADOS

Inducción de granuloma

La inyección estereotáctica de 20µg de kaolin produjo la formación de un granuloma a nivel de la amígdala, como fue posible corroborar con estudios histológicos y de imagen (Figuras 3 y 4).

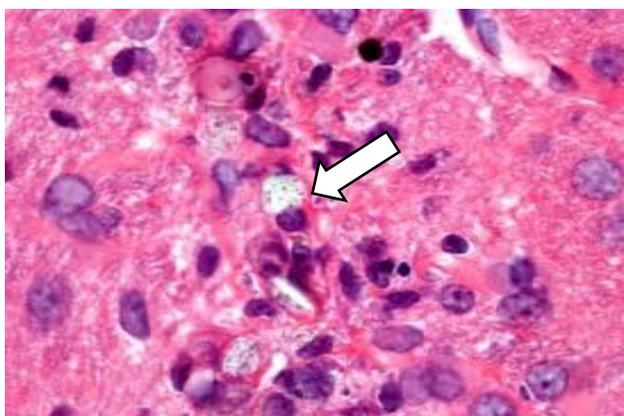


Figura 3. *Granuloma* en el núcleo basolateral de la amígdala cerebral derecha. Imagen microscópica con tinción de HE, 100x, que demuestra el acúmulo de la sal en células fagocíticas.

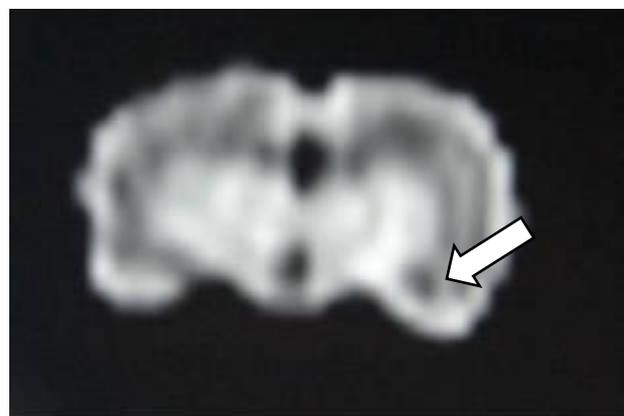


Figura 4. *Ganuloma* en el núcleo basolateral de la amígdala cerebral derecha, realizado mediante IMR para demostrar la localización

Kindling químico

De entre los grupos evaluados se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los animales tratados con talidomida y metilprednisolona, en el análisis de las variables conductuales observadas y de la actividad eléctrica registrada en los animales implantados con electrodos de corticales (Tabla 2).

Efecto del tratamiento inmunomodulador en respuesta a la epilepsia inducida con PTZ.

No se encontró en ninguno de los grupos diferencias estadísticamente significativas en relación a la dosis de PTZ inductora de la primera mioclonía. Las ratas tratadas con ciclosporina mostraron una evolución más rápida al *kindling* evidenciada por menores

dosis y latencias requeridas para la presentación de ambas PM y CTCG, respecto a los controles, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2).

	Vehículo	Col	Cs	MP	Tali
Latencia para PM	2.2 ± 0.2	2.5 ± 1.3	1.46 ± 0.1	2.4 ± 0.3	4.0 ± 1.0 *
Dosis para PM	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0
Duración de la PM	2.2 ± 0.3	3.0 ± 0.3	4.0 ± 1.5	3.2 ± 0.7	2.9 ± 0.8
Latencia para CTCG	107.9 ± 5.2	126.3 ± 6.5	106.2 ± 9.8	144.0 ± 14.0 *	156.0 ± 15.2 **
Dosis para CTCG	164.8 ± 12.2	207.0 ± 16.0	164.0 ± 21.5	256.0 ± 33.3 *	290.0 ± 45.1 **
Duración de CTCG	110.2 ± 18.1	19.0 ± 3.5	64.7 ± 40.0	51 ± 14	64.3 ± 13.2
Número de postdescargas en K1	30 ± 5	38 ± 10	50 ± 30	45 ± 14	10 ± 5

Tabla 2. Tiempos de latencia para PM y CTCG; dosis de PTZ inductora de PM y CTCG y números de postdescargas encontrados en los animales observados y con registro de la actividad eléctrica cerebral. Existieron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con talidomida y metilprednisolona. Los animales tratados con ciclosporina mostraron menor tolerancia al proconvulsivante y una mayor facilidad para el fenómeno de *kindling*, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (*p < 0.05; **p < 0.01)

Para el desarrollo de la primera mioclonía la latencia en el grupo control fue de 2.19 minutos frente a 3.97 min en el grupo de talidomida (p < 0.01) (Figura 5). La dosis acumulada requerida para el desarrollo de crisis convulsivas tónico clónico generalizadas fue de 164.8 mg de pentilinetetrazol en el grupo control, de 255 mg el

grupo que recibió tratamiento con metilprednisolona ($p < 0.01$) y de 290 mg las ratas que recibieron talidomida ($p < 0.01$) (Figura 6). La latencia acumulada para la presentación de la primera crisis convulsiva tónico clónico generalizada fue de 107.85 minutos en el grupo de ratas control, de 143.94 minutos el grupo que recibió metilprednisolona y de 155.92 minutos el grupo de talidomida ($p \pm 0.04$ y 0.02 respectivamente) (Fig 7).

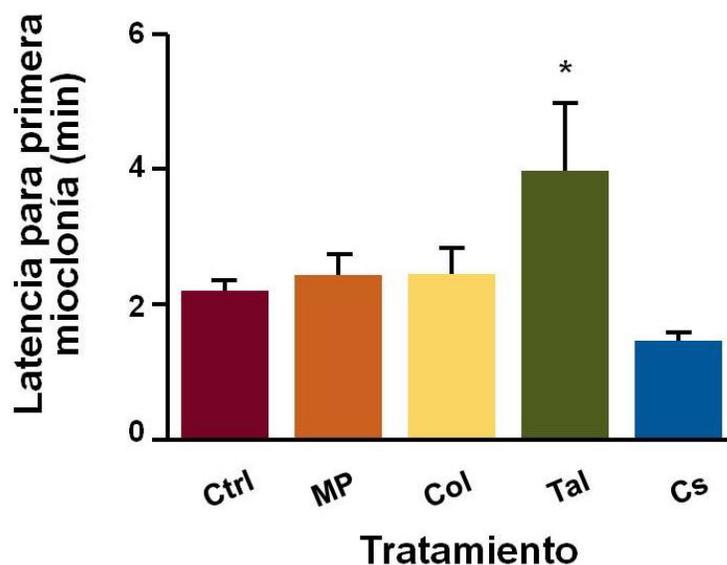


Figura 5. Tiempo de latencia transcurrido desde la aplicación del proconvulsivante hasta la aparición de la PM (* $p < 0.05$)

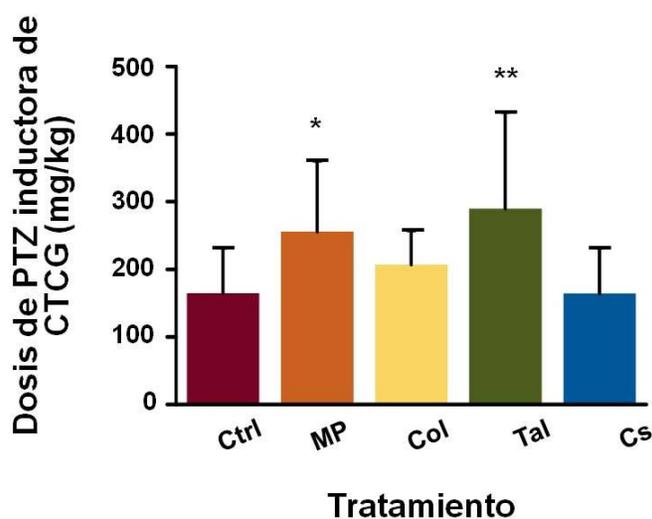


Figura 6. Dosis de PTZ necesaria para inducir la primera CTG (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

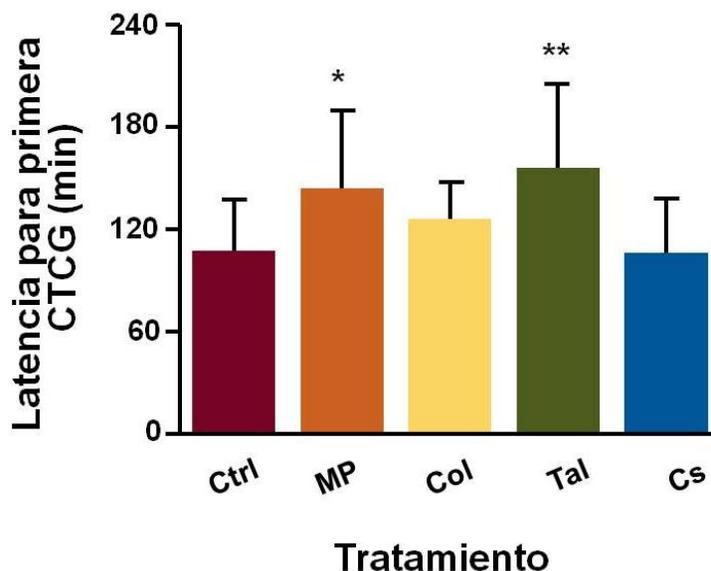


Figura 7. Tiempo de latencia requerido para presentación de la primera CTGG (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Efecto del tratamiento en el registro EEG durante la epilepsia inducida con PTZ.

El EEG se mantuvo sin actividad paroxística en el registro basal en todas las ratas. Las ratas tratadas con colchicina registraron una importante disminución en la duración de la primera CCTG ($19,0 \pm 3,5$) mientras que las ratas tratadas con vehículo mostraron convulsiones generalizada de mayor duración ($110,2 \pm 18,1$), pero no se existió una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,07$). Al igual que en los parámetros de conductuales, la tolerancia de las ratas tratadas con ciclosporina fue más pobre respecto a las ratas control. Las ratas tratadas con ciclosporina presentaron 50 ± 30 postdescargas en el K1, mientras que las ratas tratadas con vehículo tuvieron 30 ± 5 . La duración de la PM fue mayor en las ratas tratadas con ciclosporina en comparación con el grupo control, pero sin que pudieran encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($4,0 \pm 1,5$ y $2,2 \pm 0,3$ min, respectivamente).

Las ratas tratadas con talidomida mostraron en la primera etapa del *kindling* una diferencia estadísticamente significativa en el número postdescargas en comparación con el grupo control ($24,9 \pm 11,1$ y $9,3 \pm 7,4$ respectivamente, $p < 0,01$, t de Student) (Tabla 3).

	Control (Media \pm DS)	Talidomida (Media \pm DS)
-Latencia de la PM ¹	2.31 \pm 1.02	3.98 \pm 3.04*
-Duración de la PM	2.81 \pm 2.11	2.90 \pm 1.42
-Postdescargas en dosis inductora de PM	24.89 \pm 11.15	9.33 \pm 7.37**
-Dosis Acumulada para presentación de CTCG ²	165 \pm 67	290 \pm 142*
-Latencia de la primera CTCG	3.19 \pm 3.60	3.92 \pm 2.09
-Duración de la CTCG	110 \pm 54	64 \pm 23

Tabla 3. Análisis de variables en la epilepsia inducida con PTZ en ratas con granuloma amigdalino tratadas con Tali o vehículo. ¹PM, Primera mioclonía; ²CTCG, Crisis tónico-clónico generalizada; * p < 0.05, *t Student*; ** p, 0.01, *t Student*.

El análisis de la morfología de la actividad eléctrica de una rata representativa, permitió observar una mayor complejidad en las postdescargas encontradas en los animales tratados con vehículo y una menor facilitación eléctrica en los animales tratados con Tali, en función de la cantidad de postdescargas características de las Fases III y IV que los animales eran capaces de resistir antes de presentar la primera CTCG, siendo esta de mayor voltaje y frecuencia (ondas/seg) en los animales control, aunque no se realizaron pruebas estadísticas para valorar dichas apreciaciones. (Figs. 8 y 9).

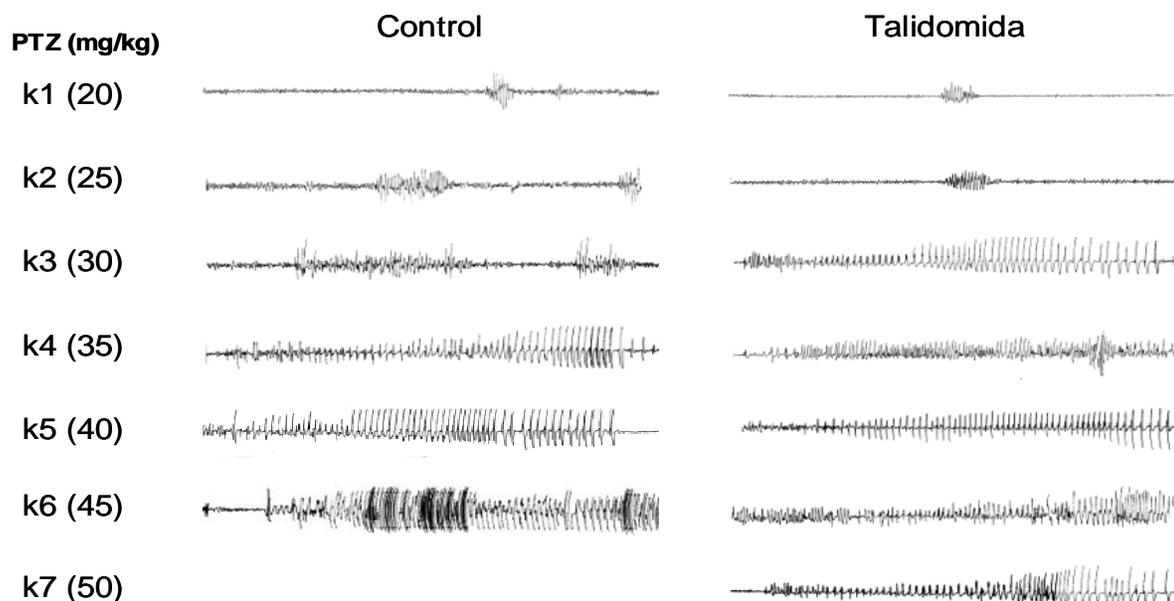


Figura 8. Registro electrográfico en las diferentes aplicaciones de dosis subumbales crecientes de PTZ (k1-k7) en ratas con granuloma amigdalino. Mayor complejidad aparente de la actividad eléctrica en los animales tratados con vehículo (control) que en los animales que recibieron Tali.

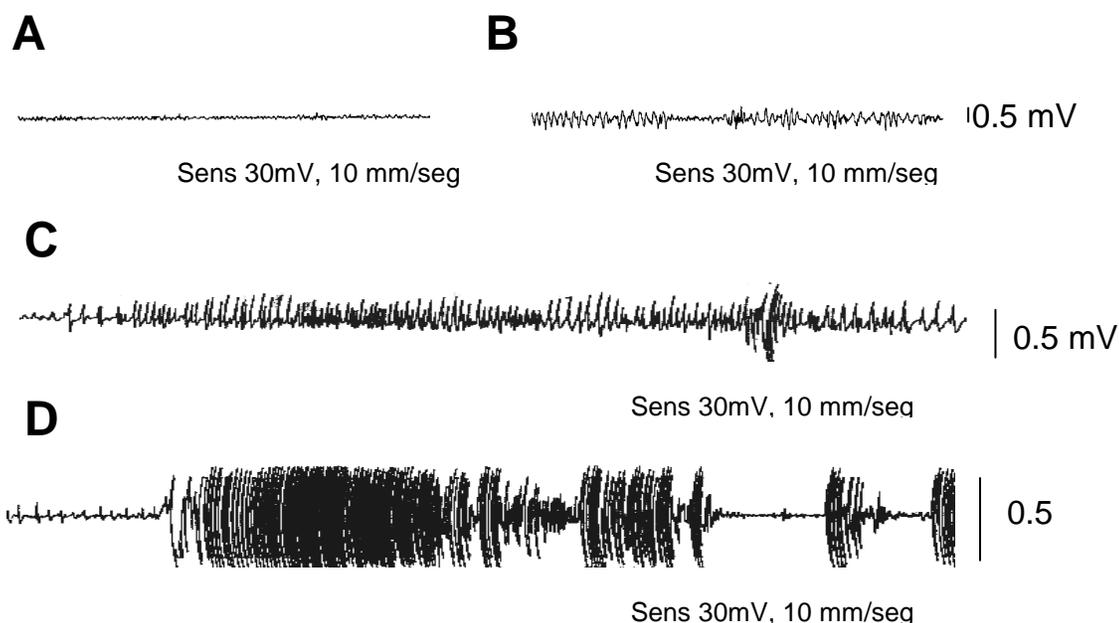


Fig 9. Actividad eléctrica representativa de ratas con granuloma en amígdala cerebral, tratadas crónicamente (45 días) con: **A, B** y **C**, talidomida (160 mg/kg); o **D**, vehículo (aceite). **A**, registro basal previo a la aplicación del PTZ (K6). **B**, Registro post-PTZ (K6) demostrando la presencia de ondas lentas de bajo voltaje parecida al sueño, que no constituían una postdescarga real; **C**, actividad eléctrica registrada durante la presentación de una crisis tónico-clónico generalizada; **D**, registro durante CTCG de rata control, donde se aprecian ondas de mayor intensidad en voltaje y frecuencia que en los animales tratados con talidomida.

Análisis histológico

La apariencia microscópica de la lesión en el grupo de ratas tratadas con Tali se caracterizó por un entramado de colágena menos denso que el encontrado en los otros grupos de ratas (Fig. 10).

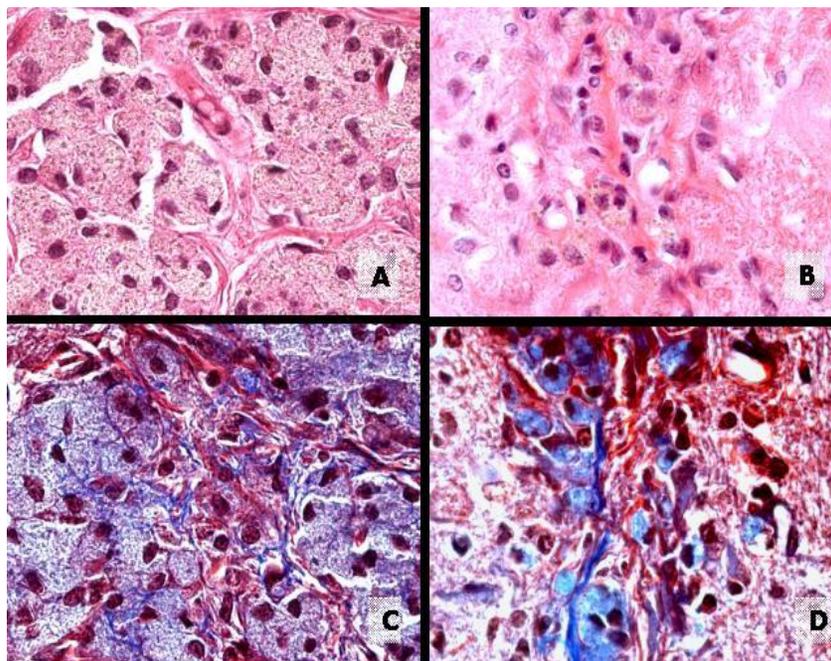
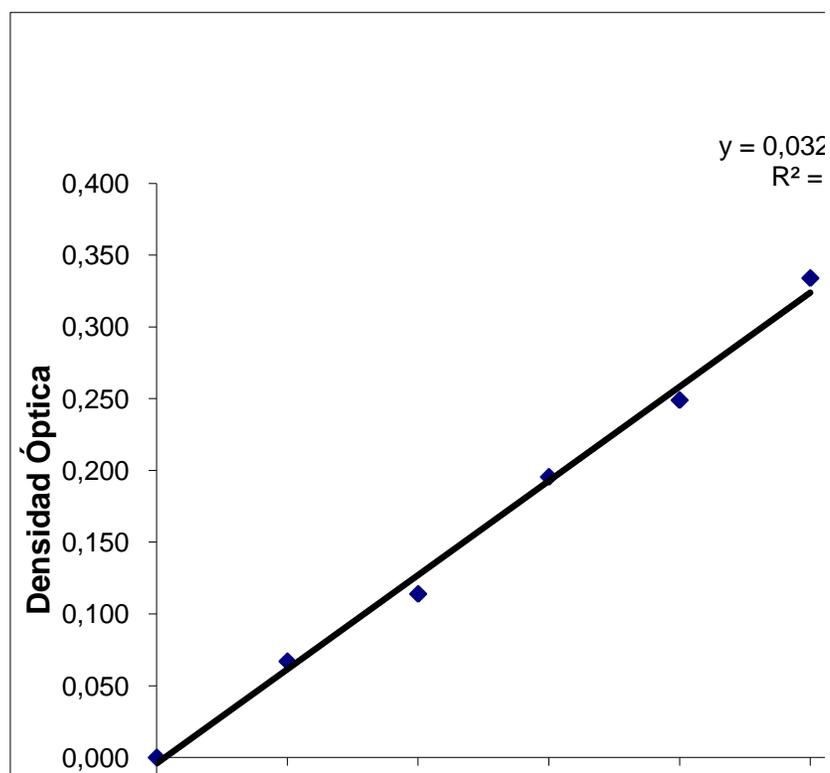


Figura 10. Microfotografía del granuloma amigdalino en cerebro de rata Wistar. **Mitad izquierda**, lesión granulomatosa en ratas administradas con vehículo (control). **Mitad derecha**, lesión granulomatosa de ratas tratadas crónicamente con Tali-domida (160 mg/kg). **A y B**, tinción con hematoxilina y eosina, 100x; **C y D**, tinción con tricrómico de Masson, 100x.

Determinación de colágena

La determinación de colágena se realizó en función de la cuantificación de hidroxiprolina por gramo de tejido, mediante la ecuación de la recta en una curva tipo (Fig. 11). La cantidad de hidroxiprolina (mg de hidroxiprolina / gr de tejido) cuantificada fue significativamente menor en todos los grupos tratados (Cs, 14.65 mg/gr, $p < 0.05$; Col, 9.24 mg/gr, $p < 0.01$; MP, 6.37 mg/gr, $p < 0.001$; Tali, 14.71 mg/gr, $p < 0.05$) respecto a los controles (Ctrl, 24.93 mg/gr). que en la encontrada en los animales del grupo control (Figura 12).



TUBO	Vol. Total	[] OH-prolina	media	D.O. A	D.O. A'
B-B	2.0	0	0.000	0.000	
1-b	2.0	2	0.067	0.068	0.066
2-b	2.0	4	0.114	0.120	0.108
3-b	2.0	6	0.196	0.194	0.197
4-b	2.0	8	0.249	0.250	0.248
5-b	2.0	10	0.334	0.337	0.331

Fig. 11. Curva tipo de Hidroxiprolina. Correlación $R^2 = 0.9945$; Ordenada al origen (b) = -0.0042; pendiente (m) = 0.0328.

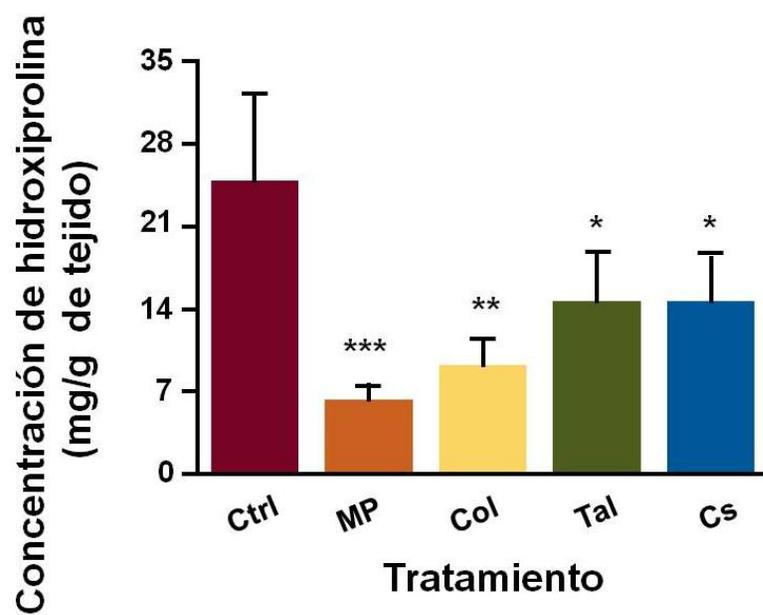


Figura 12. Concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido cerebral encontrado en los animales de los distintos grupos experimentales. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Se logró el desarrollo de un granuloma en una zona considerada epileptogénica por excelencia. Si bien la mayoría de modelos de epilepsia con PTZ se encaminan a modelar epilepsia mesial temporal, este modelo busco precipitar epilepsia en ratas con una lesión estructural previamente establecida como sucedería en pacientes con lesiones como las que han sido señaladas ampliamente. El modelo de gel de aluminio por sí sólo conlleva varios inconvenientes: la aplicación del gel es a nivel cortical es decir, extrínseco, por lo que el proceso inflamatorio sería más bien leptomeníngeo y no intrínseco como cuando existe una lesión parenquimatosa. El tiempo para desarrollar crisis es muy prolongado lo que imposibilitaría realizar las pruebas que se llevaron a cabo en este trabajo. Consideramos que este modelo puede representar bien a los numerosos pacientes con lesiones estructurales del lóbulo temporal y epilepsia de patrón parcial complejo, como aquellos con gliomas, cavernomas, hematomas subdurales, infartos y hemorragias de esta región.

Las diferencias en la dosis de PTZ requerida para la presentación de la primera mioclonía responden al efecto del tratamiento crónico con los fármacos utilizados, sin embargo debe considerarse la existencia de resistencia genética, tal y como ha sido documentado por otros autores en ensayos genéticos realizados en animales (Racine y col., 2003; Racine, Steingart y McIntyre, 1999) y humanos (Sutula, 2004; Borivoj y col., 2003).

El resultado en el análisis del número de postdescargas refleja que ambos tratamientos (Tali y Cs) poseen un efecto modulador sobre la funcionalidad del tejido cerebral perilesional, logrando en el caso de la primera la preservación del mismo, mientras que para la segunda, se evidencó una notoria disminución al armaco como ha sido ya reportado por otros autores (Franks, 2004; Ruiz y col., 2000; LaDuca y Gaspari, 2002).

La Cs ha demostrado tener efecto anticonvulsivante en ratas con crisis convulsivas inducidas con PTZ cuando se administra en modelos de neuroprotección aguda (Homayoun, 2002). Sin embargo, la administración crónica de este fármaco y la inducción de crisis en nuestro modelo, permite tener la seguridad de que no existían metabolitos farmacológicamente activos durante el *kindling*, y arrojó resultados aparentemente deletéreos en la función eléctrica de este grupo de animales.. Se

deberán diseñar ensayos posteriores para discernir los mecanismos implicados en esta acción sinérgica. La talidomida produjo un efecto neuroprotecto global en los estos animales. Los mecanismos que dieron origen a este efecto, deberán ser escudriñados cuidadosamente, pero las acciones inmunomoduladoras de este fármaco sobre la respuesta inflamatoria granulomatosa parecen limitar los daños estructurales, repercutiendo sobre la funcionalidad de tejido, produciendo un retardo la propagación de la actividad neuronal excesiva y disminuyendo su intensidad; efectos seguramente vinculados a la propiedad farmacológica de este compuesto para inhibir la actividad del TNF- α (Franks y col., 2004). Será necesario diseñar ensayos para evaluar la expresión de este y otros mediadores.

Todos los fármacos disminuyeron la cantidad de hidroxiprolina en el tejido cerebral con respecto a los animales control, es necesario todavía confrontar nuestros hallazgos con otros reportes, sin embargo, la mayor parte de los trabajos sobre fibrosis en ratas, se dirigen hacia patologías de hígado y riñón, y la información existente sobre fibrosis cerebral en ratas es escasa. Los niveles de hidroxiprolina encontrados en nuestro grupo de animales no operados, corresponden a los reportados en un gramo de tejido esplénico normal de rata (Woessner, 1961).

No existen reportes previos sobre los efectos funcionales que nosotros observamos, pero numerosos grupos de trabajo han estudiado los cambios estructurales que siguen a un proceso inflamatorio cerebral y las repercusiones que tales cambios pueden tener en la funcionalidad (Dam, 1992; Golarai y col., 2001; Santhakumar y col., 2001; Mathes, Oommen y Francel, 2001).

CONCLUSIONES

La *colchicina* posee un efecto antifibrótico en el cerebro de ratas con un granuloma experimental y parece preservar la funcionalidad del tejido neural perilesional; sin embargo deberán investigarse las dosis y momentos en que el fármaco posea un mejor efecto.

La *metilprednisolona* posee efecto antifibrótico y parece tener alguna repercusión en la preservación funcional del tejido cerebral viable.

La *ciclosporina-A* parece facilitar la excitabilidad del tejido que rodea una lesión granulomatosa y preservarlo sólo en combinación con metilprednisolona.

La *talidomida* parece disminuir el depósito de fibras de colágena y preservar el tejido funcional cerebral que rodea a una lesión granulomatosa, por lo que podría ser una alternativa promisoría para la prevención de epilepsia secundaria. El análisis inmunohistológico de mediadores y de proteínas de matriz en la lesión y la confirmación de la reproducibilidad de nuestros resultados es inminente. Es fundamental enfocar el trabajo hacia otras variables fundamentales en el proceso de epileptogénesis como la actividad astrocítica y microglial y las efectos de citocinas y otros mediadores, sobre receptores, canales iónicos de membrana y el efecto de todo ello sobre la acción de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal del tejido que rodea a la lesión. Además del efecto inmunomodulador descrito, la talidomida podría tener efecto sobre la actividad eléctrica, lo cual explicaría el aumento de la latencia para el desarrollo de la 1ª. TCG, pero este efecto deberá aún ser analizado. Otros grupos de nuestro centro han probado ya la utilidad del control de las crisis inducidas con PTZ con talidomida como antiepiléptico (Palencia, 2007)

Los resultados de este trabajo evidencian la utilidad de la metilprednisolona y la talidomida fundamentalmente, como agentes anti-inflamatorios y reguladores de la estructura anatómica de una lesión experimental en el cerebro y podrían ser potencialmente útiles para prevenir el desarrollo de epilepsia secundaria a infecciones, tumores o accidentes cerebrovasculares en el humano. El efecto anticósmico de la talidomida, ya está siendo evaluado en humanos, aunque falta aún encontrar la vía metabólica de este efecto, por lo que este trabajo servirá de base para continuar con el estudio del efecto de este fármaco como tratamiento de la epilepsia.

REFERENCIAS

Adams B, Von Ling E, Vaccarella L, Ivy GO, Fahnstock M, Racine J. Time course for kindling-induced changes in the hilar area of the dentate gyrus: reactive gliosis as a potential mechanism. *Brain Res.* 1998 Sep 7;804(2):331-6.

Aguirre-Cruz L, Calvillo M, Sotelo J. Colchicine, like methylprednisolone, decreases the perilesional fibrosis secondary to a chronic brain granuloma in cats. *Exp Mol Pathol* 1998;65(1):9-14

Aguirre-Cruz L y Sotelo J. El sistema neuroinmunoendocrino. Editor Patrocinio de Serono de México SA de CV. Primera Edición, Dpto. de Publicaciones Científicas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Alessandri B, Rice A, Levasseur J, DeFord M, Hamm RJ, Bullock MR. Cyclosporin-A improves brain tissue oxygen consumption and learning/memory performance after lateral fluid percussion injury in rats. *J Neurotrauma* 2002; 19(7):829-41.

Al-Fayyad M, Alali F, Alkofahi A, Tell A. Determination of colchicine content in *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum* under cultivation. *Nat Prod Lett.* 2002;16(6):395-400.

Annegers J, Hauser W, Beghi E, Nicolosi A, Kurland LT. The risk of unprovoked seizures after encephalitis and meningitis *Neurology.* 1988 Sep;38(9):1407-10.

Annegers J, Coan S. The risks of epilepsy after traumatic brain injury. *Seizure.* 2000 Oct;9(7):453-7.

Annegers J, Hauser W, Coan S, Rocca W. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med.* 1998 Jan 1;338(1):20-4.

Ates O, Ondul S, Onal C, Buyukkiraz M, Somay H, Cayli S, Gogusgeren M, Orakdogan M, Kocak A, Yologlu S, Berkman Z Tevruz M. Post-traumatic early epilepsy in pediatric age group with emphasis on influential factors. *Childs Nerv Syst* 2005.

Avramut M, Achim CL. Immunophilins in nervous system degeneration and regeneration. *Curr Top Med Chem* 2003;3(12):1376-82.

Becker A, Grecksch G, Thiemann W, Hollt V. Pentylentetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens of rats. *Pharmacol, Biochem Behav* 1999; 2:425-8.

Bedossa, P. The cellular origin of extracellular matrix constituents. *J Hepatol* 1993;19:1-3.

Benveniste E. Cytokine Expression in the Nervous System. En: *Immunology of the Nervous System* (Keane R y Hickey W Eds.). New York, 1997, 419-459.

Begley CE, Famulari M, Annegers JF, Lairson DR, Reynolds TF, Coan S, Dubinsky S, Newmark ME, Leibson C, So EL, Rocca WA. The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. *Epilepsia*. 2000 Mar;41(3):342-51.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10432-7.

Bernal J, Duran M, Londono F, Umana A. Cellular immune effects of thalidomide in actinic prurigo. *Int J Dermatol* 1992; 31(8):599-600.

Bladin CF, Alexandrov AV, Bellavance A, Bornstein N, Chambers B, Coté R, Lebrun L, Pirisi A, Norris JW. Seizures after stroke: a prospective multicenter study. *Arch Neurol*. 2000 Nov;57(11):1617-22.

Blobe G, Schiemann W, Lodish H, Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease, *N Engl J Med* 2000, 342(18):1350-8.

Booth B, Tan E, Oikarinen A, Uitto J. Steroid-induced dermal atrophy: effects of glucocorticosteroids on collagen metabolism in human skin fibroblast cultures. *Int J Dermatol* 1982; 21(6):333-7

Border W, Noble N., Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; Nov 10; 331(19):1286-1292.

Borivoj D. Marjanovic, Ljubomir M. Stojanov, Dragan S. Zdravkovic, Ruzica M. Kravljjanac and Maja S. Djordjevic Rasmussen syndrome and long-term response to thalidomide. *Pediatr Neurol* 2003; 29(2):151-156

Brown J, Timpl R. The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107(4):484-90.

Buki A, Okonkwo D, Povlishock J., Postinjury cyclosporin-A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1999;16(6):511-21.

Calvillo M, Paz C, Sotelo J. A chronic granuloma in brain amygdala modifies the pattern of contralateral kindled seizures. *Neurosci Res Commun* 1996; 18(3):169-174.

- Cavazos** J, Sutula T. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res*. 1990 Sep 10;527(1):1-6.
- Caveness** W, Walker A, Ascroft P. Incidence of posttraumatic epilepsy in Korean veterans as compared with those from World War I and World War II. *J Neurosurg*. 1962 Feb;19:122-9.
- Chang** B, Lowenstein D. Epilepsy. *N Engl J Med*. 2003 Sep 25;349(13):1257-66
- Chappey** O, Niel E, Dervichian M, Wautier J, Scherrmann J, Cattan D. Colchicine concentration in leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:87-9.
- Choi** J, Koh S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J*. 2008 Feb 29;49(1):1-18.
- Clark** M, Post RM, Weiss SR, Cain CJ, Nakajima T. Regional expression of c-fos mRNA in rat brain during the evolution of amygdala kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 1991 Aug;11(1):55-64.
- Corda** M, Orlandi M, Deiana A, Salvadori S, Giorgi O. Age-related decrease in the density of benzodiazepine recognition sites in the brain of the fresh water eel (*Anguilla anguilla*). *Neurosci Lett*. 1991 Dec 9;133(2):168-70.
- Correia** J, Lobert S. Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. *Curr Pharm Des* 2001; 7(13):1213-28.
- Cotran** R., Kumar V., Robbins S., Tissue Repair: Cellular Growth, Fibrosis, and Wound Healing; En: *Robbins, Pathologic basis of disease; Ed.* Saunders; 6a edición; 1998, 89-112.
- Cutroneo** K, Rokowski R, Counts D. Glucocorticoids and collagen synthesis: comparison of in vivo and cell culture studies. *Coll Relat Res*. 1981; 1(6):557-81.
- De Angelis** L. Brain Tumors. *N Eng J Med* 2001; 44(2):114-123.
- De Reuck** JL. Stroke-related seizures and epilepsy. *Neurol Neurochir Pol*. 2007 Mar-Apr;41(2):144-9.
- Dudek** F, Shao L. Synaptic Reorganization in an Experimental Model of Posttraumatic Epilepsy. *Epilepsy Curr* 2002; 2(6):198-199.
- Ekdahl** CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Na*

tl Acad Sci U S A. 2003 Nov 11;100(23):13632-7.

Edwards D, Murphy G, Reynolds J, Whitham S, Docherty A, Angel P, Heath J. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 1987; 6(7):1899-904

Ehrenpreis E, Kane S, Cohen L, Cohen R, Hanauer S. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999;117(6):1271-7.

Eisenscdhenk S, Gilmore R. (2001) Seizures associated with non-neurologic medical conditions. En: Wyllie E. (ed) *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*. Lippincott, Williams & Willkins. New York, pp 657-669.

Erlich H, Grislis G y Hunt T. Evidence for the involvement of microtubules in wound contraction. *Am J Surg* 1977; 133:706-709.

Engel J Jr. Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena. *Epilepsy Res Suppl.* 1992;8:9-20.

Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2001 Jun;42(6):796-803.

Engel J Jr, Schwartzkroin P. (2006) What should be modeled?. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 521-527.

Ferro J, Pinto F. Poststroke epilepsy: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs Aging.* 2004;21(10):639-53.

Flanders K, Lüdecke G, Renzing J, Hamm C, Cissel, Unsicker K. Effects of TGF- β s and bFGF on Astroglial Cell Growth and Gene Expression *in Vitro*. *Mol Cell Neurosci* 1993; 4:406-417.

Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Oct-Nov;70(2-3):291-303.

Franks M, Macpherson G, Figg W. Thalidomide. *Lancet* 2004; 363:1802-11.

Frey LC. The epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 2003;44:11-7.

- Fryszak Z** y Hrczkova Y. Colchicine in the treatment of liver cirrosis. 12 years' experience. *Vnitr Lek*, 1996; 42:17-19.
- García-González A**, Weisman M. The arthritis of familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1992; 22:139-50.
- Ghayad E** y Thome A. Behcet's disease in Lebanon: report of 100 cases. *J Med Liban* 1995; 43:2-7.
- Gilbert M**, Goodman J (2006) *Chemical kindling*. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 379-394.
- Gilbert M**, Mack C. Seizure thresholds in kindled animals are reduced by the pesticides lindane and endosulfan. *Neurotoxicol Teratol*. 1995 Mar-Apr;17(2):143-50.
- Gilroy J.**, Enfermedades Infecciosas. En: Gilroy J. *Neurología*. 3a edición. McGrawHill Interamericana. México DF, 2000; 425-498
- Gilroy J.**, Epilepsia En: Gilroy J. *Neurología*. 3a edición. McGrawHill Interamericana. México DF, 2000:85-120.
- Ginard H**, Warren G. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 2003; 83(3): 483-507.
- Goddard G**, McIntyre D, Leech C. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969 Nov;25(3):295-330.
- Golarai G**, Greenwood A, Feeney D, Connor J. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci* 2001; 21:8523-7.
- Goldfieln A.**, Adrenocorticosteroides y antagonistas adrenocorticales. En: *Katzung, farmacología básica y clínica*; 7ª edición; Manual Moderno, México DF; 1998, 737-56.
- Gordon H**, Lucera G, Salvo R, Boss J. Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair, and metabolism in murine fibroblasts. *J Immunol* 1992; 148:4021-7.
- Gorji A**, Speckmann E (2006) *Neurophysiologic and Neuropathologic Ex Vivo In Vitro Model*. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp.527-523.
- Giulioni M**, Rubboli G, Marucci G, Martinoni M, Volpi L, Michelucci R, Marliani A, Bisulli F, Tinuper P, Castana L, Sartori I, Calbucci F. Seizure outcome of epilepsy surgery in

focal epilepsies associated with temporomesial glioneuronal tumors: lesionectomy compared with tailored resection. *J Neurosurg*. 2009 Dec;111(6):1275-82.

Hauschild A, Kroeger H, Mitchison NA, Ugrinovic S, Zwingenberger K. Thalidomide therapy of established collagen-induced arthritis (CIA) not accompanied by an evident Th2 shift. *Clin Exp Immunol*. 1997; 108(3):428-31.

Hauser WA, Mohr JP. Seizures, epilepsy, and vascular malformations. *Neurology*. 2011 May 3;76(18):1540-1.

Homayoun H, Khavandgar S, Dehpour A. Anticonvulsant effects of cyclosporin A on pentylentetrazole-induced seizure and kindling: modulation by nitricoxidergic system. *Brain Res* 2002; 939:1-10

Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):153-9.

Ignotz R, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(9):4337-45

Josephson C, Leach J, Duncan R, Roberts R, Counsell C, Al-Shahi Salman R; Scottish Audit of Intracranial Vascular Malformations (SAIVMs) steering committee and collaborators. Seizure risk from cavernous or arteriovenous malformations: prospective population-based study. *Neurology* 2011 May 3;76(18):1548-54.

Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kim DW, Choi SY, Kwon OS. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*. 2006 Sep;54(4):258-71.

Katz J, Langevitz P, Shemer J, Barak S, Livneh A. Prevention of recurrent aphthous stomatitis with colchicine: an open trial. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31:459-61.

Kelso A, Cock H. Advances in epilepsy. *Br Med Bull* 2005; 72:135-48.

Kershenobich D, Rojkind M, Quiroga A, Alcocer-Varela J. Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11(2):205-9.

Koroshetz W, Swartz M, Meningitis crónica y recurrente. En: *Harrison, Principios de Medicina Interna*; Ed. McGrawHill; México DF; 1998, 2772-8.

Labar D, Harden C. (1998) Infection and inflammatory diseases. En: Engel J, Pedley TA (eds) *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, pp 2587-2596.

LaDuca J, Gaspari A. Targeting tumor necrosis factor alpha. New drugs used to modulate inflammatory diseases. *Dermatol Clin* 2001; 4:617-35.

Lerner-Natoli M. Inflammation, angiogenesis and epilepsy. *Biol Aujourd'hui*. 2011;205(1):33-41.

Liigant A, Haldre S, Oun A, Linnamägi U, Saar A, Asser T, Kaasik A. Seizure disorders in patients with brain tumors. *Eur Neurol*. 2001;45(1):46-51.

Mathews S, Oommen K, Francel P. Functional reorganization of motor cortex due to brain tumor: a case report. *J Okla State Med Assoc* 2001; 94(1):7-11.

Marcovici I, Brill A, Scommegna A. Effects of colchicine in pelvic adhesions associated with the intrauterine inoculation of *neisseria gonorrhoeae* in rabbits. *Obstetr Gynecol* 1993; 81:118-21.

Martínez-Hernández A. Reparación, regeneración y fibrosis. En: *Patología Fundamentos*. Rubin E y Harver J (Eds) Editorial Médica Panamericana, México DF, 1992, 36-51

Mares P, Kubová H. 2006. *Electric Kindling in Developing Rats*. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 371-378.

Mayne R, Brewton R. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:883-90

McIntyre D, Saari M, Pappas B. Potentiation of amygdala kindling in adult or infants rats by injections of 6-hydroxydopamine. *Exp Neurol*. 1979 Mar;63(3):527-44.

Molad Y. Update on colchicine and its mechanism of action. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 3:252-6.

Montasser M, Younis T, Fahmy I, Sabry N, el-Monayerhy M, Rashad M. Histopathological evidences for the antifibrogenic effect of colchicine in schistosomiasis mansoni in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 1994; 1:155-65.

Mori N, Wada JA, Kumashiro H. Bidirectional transfer between kindling induced either by L-glutamate or L-aspartate and electrical stimulation in rats. *Brain Res*. 1989 Sep 25;498(1):163-6.

Murray C, Lopez D. Quantifying disability: data, methods and results. *Bull World Health Organ.* 1994; 72(3): 481–494.

Ng S, Gutschow M, Weiss M, Hauschildt S, Teubert U, Hecker T, Luzzio F, Kruger E, Eger K, Figg W. Antiangiogenic activity of N-substituted and tetrafluorinated thalidomide analogues. *Cancer Res* 2003; 63(12):3189-94.

Oikarinen A, Uitto J: Molecular mechanisms of glucocorticosteroid action on connective tissue metabolism. En: *Disease of Connective Tissue: The Molecular Pathology of the Extracellular Matrix*, editado por: J Uitto, AJ Perejda, en series: *The Biochemistry of Disease: A Molecular Approach to Cell Pathology*. E Faber, HC Pitot editors de seria. Nueva York 1985, Marcel Dekker.

Okonkwo D, Melon D, Pellicane A, Mutlu L, Rubin D, Stone J, Helm G. Dose-response of cyclosporin A in attenuating traumatic axonal injury in rat. *Neuroreport* 2003; 3:463-6.

Oliver S, Cheng T, Banquerigo M, Brahn E. The effect of thalidomide and 2 analogs on collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 1998; 5:964-9.

Oliver S, Freeman S, Corral L, Ocampo C, Kaplan G. Thalidomide analogue CC1069 inhibits development of rat adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol* 1999; 118(2):315-21.

Palencia G, Calderon A, Sotelo J. Thalidomide inhibits pentylene-tetrazole-induced seizures. *J Neurol Sci.* 2007 Jul 15;258(1-2):128-31.

Panda S, Radhakrishnan V, Radhakrishnan K, Rao R, Sarma S. Electro-clinical characteristics and postoperative outcome of medically refractory tumoral temporal lobe epilepsy. *Neurol India* 2005; 53(1):66-71.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press; 1982; 1-5

Peetre C, Gullberg U, Nilsson E, Olsson I. Effects of recombinant tumor necrosis factor on proliferation and differentiation of leukemic and normal hemopoietic cells in vitro. Relationship to cell surface receptor. *J Clin Invest* 1986; 78(6):1694-700.

Peters S, McDougall J, Douglas W, Coles D, DeRemee R. Colchicine in the treatment of pulmonary fibrosis. *Chest* 1993; 103:101-104.

Poo J, Feldmann G, Moreau A, Gaudin C, Lebrec D. Early colchicine administration reduces hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. *J Hepatol* 1993; 19(1):90-4.

- Prockop** D, Kivirikko K, Tuderman L, Guzman N. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med* 1979; 301(1):13-23
- Prockop** D, Kivirikko K. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:403-34.
- Racine** R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972 Mar;32(3):281-94.
- Racine** R, Steingart M, McIntyre D. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies. *Epilepsy Res* 1999; 35(3):183-95.
- Racine** R, Steingart M, Bureau Y, McIntyre D. Differential sensitivity of genetically Fast vs. Slow kindling rats strains to GABAergic convulsive agents. *Neuropharmacol.* 2003; 45(7):918-24
- Ravizza** T, Balosso S, Vezzani A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett.* 2011 Jun 27;497(3):223-30.
- Riess** P, Bareyre FM, Saatman KE, Cheney JA, Lifshitz J, Raghupathi R, Grady MS, Neugebauer E, McIntosh TK. Effects of chronic, post-injury Cyclosporin A administration on motor and sensorimotor function following severe, experimental traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2001;18(1):1-8.
- Rubio** F. Evolución conceptual de la epilepsia. En: *SAM Epilepsia*, Intersistemas Ed, México D. F., 2001.
- Ruiz** F, Alvarez G, Ramos M, Hernandez M, Bogonez E, Satrustegui J. Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *Eur J Pharmacol* 2000; 404(1-2):29-39
- Sabatini** DM, Lai M, Snyder S. Neural roles of immunophilins and their ligands. *Mol Neurobiol* 1997;15(2):223-39.
- Salai** M, Segal E, Cohen I, Dudkiewicz I. The inhibitory effects of colchicine on cell proliferation and mineralisation in culture. *Bone Joint Surg Br* 2001; 83(6):912-6.
- Salanova** V, Andermann F, Rasmussen T, Olivier A, Quesney L. Tumoral parietal lobe epilepsy. Clinical manifestations and outcome in 34 patients treated between 1934 and 1988. *Brain* 1995; 118 (Pt 5):1289-304.
- Samoriski** G, Piekut D, Applegate C. Regional analysis of the spatial patterns of Fos induction in brain following flurothyl kindling. *Neuroscience.* 1998 Jun;84(4):1209-22.

- Sampaio E**, Sarno E, Galilly R, Cohn Z, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173(3):699-703.
- Santhakumar V**, Ratzliff A, Jeng J, Toth Z, Soltesz I. Long-term hyperexcitability in the hippocampus after experimental head trauma. *Ann Neurol* 2001;50:708-17.
- Sheld WM.**, En Harrison T.R.(ed), *Principios de Medicina Interna*, 1998, Meningitis bacteriana, absceso cerebral y otras infecciones intracraneales supurativas, McGraw-Hill, México DF, 2755-72.
- Sheskin J**. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1965 May-Jun;40:303-6.
- Schwartzkroin PA**. Origins of the epileptic state. *Epilepsia.* 1997 Aug;38(8):853-8.
- Sloviter RS**. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1994:35-640.
- Smith JG**, Wehr RF, Chalker DK. Corticosteroid-induced cutaneous atrophy and telangiectasia. Experimental production associated with weight loss in rats. *Arch Dermatol.* 1976 Aug;112(8):1115-1117.
- Sobh M**, Moustafa F, Hamed S y Ghoneim M. Effect of colchicine on schistosoma-induced renal amyloidosis in Syrian hamsters. *Nephron*, 1995;70:478-485.
- Solbrig MV**, Koob GF. Epilepsy, CNS viral injury and dynorphin. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Feb;25(2):98-104.
- Stevanovic DV**. Corticosteroid-induced atrophy of the skin with telangiectasia. A clinical and experimental study. *Br J Dermatol.* 1972 Dec;87(6):548-56.
- Stringer L** (2006) Models Available for infection-Induced Seizures. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds) Models of seizures and epilepsy, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 521-527.
- Sutula T**, Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development . *Epilepsy Res* 60 (2004) 161–171.
- Temkin N**. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia.* 2009 Feb;50 Suppl 2:10-3
- Tian G**, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 2005 Sep;11(9):973-81.

Tian A, Edwards M, Williams N, Olson D. Epilepsy surgery following brain tumor resection in children. *J Neurosurg Pediatr.* 2011 Mar;7(3):229-34.

Thapa A, Chandra S, Sinha S, Sreenivas V, Sharma B, Tripathi M. Post-traumatic seizures-A prospective study from a tertiary level trauma center in a developing country. *Seizure.* 2010 May;19(4):211-6.

Theodors A, Askari AD, Wieland RG, Colchicine in the treatment of Paget disease of bone: a new therapeutic approach. *Clin Ther* 1981;3:365-73.

Udina E, Navarro X. Immunophilins: neuroprotective agents and promoters of neural regeneration, *Neurologia.* 2002 Apr;17(4):200-13.

van der Rest M, Garrone R., Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991 Oct;5(13):2814-2823.

Vázquez V y Sotelo J. The course of seizures after treatment for rat cisticercosis. *N Engl J Med.* 1992, 327: 696-700.

Vercueil L. Seizure and epilepsy after stroke *Presse Med.* 2007 Jan;36(1 Pt 2):176-81.

Viviani B, Gardoni F, Marinovich M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:247-63.

von Bohlen und Halbach O, Schulze K, Albrecht D. Amygdala-kindling induces alterations in neuronal density and in density of degenerated fibers. *Hippocampus.* 2004;14(3):311-8.

Vuorio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:837-72

WHO. The World Health Report 2002: mental health, new understanding newhope. Geneva: World Health Organization, 2002.

Wieser H; ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2004 Jun;45(6):695-714.

Woessner JF, The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961;93, 440-447.

Xiao B, Huang,Z, Zhang H, Liu Y, Yuan X Zhang N, Li J, Wang X, ZhouD, Liao W, Wang , Sun B. Aetiology of epilepsy in surgically treated patients in China. *Seizure* 2004; 13 (5):322-327.

Zhang L, Zhu Y, Luo W y Yan Y. The protective effect of colchicine on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats *Chin Med Sci J*, 1992;7:58-60.