



**"PARTICIPACIÓN DE CATECOLAMINAS Y
GLUTAMATO EN UN MODELO DE INDUCCIÓN DE
CRISIS CONVULSIVAS CON 4-AMINOPIRIDINA"**

**POR
SILVIA JOSEFINA LOPEZ PEREZ**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
(ÁREA DE NEUROBIOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
1999**

*184733/021258
P340
2/2*



PARTICIPACION DE CATECOLAMINAS Y GLUTAMATO EN UN MODELO DE INDUCCION DE CRISIS CONVULSIVAS CON 4-AMINOPIRIDINA

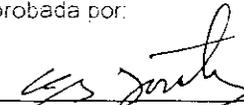
Por

SILVIA JOSEFINA LOPEZ PEREZ
Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE NEUROBIOLOGÍA)

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
1999

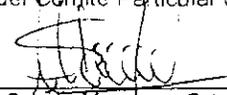
Aprobada por:


Dr. en C. Carlos Beas Zárate
Asesor del Comité Particular del estudiante

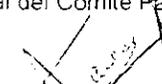
11 Feb - 1999
Fecha


Dr. en C. Ricardo Tapia Janguengoitia
Asesor del Comité Particular del estudiante

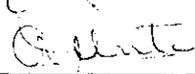
26/1/99
Fecha


M. en C. Sergio Meneses Ortega
Sinodal del Comité Particular del estudiante

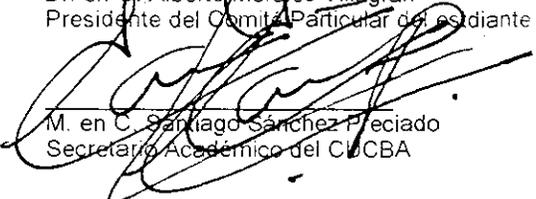
15/FEB/99
Fecha


M. en C. Alicia Navarro
Sinodal del Comité Particular del estudiante

15/02/99
Fecha


Dr. en C. Alberto Morales Villagrán
Presidente del Comité Particular del estudiante

25/1/99
Fecha


M. en C. Santiago Sánchez Pinedo
Secretario Académico del CUCBA

15/1/99
Fecha

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE NEUROBIOLOGIA DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, Y EN LAS INSTALACIONES DEL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO, CON FINANCIAMIENTO PARCIAL OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, MEDIANTE LA APROBACION DEL PROYECTO No. 1690P-M9507.

RESUMEN.

La epilepsia es una de las alteraciones neurológicas más comunes en la especie humana, y es causada por un desbalance entre los sistemas de neurotransmisión excitadores e inhibidores, a favor de los primeros. Se ha propuesto que en el fenómeno epiléptico participan varios neurotransmisores, dependiendo del tipo particular de crisis que se considere. En este trabajo, se utilizó un modelo de crisis tónico-clónico generalizadas para estudiar la participación de los aminoácidos excitadores y de las catecolaminas durante el inicio de las crisis inducidas con 4-aminopiridina en la corteza motora derecha, y durante la propagación de la hiperexcitabilidad a la corteza motora contralateral. Se utilizaron ratas Wistar, a las cuales se les implantaron un par de sondas para microdiálisis que llevaban adheridos electrodos bipolares. Tanto las sondas como los electrodos se conectaron a una torre de diálisis diseñada especialmente, que permite monitorear las concentraciones extracelulares de neurotransmisores y obtener el registro EEG de manera simultánea. En la zona de infusión (corteza motora derecha) se observaron incrementos en las concentraciones de Glu (4 veces con respecto a su basal), de NE (2.4 veces con respecto a su basal), VMA (1 vez con respecto a su basal) y DA (15 veces con respecto a su basal), todos durante los primeros 15 minutos de infusión de la droga. En la corteza contralateral (izquierda) también se observaron incrementos de los mismos compuestos, entre 60 y 75 minutos después del inicio de la infusión de 4-AP. El registro EEG de la corteza de infusión presentó características de hiperexcitabilidad que iniciaron durante los primeros 15 minutos de infusión, mientras que en la corteza contralateral éstas características se presentaron 30 min. después aproximadamente. Probablemente el exceso de glutamato y catecolaminas en el tejido cerebral durante los primeros 15 min. de infusión de la droga se deba a una acción directa de la 4-AP sobre las terminales glutamatérgicas y catecolaminérgicas presentes en la corteza de infusión. Una vez en el espacio extracelular, el Glu podría actuar como agente activador de las descargas epileptiformes, que se proyectan hasta el área contralateral, mientras que los catecolaminas liberadas podrían estar apoyando la propagación de las descargas, a través de la activación de receptores β -adrenérgicos y D1-dopaminérgicos en la corteza cerebral, aunque no se descarta la función protectora contra las crisis de ambos neurotransmisores debido a la presencia de receptores α -adrenérgicos y D2-dopaminérgicos en la misma zona.

ABSTRACT

The epilepsy is one of the most common neurological disease in the human specie, and it's due to an inbalance between the excitatory and inhibitory neurotransmission systems. It has been proposed that a variety of neurotransmitters participate in the epileptic phenomenon, depending on the particular type of seizure. In this work, we used a model of generalized tonic-clonic convulsions in order to study the role of excitatory aminoacids and catecholamines during the seizure induced by 4-aminopyridine in the right motor cerebral cortex, and during the propagation of hiperexcitability to contralateral motor cerebral cortex. Adult wistar rats were used, and were implanted with a pair of microdialysis probes with bipolar electrodes adhered to them. Both probes and electrodes were connected to a specially designed dialysis tower, in order to monitor the extracellular concentration of neurotransmitters, and obtain simultaneously the EEG record. In the infusion cortex of 4-AP, (right motor cortex) we observed increases in the concentration of some neurotransmitters with respect to the basal value: Glu (4 times), NE (2.4 veces), VMA (one time), and DA (15 times); all increases were observed during the first 15 min after drug infusion. In the contralateral cortex (left), other increases were observed with the same compounds, between 60-75 min after the infusion of 4-AP. In the infusion cortex, The EEG record presents characteristics of hiperexcitability, that begin within the first 15 min of infusion, while in the contralateral cortex, these characteristics were present aproximately 30 min later. Probably the excess of Glu and Catecholamines in the cerebral tissue during the first 15 min after drug infusion is due to direct action of 4-AP on the glutamatergic and catecholaminergic terminals presents in the infusion cortex. Once in the extracelular space, the Glu could act as an activator agent of epileptiform discharges, wich travel to the contralateral area, while the catecholamines could support the propagation of the discharges throught β -adrenergic and D1-dopaminergic receptors activation in the cerebral cortex. The presence of α -adrenergic and D1-dopaminergic receptors in the same zone, should not discard the anticonvulsant action of NE and DA.

DEDICATORIAS

Todo el esfuerzo que representa este trabajo está dedicado a mis hijos y a mi esposo:

Abigail

Brenda

José Ramón

Francisco

fiel de la balanza de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi director de tesis, Dr. Alberto Morales Villagrán, por su amistad y por su gran inversión de tiempo, dinero y esfuerzo para la realización de este trabajo.

A mis asesores y sinodales:

Dr. Carlos Beas Zárate

Dr. Ricardo Tapia

M.C. Alicia Navarro

M.C. Sergio Meneses

por su atenta revisión del manuscrito, y sus acertadas opiniones y consejos.

A mis compañeras de trabajo:

por sus comentarios para el enriquecimiento de este trabajo, y por hacer mas faciles las horas que pasamos juntas.

A mi hermanos:

Blanca Guadalupe López Pérez

Dra. Martha Patricia López Pérez

Ramón López Pérez

por su invaluable apoyo durante todo el tiempo.

A mis padres:

Sra. Guillermina Pérez

Lic. Ramón López

por respetar mi vida.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, especialmente a la Dra. Anne Santerre Lucas.

A la Universidad de Guadalajara, por el apoyo brindado a través del programa PROMEP.

A los animales que murieron en el transcurso de esta investigación.
Con todo mi respeto.

GLOSARIO DE FIGURAS

Fig. 1: Papiro egipcio que contiene la primera referencia escrita al cerebro.....	2
Fig. 2: Tipos principales de neuronas corticales.....	12
Fig. 3: Laminación cortical.....	14
Fig. 4: Esquema de una columna cortical.....	16
Fig. 5: Principio general de la conectividad cortico-cortical.....	17
Fig. 6: Localización de la corteza motora y su relación con la vía piramidal.....	18
Fig. 7: Sinapsis glutamatérgica.....	21
Fig. 8: Subunidades de los receptores a Glu.....	22
Fig. 9: Receptores glutamatérgicos.....	24
Fig. 10: Vías glutamatérgicas.....	27
Fig. 11: Sinapsis catecolaminérgicas.....	30
Fig. 12: Clasificación de los receptores adrenérgicos.....	33
Fig. 13: Vías catecolaminérgicas.....	37
Fig. 14: Mecanismo de acción de la 4-AP.....	42
Fig. 15: Torre para microdiálisis en libre movimiento.....	46
Fig. 16: Registro electroencefalográfico obtenido.....	51
Fig. 17: Niveles extracelulares de Glu.....	54
Fig. 18: Niveles extracelulares de NE.....	55
Fig. 19: Niveles extracelulares de VMA.....	56
Fig. 20: Niveles extracelulares de DA.....	57

GLOSARIO DE TABLAS

Tabla 1: Algunas características de los receptores adrenérgicos.....	34
Tabla 2: Algunas características de los receptores dopaminérgicos.....	35
Tabla 3: Valores basales de Catecolaminas y Glu	53



ABREVIACIONES UTILIZADAS

EEG:	electroencefalográfico (a)
PPSE:	potenciales postsinápticos excitadores
PPSI:	potenciales postsinápticos inhibidores
SNC:	sistema nervioso central
CPD:	cambio paroxístico despolarizante
Glu:	glutamato
Gln:	glutamina
Gly:	glicina
NMDA:	N-metil-D-Aspartato
AMPA:	Acido propiónico- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
KA:	kainato
NBQX:	6-nitro-7-sulfamobenzoquinoxil-2,3-diona
Con-A:	conavalina-A
mGluR:	receptores metabotrópicos a glutamato
IP ₃ :	fosfato de 1,4,5-inositol
DAG:	diacilglicerol
PKC:	cinasa C de proteínas
GLAST:	transportador de glutamato-aspartato
GLT-1:	transportador de glutamato tipo 1
EAAC-1:	transportador de aminoácidos excitadores tipo 1
DA:	dopamina
ACh:	acetilcolina
GABA:	ácido γ -aminobutírico
5-HT:	serotonina
4-AP:	4-aminopiridina

NE:	norepinefrina, noradrenalina
E:	epinefrina, adrenalina
TH:	tirosina hidroxilasa
L-DOPA:	3,4-dihidroxi fenilalanina
DDC:	dopa descarboxilasa
DBH:	dopamina- β -hidroxilasa
PNMT:	feniletanolamina-N-metil transferasa
MAO:	monoamino-oxidasa
COMT:	catecol-O-metil transferasa
ARNm:	ácido ribonucléico mensajero
RGPE:	ratas genéticamente propensas a epilepsia
LC:	locus coeruleus
ip:	intraperitoneal
ic:	intracerebral
GMS:	glutamato monosódico

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Introducción.....	1
Antecedentes.....	20
Planteamiento del Problema.....	43
Hipótesis.....	44
Objetivo General.....	44
Objetivos Particulares.....	44
Materiales y Métodos.....	45
Resultados.....	50
Discusión.....	58
Conclusiones.....	62
Referencias.....	63

INTRODUCCION

La especie humana ha manifestado desde sus inicios, un interés especial por su cerebro, por el hecho de que de éste surgen las habilidades necesarias para transformar el ambiente a su conveniencia, lo que le ha permitido adaptarse a casi cualquier entorno terrestre, y aún salir del planeta para buscar colonizar otros mundos. Del cerebro surge pues la inteligencia del hombre, que lo aparta de las demás especies animales, situándolo en una escala superior.

Los estudios antropológicos de cráneos humanos que se han encontrado en varias regiones del mundo evidencian que los hombres primitivos sabían que la región de la cabeza desempeñaba un papel importante en el comportamiento. Los seres primitivos creían que los demonios y espíritus malignos podían tomar posesión de un individuo, y la práctica de la trepanación craneana (práctica común en la mayoría de las culturas primitivas) constituía un método que, combinado con el exorcismo religioso, estaba destinado a liberar el espíritu del paciente. Fueron tal vez los egipcios quienes iniciaron un estudio más racional del cerebro, apartándolo de creencias religiosas y tratando de encontrar una relación del órgano con el comportamiento del hombre. Un papiro, escrito probablemente 3,500 años antes de nuestra era, contiene el primer registro escrito del cerebro, en el cual, según James Breasted, quién tradujo y publicó el documento en 1930, se describe los síntomas, diagnóstico y prognosis de dos pacientes heridos en la cabeza, que tienen fractura compuesta en el hueso (Fig. 1).

Tal vez el primero en diseccionar un cerebro humano fue el griego Alcmeón, contemporáneo de Aristóteles, quién trató de adjudicarle funciones a cada región cerebral, con base a sus observaciones. Para Alcmeón, todos los seres, incluidos los animales, podían experimentar sensaciones, pero sólo los hombres eran capaces de reunir las para formar ideas: el cerebro era la sede de esta facultad. El personaje que más influyó en la época antigua sobre este tema fué el médico griego Galeno, quien creía que sustancias químicas que él denominaba "humores corporales" (la flema, la sangre, la bilis negra y amarilla) se



Fig.1:Papiro egipcio que contiene la primera referencia escrita al cerebro. (Fuente: "The Edwin Smith Surgical Papyrus", Vol 2, The University of Chicago Press, Chicago, 1930).

combinaban en el corazón con el *pneuma*, palabra griega que designa lo más sutil y espiritual que hay en el individuo: su mente. Estos fluidos penetraban en el cerebro a través de una red de tubos muy delgados que él había vislumbrado en la base del cerebro, y a la que denominó *rete mirabile*, o red admirable. La redistribución de los fluidos estaba a cargo del cerebro, que los reenviaba a los nervios para producir los comportamientos.

En la Nueva España, se registra en la "Historia General de las cosas de la Nueva España", escrita por Fray Bernardino de Sahagún¹ la creencia de los mexicanos antiguos de que los "centros mayores" del cuerpo eran la parte superior de la cabeza, el hígado y el corazón. Se distinguía el cerebro (*cuanepantla*, *cuatextli* o *cuayallotli*) de sus envolturas, las meninges (*cuatexquimilluhcayotl*). El investigador López Austin² refiriéndose a los antiguos nahuas, escribe:

"De las regiones del cuerpo, es la cabeza la que recibe las mas variadas atribuciones, entre las que destacan la correspondencia cósmica, la capacidad de raciocinio, es región de comunicación, centro de relación con la sociedad y con el cosmos, punto en el que aflora la vida interna...."

Fue hasta el siglo XVII, cuando ya la anatomía se había convertido en una disciplina universitaria respetada, cuando algunos médicos comenzaron a describir casos clínicos de lesiones cerebrales o de tumores, dándose cuenta de que algunas lesiones o enfermedades del cerebro parecían relacionarse con síntomas específicos, lo que llevaba a la conclusión de que las áreas cerebrales dañadas eran las que de alguna manera controlaban los comportamientos afectados. No pasó mucho tiempo para que algunos espíritus audaces comenzaran a tratar de reproducir esos síntomas en animales de experimentación, tratando de crear en ellos lesiones parecidas a las observadas en los pacientes humanos. Habían nacido las neurociencias experimentales.

Los primeros investigadores dedicados a las neurociencias trataban de encontrar explicaciones racionales para las enfermedades que se sabía tenían su origen en el cerebro, despojándolas de las creencias y temores populares que las ligaban con espíritus y demonios. Entre las enfermedades que se originan en el Sistema Nervioso y que puede afectar a individuos de cualquier edad, ninguna es tan espectacular como la epilepsia, de la cual el filósofo griego Hipócrates³ escribía

“esta enfermedad no me parece más sagrada ni más divina que las otras, sino que tiene la misma naturaleza que el resto de las enfermedades, y por origen las mismas causas que cada una de ellas. Los hombres le han atribuido una causa divina por ignorancia y por el asombro que les inspira, pues no se parece a las enfermedades ordinarias”

Hipócrates postuló que las causas que producían esta enfermedad se asentaban en procesos propios del cerebro

Epilepsia.

El término epilepsia no designa una enfermedad en la definición típica de la palabra, sino que se refiere a un conjunto de manifestaciones clínicas cuya característica unificadora es la ocurrencia repetitiva de una variedad de anormalidades motoras y/o del comportamiento, conocidas comúnmente como crisis, que se presentan de manera aparentemente espontánea durante la vida del sujeto

En la actualidad, la epilepsia es una de las alteraciones neurológicas que más afectan a la población humana, y en algunos países se considera un verdadero problema de salud pública, tanto por su alta prevalencia e incidencia^{4,5,6,7}, como por sus consecuencias médicas y sociales. A pesar de los esfuerzos por desterrar las creencias acerca del carácter sobrenatural de la epilepsia, el enfermo epiléptico continúa siendo objeto de discriminación en la

sociedad actual. En todo el mundo, se calcula que existen aproximadamente 50 millones de personas que presentan el mal, de las cuales al menos el 25% sufren crisis refractarias a las terapias médicas existentes⁸, esto sin considerar a un grupo de personas que en algún momento de su vida sufren crisis simples o secundarias a trastornos extracelulares, tales como supresión súbita del alcohol, hipoxia-isquemia, alteraciones electrolíticas, infecciones cerebrales y otras causas⁹. En México, se considera que aproximadamente el 2% de la población sufre de algún tipo de epilepsia¹⁰.

Etimológicamente, la palabra epilepsia deriva del griego *epilanbaneim* que significa "ser sobrecogido bruscamente". Los intentos modernos de definir la epilepsia han causado controversia entre las corrientes neurológicas, por lo que en 1973 la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicaron un Diccionario de Epilepsia, donde se define como "una afección crónica de etiología diversa, que se caracteriza por crisis recurrentes, debidas a descargas excesivas de las neuronas, asociadas posteriormente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas

En la práctica clínica, se reconocen dos tipos principales de epilepsia en humanos¹¹, que son las crisis generalizadas y las crisis parciales.

Las crisis generalizadas ocurren cuando las descargas neuronales involucran áreas amplias de ambos hemisferios cerebrales. Se han descrito cuatro subtipos de crisis generalizadas

- Ausencias, en ocasiones referidas como "*petit mal*", se caracterizan por la pérdida momentánea de la conciencia, con o sin movimientos convulsivos. Electroencefalográficamente, se observan espigas bilaterales, sincrónicas y actividad de punta-onda en ambos hemisferios. Ocasionalmente estas manifestaciones se acompañan de un ligero componente tónico o clónico. Algunas crisis de ausencia pueden presentar un componente atónico, en donde el paciente pierde abruptamente el tono muscular. Pueden ocurrir automatismos y/o comportamientos estereotipados repetitivos¹².

- Ausencias atípicas, ocurren generalmente en pacientes que presentan retardo mental y del desarrollo. Estos pacientes, en su mayoría niños, pueden presentar lapsos de pérdida de la conciencia con algunas características de crisis parciales complejas o de crisis generalizadas tónico-clónicas, que pueden estar asociadas con componentes atónicos. Este tipo de crisis se manifiesta electroencefalográficamente como actividad bilateral con ondas compuestas. En ocasiones ésta combinación de eventos clínicos y electroencefalográficos (EEG) son referidas como variante Lennox-Gastaut¹².
- Crisis mioclónicas, que consisten en contracciones musculares repentinas rápidas y masivas que producen movimientos de una extremidad o, más comunmente, flexión del cuerpo a nivel de la cadera. Durante la infancia estas crisis se identifican como espasmos infantiles, y pueden ocurrir cientos de ellos en un lapso de 24 horas.
- Crisis generalizadas tónico-clónicas, también llamadas "*grand mal*", se manifiestan por contracciones rítmicas de grupos de músculos, que provocan movimientos convulsivos. Ocasionalmente, se presenta solo un componente, dando lugar a convulsiones tónicas (rigidez de algunos grupos de músculos) o a convulsiones clónicas (movimientos de flexión rítmicos).

Las crisis parciales o focales ocurren cuando las descargas neuronales iniciales están localizadas en un área restringida de un hemisferio cerebral.

- Las crisis parciales simples involucran áreas corticales sensoriales o motoras, y se caracterizan por movimientos convulsivos focales o alucinaciones, sin pérdida de la conciencia.
- Las crisis parciales complejas ocurren cuando la crisis focal se asocia con pérdida de la conciencia. Las crisis parciales simples pueden evolucionar a crisis parciales complejas, con o sin automatismos, o bien las crisis parciales complejas pueden presentarse como tales desde el principio. Debido a que este tipo de crisis suelen originarse en los lóbulos temporales, son

referidas a veces como epilepsia del lóbulo temporal o epilepsia psicomotora. Las crisis parciales simples o complejas pueden evolucionar a crisis generalizadas tónico-clónicas.

Fisiológicamente, las crisis son el resultado de una alteración súbita y transitoria del funcionamiento normal del cerebro, que consiste en la aparición de despolarizaciones neuronales excesivas, que originan por un lado descargas neuronales de alta frecuencia, y por el otro cambios hiperpolarizantes compensadores que tratan de regular estas descargas. Además, durante el proceso epiléptico hay un reclutamiento anormal de un conglomerado neuronal al cual se le denomina foco epiléptico, lo que origina una hipersincronía de las descargas neuronales individuales. Así la despolarización/hiperpolarización y las descargas neuronales excesivas e hipersincrónicas son la esencia de la actividad convulsiva¹³. Las alteraciones conductuales o motoras que se presentan dependerán del tipo y localización de las neuronas involucradas.

Epilepsia y sistemas de neurotransmision.

Dada la diversidad de las manifestaciones clínicas y electroencefalográficas (EEG) de las crisis epilépticas, tanto en humanos como en diferentes modelos animales, existe la posibilidad de que una amplia variedad de mecanismos etiológicos y patológicos sean responsables de ellas. Si alteraciones en la función de algunos neurotransmisores tienen influencia sobre las crisis, no sería sorprendente que diferentes sistemas de neurotransmisión estuvieran involucrados en tipos particulares de crisis. Así, se vuelve importante caracterizar las crisis tan exactamente como sea posible, en cualquier estudio diseñado para examinar la relación entre neurotransmisores particulares y crisis.

La llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica desencadena una entrada masiva de Ca^{++} a la célula, que posteriormente provoca la liberación hacia el espacio extracelular, de una cantidad dada de moléculas de neurotransmisores. Una vez liberado, el neurotransmisor se vincula a receptores postsinápticos específicos. Según el carácter del transmisor y del

receptor con el cual interactúa, la ocupación de estos receptores dará lugar a una excitación o una inhibición, que se manifiestan como fenómenos eléctricos postsinápticos llamados potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) o potenciales postsinápticos inhibidores (PPSI).

A través de numerosos estudios realizados con los diferentes modelos experimentales de epilepsia, se ha propuesto que pueden establecerse algunos principios básicos sobre la neurotransmisión y el fenómeno convulsivo, que son¹⁴:

- la epilepsia involucra múltiples sistemas de neurotransmisión;
- las crisis resultan de un desbalance entre la excitación y la inhibición, en favor de la excitación
- diferentes tipos de crisis involucran diferentes mecanismos neuroquímicos y la participación de diferentes estructuras neuronales
- la excitación extrema asociada con crisis evoca sistemas involucrados en la plasticidad cerebral, tales como receptores del tipo NMDA, segundos mensajeros y genes.

Modelos experimentales.

El estudio del fenómeno de crisis en humanos está limitado tanto por cuestiones éticas como técnicas; sin embargo, estas dificultades se evitan mediante el uso de modelos animales. De hecho, gran parte del conocimiento que se tiene sobre la epilepsia se ha derivado del estudio en estos modelos, que reproducen patrones de comportamiento, electrográficos y patológicos similares a los observados en las variedades clínicas del síndrome. La ventaja de estos modelos radica en que permiten el estudio de los cambios neuroquímicos y fisiológicos relacionados con la iniciación, desarrollo y término del fenómeno de crisis, esto en sistemas libres del efecto de las drogas antiepilépticas que se utilizan para tratar a los pacientes humanos. Existen múltiples preparaciones tanto *in vitro* como *in vivo* que se utilizan para producir crisis convulsivas, las cuales deben ser recurrentes y episódicas, y asociadas con un patrón electroencefalográfico anormal, repetitivo y de alto voltaje, y controlables con

anticonvulsivantes clínicamente efectivos. Hasta ahora, no hay un modelo que reúna todas estas características, sin embargo, han permitido un gran avance en el entendimiento de los procesos cerebrales involucrados en la iniciación, propagación y extinción de la actividad cerebral convulsiva.

Un modelo de epilepsia experimental se considera "verdadero" cuando las alteraciones paroxísticas son espontáneamente recurrentes (como el modelo del kindling o la aplicación tópica de cobalto o crema de alúmina en la corteza cerebral). La generalidad de los modelos experimentales no presentan ésta característica, y por lo tanto no son crónicos, por lo que es más apropiado denominarlos "modelos experimentales de crisis epileptiformes".

La utilización de los modelos experimentales se ha aplicado básicamente en tres aspectos:

- en el ensayo de drogas anticonvulsivas que pudieran tener valor terapéutico en la epilepsia humana
- en el estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación de crisis epilépticas, sean o no convulsivas
- en el estudio de los mecanismos neuronales básicos que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad neuronal¹⁵.

A la fecha existen muchos modelos animales de epilepsia, que pueden agruparse de la siguiente manera¹⁶:

Modelos de crisis parciales simples (agudas)

- * aplicación local de penicilina
- * estimulación eléctrica aguda
- * síndrome de abstinencia al GABA

Modelos de crisis parciales simples (crónicas)

- * administración tópica de crema de alúmina
- * administración tópica de cobalto, zinc y hierro
- * daño criogénico
- * epileptogénesis sistémica focal

Modelos de crisis parciales complejas

- * administración de ácido kainico
- * administración de toxina tetánica
- * inyección de sustancias convulsivantes en el área tempestas
- * producción de "kindling"

Modelos de crisis tónico-clónicas generalizadas

- * producción de crisis en monos fotosensibles (*Papio papio*)
- * producción de crisis por estimulación auditiva en roedores (RGPE, ratón E1)
- * producción de crisis por choque eléctrico
- * aplicación sistémica o intracerebral de compuestos convulsivantes (pentilentetrazol, bicuculina, picrotoxina, glutamato monosódico, 4-aminopiridina, etc)

Modelos de ausencia generalizada

- * estimulación talámica
- * administración sistémica de penicilina

La corteza cerebral.

Existen en el Sistema Nervioso Central (SNC) regiones que son más susceptibles que otras a presentar descargas epileptiformes : entre ellas ésta la corteza cerebral, algunas regiones del circuito límbico, el tálamo, el tallo cerebral, etc., a diferencia de otras, tales como el cuerpo estriado o el cerebelo, cuyas neuronas comunmente no son susceptibles de presentar la hipersincronía necesaria para producir un CPD, por lo que no se les considera como regiones epileptogénicas.

La corteza cerebral es una capa de células que varía entre 2 y 4 mm de espesor. La parte de la corteza que es visible sobre la superficie del cerebro se denomina neocorteza, porque es la parte que se ha adquirido más recientemente en la evolución, y es el componente más amplio del cerebro humano. La parte de la corteza evolutivamente más antigua se denomina alo corteza, y se ubica en la profundidad del lóbulo temporal. Los cuerpos celulares de las neuronas de la neocorteza presentan una variedad de formas,

pero en general pueden distinguirse cinco tipos que están presentes en todas las regiones corticales (Fig. 2):

- Células piramidales. Estas deben su nombre a la forma de su soma, que recuerda una pirámide, cuyo ápice apunta hacia la superficie del cerebro. Su tamaño está entre 10 y 50 μm . Del ápice de cada pirámide surge una dendrita (la dendrita apical) que corre hasta las capas superiores de la corteza, haciendo contacto en su camino con varias neuronas. De la base del cuerpo celular surgen varias dendritas (las dendritas basales) que cursan lateralmente dentro de la misma capa que contiene al soma. El axón se origina en la base del soma, y termina en las capas corticales más profundas, o entra en la materia blanca como una fibra de proyección, de asociación o comisural.
- Células estrelladas, también llamadas células granulares, tienen una forma estrellada o poligonal, con un cuerpo celular de aproximadamente 8 μm de diámetro. Estas células poseen múltiples dendritas ramificadas y un axón relativamente corto que termina en neuronas cercanas.
- Células fusiformes, que tienen un eje longitudinal vertical a la superficie cerebral, y se concentran en capas corticales profundas. Sus dendritas se originan en los polos del soma, y el axón en la parte inferior del mismo. Este último penetra en la materia blanca como una fibra de proyección, de asociación o comisural.
- Células horizontales de Cajal, que son pequeñas células fusiformes horizontales, que se encuentran en las partes más superficiales de la corteza. En cada extremo de la célula se origina una dendrita, y el axón corre paralelo a la superficie de la corteza, haciendo contacto con las dendritas de las células piramidales.
- Células de Martinotti, que son pequeñas y multipolares, están presentes en todos los niveles de la corteza. Poseen dendritas cortas y su axón se dirige hacia la superficie de la corteza, terminando generalmente en la capa más externa, y originando algunas ramas colaterales cortas en su trayecto.

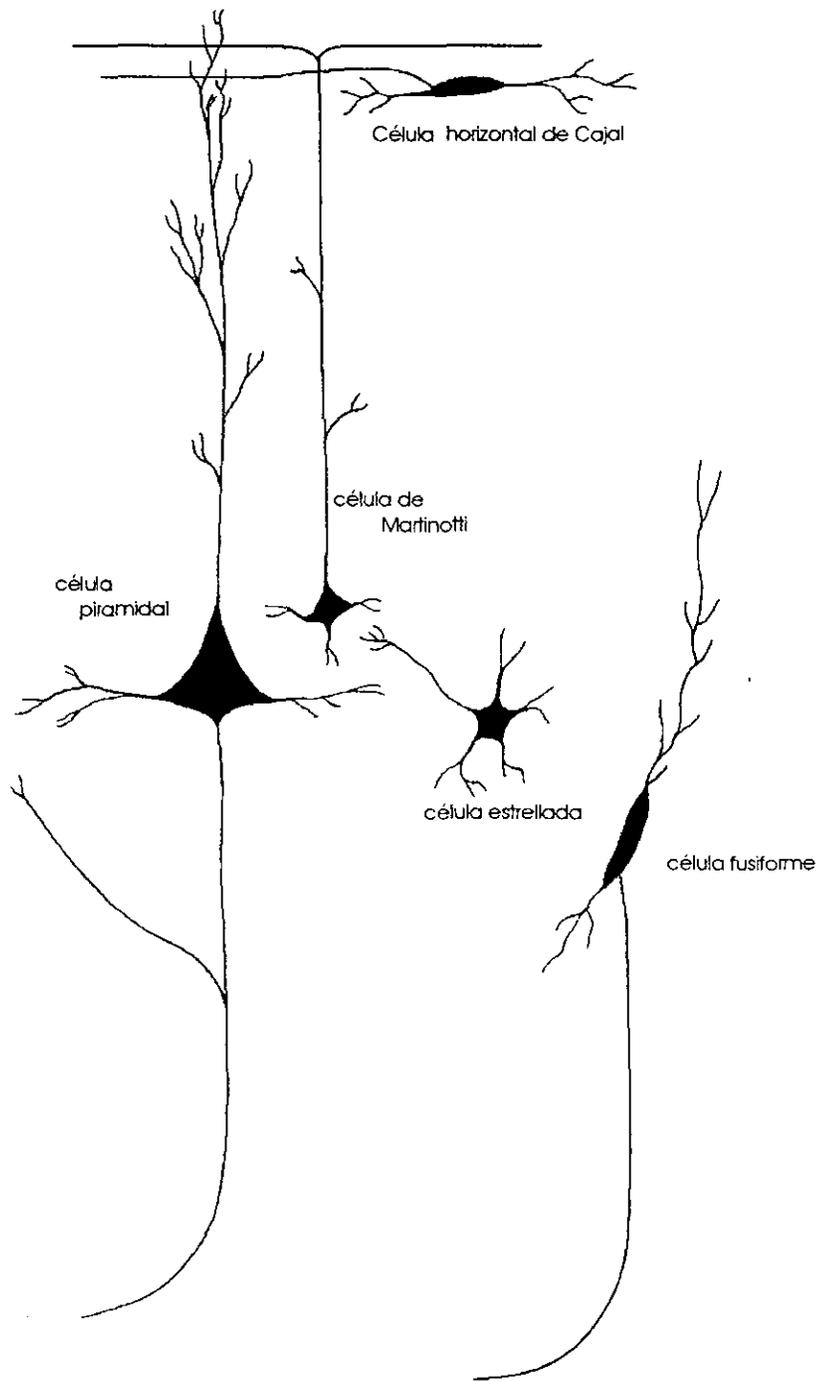


Fig. 2: Tipos principales de neuronas corticales. (Fuente: Barr, M. "The human nervous system. An anatomical viewpoint" 3a. Ed. 1979)

En la neocorteza pueden distinguirse seis capas que se distinguen por el tipo, densidad y disposición de las células que se encuentran en ellas, y son (Fig. 3)

- I- capa molecular, es la capa más superficial, y es donde se establecen gran cantidad de sinapsis entre diferentes neuronas. Consiste de una densa red de fibras nerviosas orientadas tangencialmente, que derivan de las dendritas apicales de las células piramidales y fusiformes, los axones de células estrelladas, y las células de Martinotti. También hay fibras aferentes
- II- capa granular externa: contiene gran cantidad de pequeñas células piramidales y células estrelladas. Las dendritas de éstas células terminan en la capa molecular y sus axones penetran en capas más profundas, donde terminan o continúan hacia la sustancia blanca
- III- capa piramidal externa: esta capa está compuesta por células piramidales pequeñas y medianas, cuyas dendritas apicales se dirigen hacia la capa molecular y sus axones a la sustancia blanca, a la cual entran como fibras de proyección, de asociación o comisurales.
- IV- capa granular interna: compuesta por células estrelladas dispuestas en forma muy compacta. Hay una gran cantidad de fibras dispuestas horizontalmente, que colectivamente reciben el nombre de banda externa de Baillarger
- V- capa piramidal interna: esta capa contiene células piramidales grandes y medianas, así como algunas células estrelladas y células de Martinotti. En esta capa también existe un gran número de fibras dispuestas horizontalmente, que forman la banda interna de Baillarger
- VI- capa multiforme: aunque la mayoría de las células de ésta capa tienen forma fusiforme, muchas de ellas son piramidales modificadas, cuyo cuerpo celular es triangular u oboide. También pueden encontrarse células de Martinotti

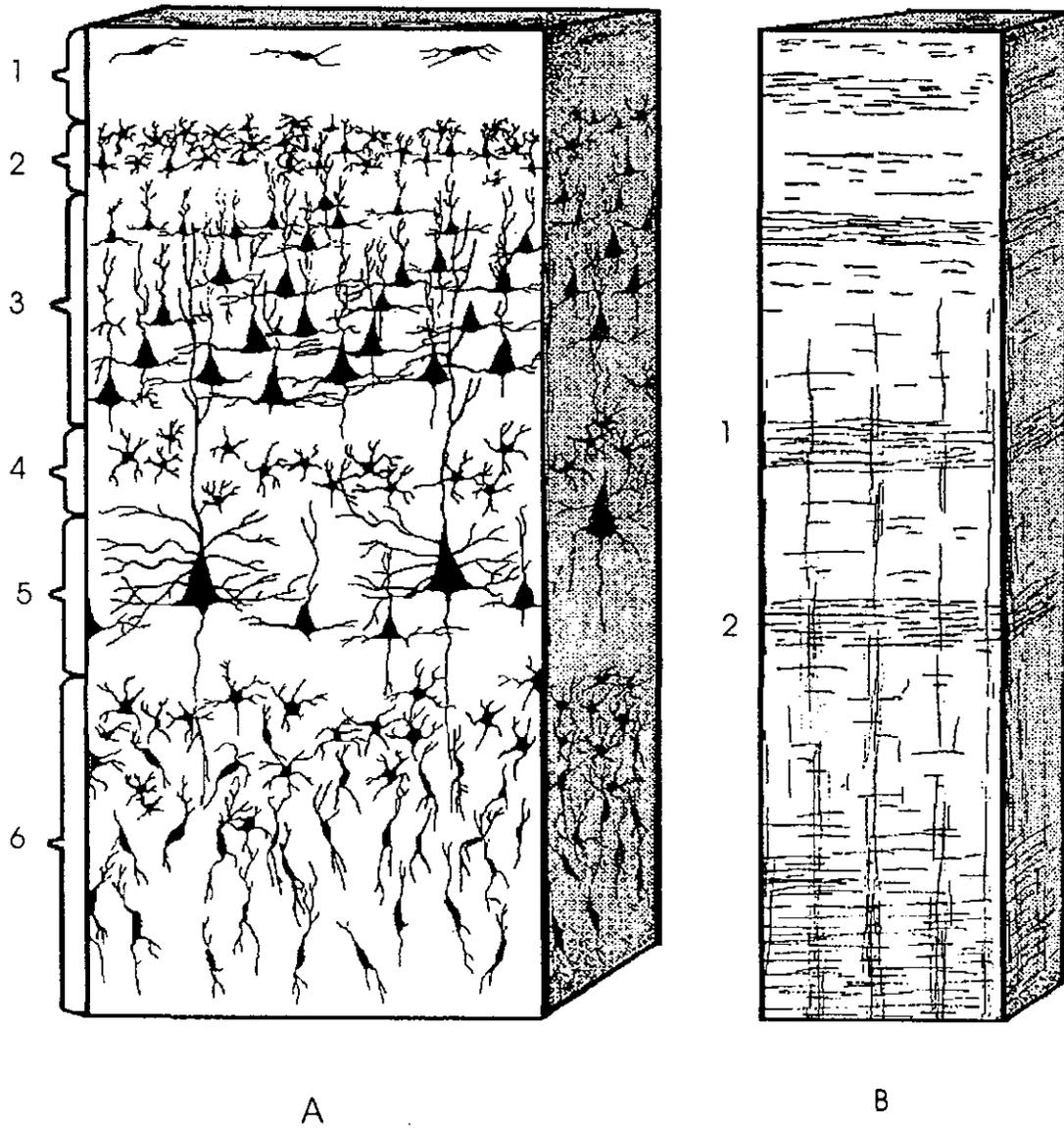


Fig. 3: A: laminación cortical típica. B: 1) lámina externa y 2) lámina interna de Baillarger. (Fuente: Barr, M. "The human nervous system. An anatomical viewpoint" 3a. Ed., 1979.)

No todas las áreas corticales presentan una laminación de seis capas (corteza homotípica); existen áreas en donde algunas capas presentan más desarrollo que otras, por lo que tienen un patrón de laminación diferente (corteza heterotípica). De ésta última existen dos tipos básicos: el tipo granuloso, en el cual las capas granulosas II y IV se encuentran más desarrolladas que las capas III y V, de modo que todas estas capas se fusionan en una sola, poblada por células predominantemente granulosas que reciben gran cantidad de fibras originadas en el tálamo. Este tipo de corteza encuentra en la circunvolución temporal superior y en partes de la circunvolución del hipocampo. En el tipo agranuloso, por el contrario, las capas II y IV se encuentran poco desarrolladas, y desaparecen fusionándose con las capas III y V, que poseen gran cantidad de pirámides dispuestas de manera compacta, y que dan origen a fibras eferentes asociadas con la función motora. Este tipo de corteza se encuentra en la circunvolución precentral y otras áreas del lóbulo frontal.

Por medio de estudios de histología combinados con registros neurofisiológicos efectuados con microelectrodos, se ha sugerido que la corteza cerebral está organizada en unidades verticales de actividad funcional llamadas columnas¹⁷, (Fig. 4) que están formadas por neuronas de diferentes tipos involucradas en funciones similares. Se ha sugerido que estas columnas son la unidad de conexión cortical, pues los experimentos demuestran que la mayoría de las células de una columna están conectadas con una misma región cortical ipsi o contralateral (Fig. 5).

La corteza motora primaria (área 4 de Brodman) es una región de corteza heterotípica agranular, en la cual está ausente la capa granular interna (capa IV), y la capa V se encuentra poblada por neuronas piramidales gigantes (50-80 μm de diámetro) llamadas células de Betz, cuyos axones cursan por el tracto cortico-espinal (vía piramidal), constituyendo aproximadamente el 50% de los axones de ese tracto. Los axones corticoespinales actúan directamente sobre neuronas motoras e interneuronas localizadas en la porción medial del cuerno dorsal del cordón espinal (Fig. 6). Las entradas hacia la corteza motora

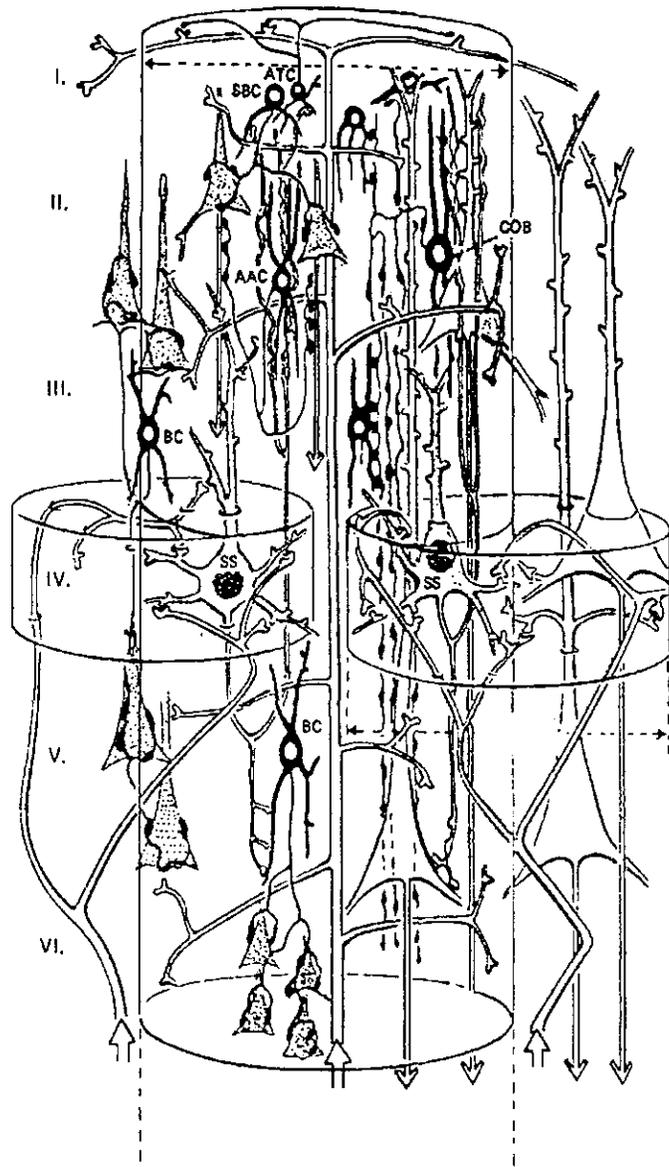


Fig. 4: Esquema de una columna cortical, donde se muestra la capa IV como principal sitio de aferencias y eferencias. (Fuente: Szentágothai, J. "The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation" Proc.R.Soc.London Ser. B, 1978, 202:219-248)

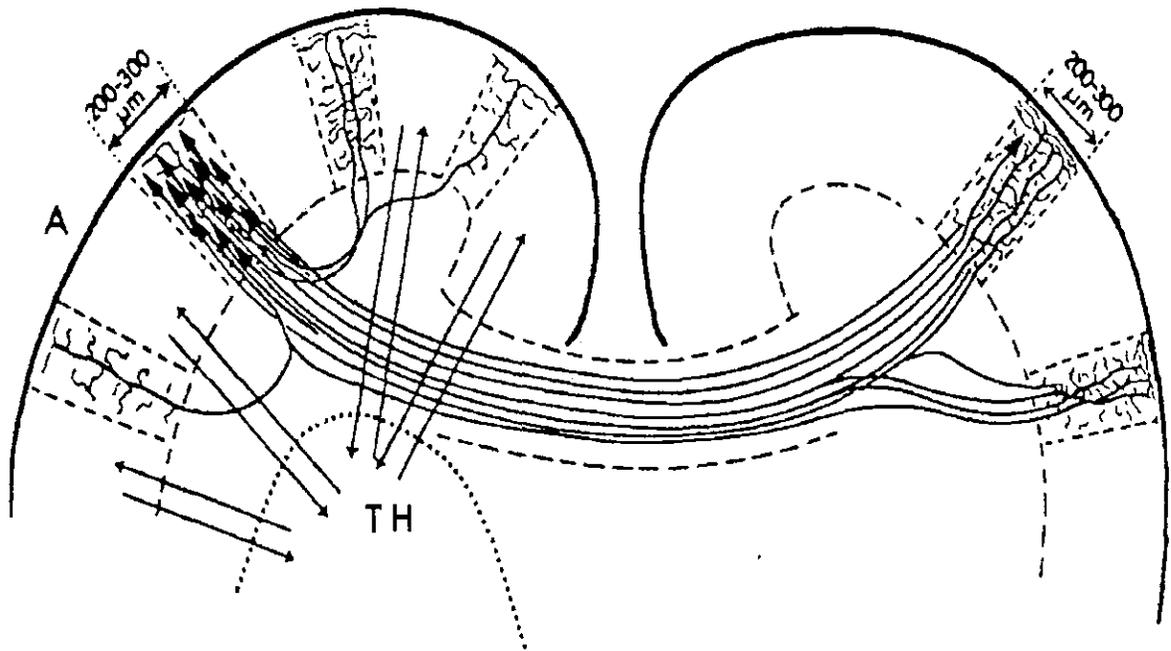


Fig. 5: Principio general de la conectividad cortico-cortical entre ambos hemisferios. Las conexiones se establecen entre columnas homólogas. TH: tálamo. (Fuente: Eccles, J. "The cerebral cortex: a theory for its operation" En *Cerebral Cortex*, Vol. 2, Jones and Peters eds. Plenum Press.)

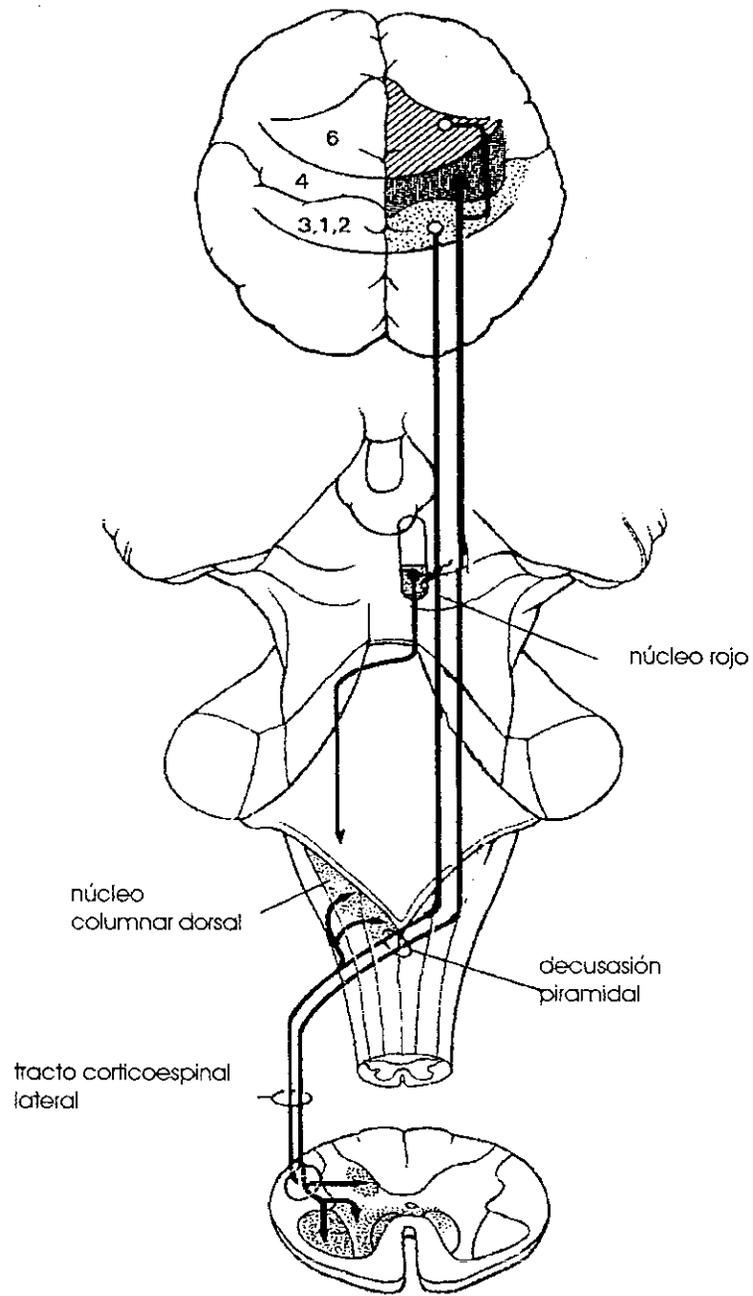


Fig. 6: Localización de la corteza motora primaria y su relación con la vía piramidal.
 (Fuente: "Principles of neural science, 3a. Ed. 1991, Kandel, E., Schwatz, J.,
 Jesell, T. eds. Elsevier).

primaria surgen de áreas corticales ipsi y contralaterales, y de áreas subcorticales, la mayoría con relevo talámico.

ANTECEDENTES

Glutamato.

Eccles y sus colaboradores¹⁸ descubrieron que los potenciales postsinápticos excitadores resultan de la apertura de canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ activados por neurotransmisores. Las evidencias farmacológicas señalan al glutamato (Glu) como el principal neurotransmisor que activa este tipo de canales en el SNC^{19,20,21,22}.

El Glu es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser sintetizado en el cerebro, a partir de glutamina (Gln), aunque también puede ser sintetizado a partir de otros precursores (glucosa, α -cetoglutarato, ornitina)²³. Las enzimas que sintetizan glutamato se localizan tanto en neuronas como en células gliales; en el caso de las neuronas, el neurotransmisor se sintetiza en el soma de la célula, y posteriormente se vesicula a través de un proceso dependiente de ATP y Mg^{++} . La liberación del Glu es principalmente dependiente de Ca^{++} , y una vez en el espacio extracelular, puede interaccionar con cualquiera de sus receptores (Fig. 7).

Existen tres clases de receptores ionotrópicos a glutamato, en los cuales el sitio de unión a los agonistas y el canal iónico asociado están incorporados en el mismo complejo macromolecular. Estos receptores están formados por cinco subunidades que son distintas para cada tipo de receptor, y que no siempre se expresan juntas, por lo que forman un mosaico de expresión complejo en el cerebro de la rata^{24,25,26,27,28}, (Fig. 8). Se clasifican, de acuerdo a su respuesta a diferentes agonistas, en los tipos N-metil D-Aspartato (NMDA), Acido propiónico (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y Acido Kainico (KA). Los receptores AMPA están distribuidos ampliamente a través del SNC y parecen mediar la transmisión sináptica rápida; generalmente presentan una baja permeabilidad a Ca^{++} , y una alta permeabilidad a Na^+ y K^+ ²⁹. Su acción se antagonizada selectivamente por 6-nitro-7-sulfamobenzoquinoxili-2,3-diona (NBQX) y por las drogas pertenecientes al grupo de las 2,3-benzodiazepinas.

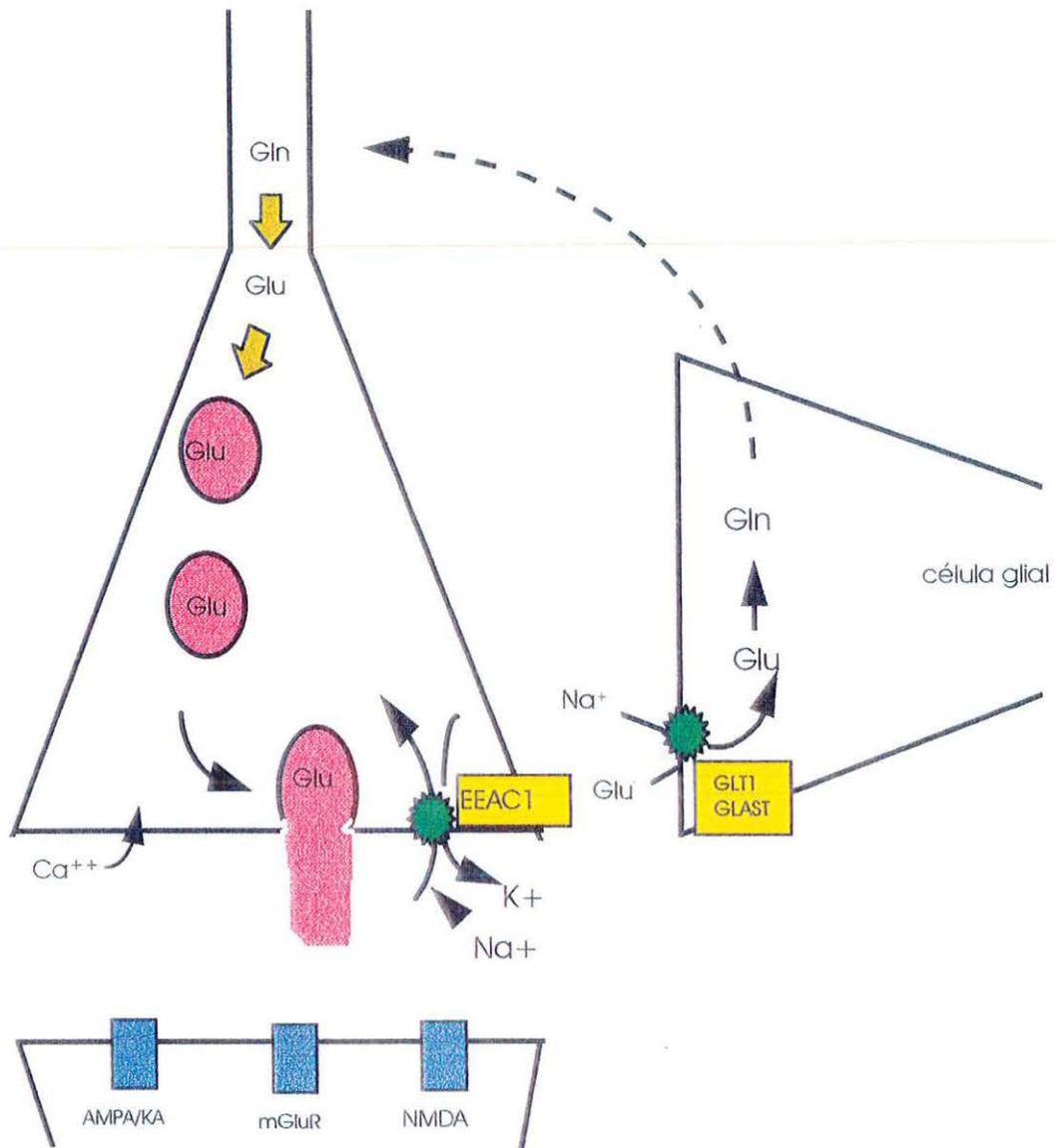


Fig. 7: Sinapsis glutamatergica. El Glu se sintetiza a partir de Gln, se almacena en vesículas, que descargan su contenido en respuesta a una entrada masiva de Ca^{++} . Una vez en el espacio extracelular, el Glu interacciona con sus receptores o es recapturado en la terminal presináptica o en las células gliales por medio de transportadores.

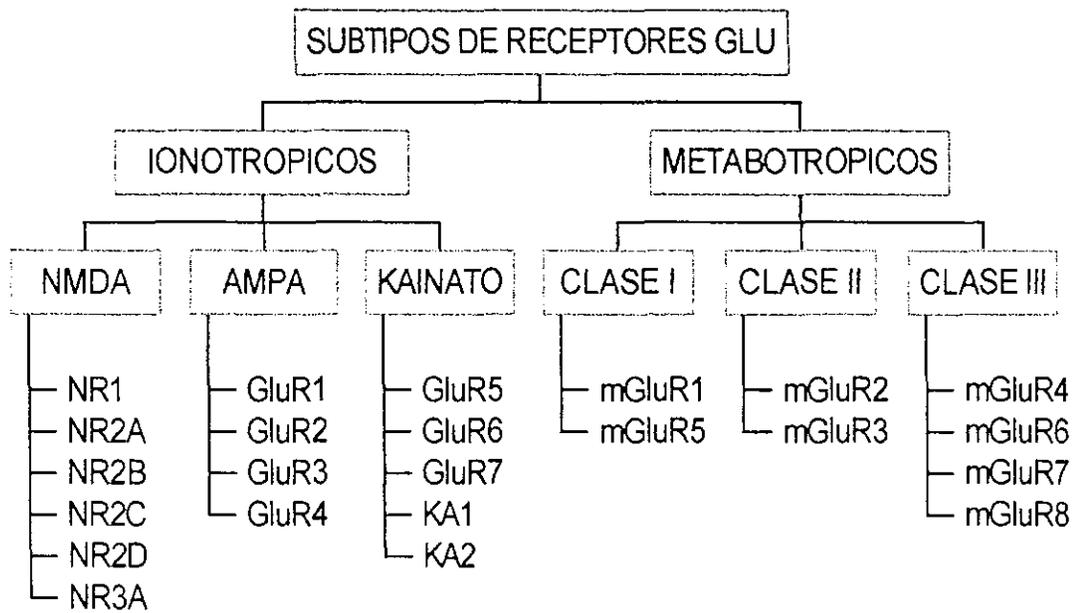


Fig. 8: Subunidades de los receptores a Glu. Cada subunidad es codificada por un gene diferente.

Los receptores KA son permeables al Na⁺ y al K⁺, pero no al Ca⁺⁺, y parecen ser importantes en procesos de excitotoxicidad. Algunas combinaciones de subunidades forman un receptor de baja afinidad al KA (GluR5-GluR7), mientras que otras combinaciones resultan en receptores que presentan alta afinidad al mismo agonista (KA1 o KA2) (fig. 9).

Por medio de estudios de unión de ligandos específicos, se ha demostrado que tanto AMPA como KA pueden en un momento dado activar al mismo receptor, aunque con diferente afinidad³⁰. Actualmente, estos dos tipos de receptores pueden distinguirse por su sensibilidad característica a dos drogas: la lectina concavalina A (Con-A) y la ciclotiazida³¹. Con-A activa a los receptores KA sin efectos significativos sobre los receptores AMPA, mientras que la ciclotiazida tiene el efecto contrario.

Por otra parte, el receptor NMDA es uno de los receptores más complejos, pues se conocen cuando menos seis sitios de unión distintos para ligandos endógenos, que influyen en la probabilidad de apertura del canal iónico asociado. Estos consisten de un sitio de reconocimiento para el agonista, un sitio de reconocimiento para glicina (Gly) y un sitio regulador para poliaminas. Además, se han identificado sitios de unión para Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ y H⁺. Para ser activado, el receptor requiere de la unión simultánea de Glu y Gly³²; ésta activación se inhibe por Mg⁺⁺ extracelular, que ejerce un bloqueo dependiente del voltaje³³. Otro importante inhibidor endógeno del receptor NMDA es el pH, pues la frecuencia de apertura del canal se reduce por la acción de H⁺, con un punto medio a pH 7.4 y una supresión casi total a pH 6³⁴. La ocupación del sitio para poliaminas disminuye el bloqueo ejercido por H⁺, potenciando así la activación del receptor. Sin embargo, a concentraciones altas, las poliaminas actúan sobre un sitio extracelular, inhibiendo la activación del receptor, también mediante un bloqueo dependiente del voltaje³⁴.

Existe otro grupo de receptores a glutamato relacionados con enzimas citoplásmicas por medio de proteínas G, llamados receptores metabotrópicos (mGluR). A la fecha, se han clonado 8 mGluR, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a la similitud de sus secuencias de aminoácidos, a sus propiedades

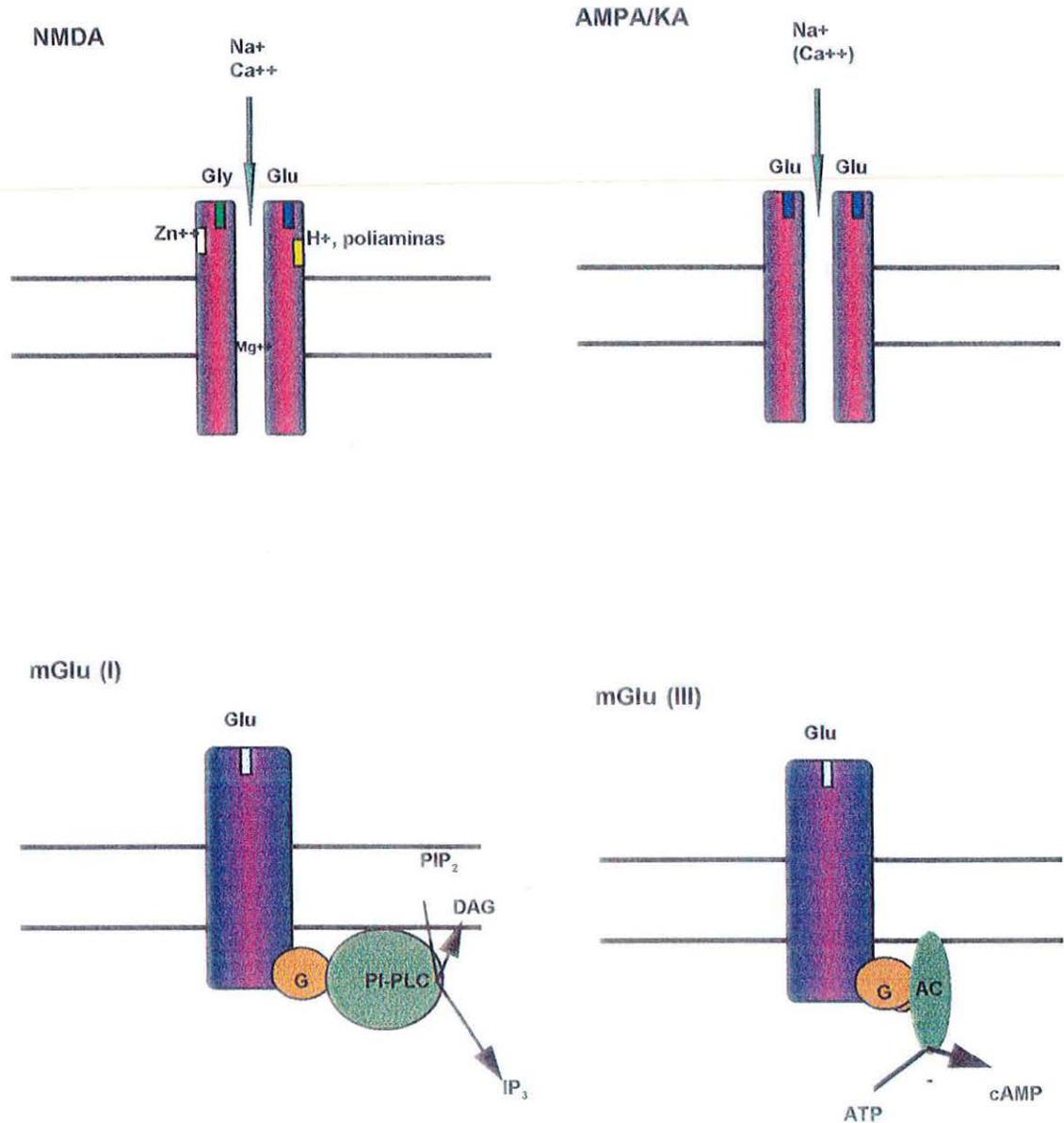


Fig. 9: Receptores glutamatergicos: los tipos NMDA y AMPA/KA son receptores ionotrópicos, cuya activación permite la entrada de iones al citosol; los tipos mGluR son receptores metabotrópicos, ligados a proteínas G.

farmacológicas y a las vías de transducción de señales a las cuales están acoplados

- La activación de los miembros del grupo I estimula la actividad de fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PI-PLC), la activación de PI-PLC produce la formación de fosfato de 1,4,5-inosito (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que posteriormente activarán a cinasas de proteínas. Además, estimula la liberación de Ca^{++} de almacenes intracelulares;
- La activación de los receptores del grupo II, y probablemente del grupo III, resulta en la inhibición de Adenilato Ciclasa;
- La activación de cualquiera de los tres tipos de mGluR inhibe la apertura de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje tipo L, mientras que la activación de los grupos I y II inhibe la apertura de los canales de Ca^{++} tipo N.

Los mecanismos de captura de glutamato tienen una función importante en la regulación de su concentración extracelular en el cerebro. Se conocen al menos tres tipos de transportadores localizados en la membrana plasmática de neuronas y astrocitos, que capturan el glutamato con alta afinidad, y son absolutamente dependientes de Na^+ ^{35,36,37}, y que se denominan GLAST (transportador de glutamato-aspartato); GLT-1 (transportador de glutamato tipo 1); y EAAC1 (acarreador de aminoácidos excitadores tipo 1). Los dos primeros se expresan preferencialmente en células gliales, y el último en neuronas. En cada ciclo, dos iones de Na^+ acompañan el movimiento de Glu al interior celular, al mismo tiempo que un ión K^+ se transporta hacia el exterior^{23,38}. La función adecuada de los transportadores limita la cantidad de Glu libre en el espacio extracelular, previniendo de este modo una estimulación excesiva de sus receptores³⁹.

Los estudios inmunocitoquímicos y neuroquímicos sugieren que la mayoría de las vías glutamatérgicas son axones que se proyectan desde y hacia la corteza cerebral y el hipocampo. Estas vías incluyen la cortico-estriatal, la cortico-hipocampal, la cortico-cortical, la entorrinal-hipocampal, y las hipocampales y corticales que se dirigen hacia los núcleos hipotalámicos,

talámicos y del tallo cerebral. Además, en el cerebelo existe una alta densidad de receptores a Glu, y las células granulares de la corteza cerebelosa parecen ser esencialmente glutamatérgicas⁴⁰ (Fig. 10).

El Glu liberado por las neuronas glutamatérgicas interactúan con otros sistemas de neurotransmisión que convergen en los blancos de estas aferencias, actuando como potenciador de esos sistemas. Esto sucede por ejemplo en el cuerpo estriado, el cual recibe múltiples inervaciones glutamatérgicas desde la corteza cerebral, que influyen sobre la liberación estriatal de dopamina (DA) acetilcolina (ACh), GABA y serotonina (5-HT)⁴¹.

El glutamato en el proceso convulsivo.

La actividad excitadora del glutamato se demostró inicialmente por Kravits y cols.⁴² en el músculo de crustáceos, y posteriormente en el cerebro de mamíferos, donde la inyección local de agonistas glutamatérgicos, así como la estimulación de los aferencias aminoacidérgicas, producen un patrón de cambios morfológicos agudos y crónicos que son similares a los cambios encontrados en pacientes con epilepsia^{43,44,45}.

En humanos, las primeras evidencias fueron reportadas en la década de 1980^{46,47}, cuando se detectaron niveles elevados de Glu en el plasma de pacientes con epilepsia. Más recientemente, se encontró el mismo resultado en líquido cefalorraquídeo de pacientes epilépticos⁴⁸. En especímenes obtenidos de pacientes sometidos a cirugía debido a que padecen epilepsia intratable, se encontró desorganización del patrón laminar típico de la corteza debido a la presencia de grandes neuronas aberrantes, algunas piramidales y otras de formas redondeada, que han sido identificadas como neuronas excitadoras mediante técnicas inmunorreactivas⁴⁹, además se ha reportado la presencia de potenciales sinápticos espontáneos en tejido neocortical de pacientes en la misma situación, sugiriendo que estos pueden estar mediados por receptores glutamatérgicos⁵⁰.

En estudios realizados con modelos animales, se encontró que concentraciones elevadas de Glu pueden relacionarse con los procesos

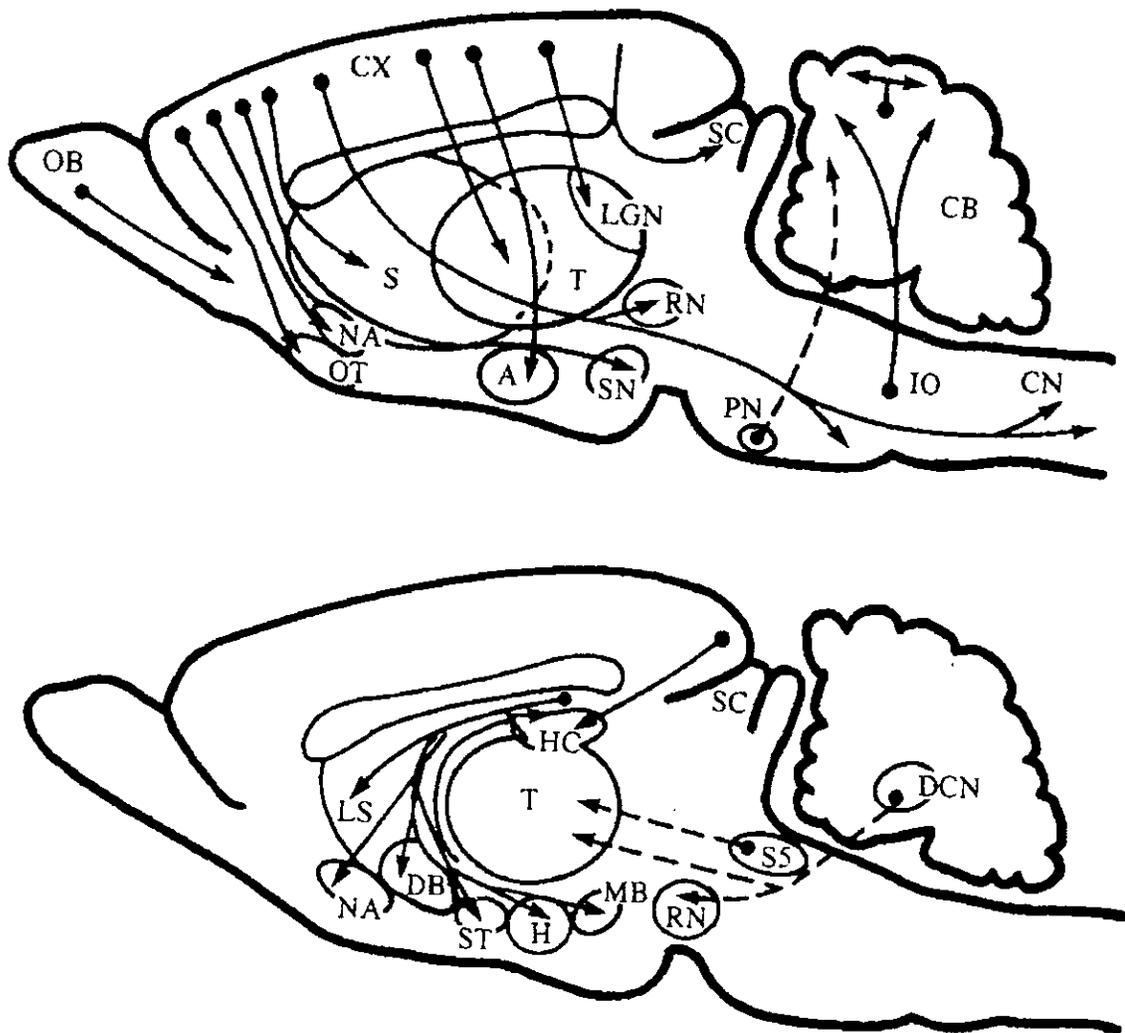


Fig. 10: Vías propuestas como glutamatérgicas. A:amígdala; CB: cerebelo, CN:núcleo cuneado; CX:corteza cerebral; DB:núcleo de la banda lateral; DCN:núcleo cerebelar profundo; H:hipotálamo; HC:hipocampo; IO:oliva inferior; LGN:nucleo geniculado lateral; LS:septum lateral; MB:cuerpo mamilar; NA:núcleo acumbens; OB: bulbo olfatorio; OT:tubérculo olfatorio; PN:núcleo pontino; RD: núcleo rojo; S:estriado; SC:colicula superior; SN: sustancia nigra; ST:núcleo basal de la estria terminal; s5:núcleo espinal del nervio 5; T:tálamo.

convulsivos, así por ejemplo, se observó un aumento significativo y preferencial de Glu en el estriado de rata en estudios realizados con microdiálisis en un modelo de inducción de crisis con 4-Aminopiridina (4-AP)⁵¹, o con pilocarpina en el hipocampo⁵². Por otro lado, las crisis inducidas con 4-AP pueden atenuarse mediante el uso de antagonistas al receptor NMDA⁵³. En preparaciones de rebanadas de la corteza entorrinal, en las cuales se produjo la aparición de descargas epileptiformes con 4-AP, se encontró que receptores glutamatérgicos están involucrados en la generación de este tipo de descargas⁵⁴. En un estudio semejante, donde se utilizaron rebanadas de corteza prefrontal y frontal, se encontró también que la producción de actividad eléctrica epileptiforme se encuentra mediada por receptores NMDA⁵⁵. El resultado de estos estudios sugiere que las descargas epileptiformes observadas son producto de la interacción del Glu endógeno con sus receptores postsinápticos.

En la corteza piriforme de ratas que fueron sometidas a un proceso de inducción de crisis por kindling, se encontró una disminución significativa en la expresión del transportador glial para Glu⁵⁶, lo que podría explicar, al menos en parte, las elevaciones del aminoácido encontradas en el fluido extracelular, tanto en humanos como en varios modelos animales. En el mismo modelo, se reportó un incremento en los sitios de unión para [³H]Glu en la corteza de ratones^{57,58}.

Estos resultados, en conjunto sugieren una participación importante del Glu en el inicio del fenómeno epiléptico.

Catecolaminas.

Las neuronas catecolaminérgicas constituyen una fracción mínima de la población neuronal total, existiendo aproximadamente 50,000 de ellas en el cerebro de rata, y probablemente no más de 2 millones en el cerebro humano, en una población estimada de 10 billones de neuronas solo en la neocorteza humana. La importancia de las neuronas catecolaminérgicas no reside pues en su número, sino en la naturaleza del efecto postsináptico del neurotransmisor

que contienen.

El término catecolamina deriva de la estructura de estos compuestos, que acopla una cadena lateral aminada con un anillo dihidroxifenilo (catecol). A este grupo pertenecen la Dopamina (DA), Norepinefrina (NE) - también llamada noradrenalina - y Epinefrina (E), conocida también como adrenalina. Estas se forman a partir del aminoácido tirosina, que se ingiere en la dieta normal, en una serie de reacciones enzimáticas intracelulares, que se mencionan a continuación (figura 11)⁵⁹:

a) Tirosina hidroxilasa (TH) es una oxidasa de función múltiple, que utiliza oxígeno molecular y tirosina como sustratos y bipterina cofactor. Cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la posición *meta* de la tirosina, para formar 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Esta enzima es soluble en el citosol, pero también puede encontrarse adherida a membranas, por medio de interacciones con fosfatidilserina, o con polianiones, como sulfato de heparan.

b) L-DOPA se convierte en dopamina (DA) por acción de la enzima Dopa descarboxilasa (DDC). La reacción tiene un alto grado de eficiencia, por lo que generalmente se observa poca cantidad de L-DOPA en neuronas dopaminérgicas. La DDC es una enzima que utiliza fosfato de piridoxal como cofactor, y para las neuronas dopaminérgicas ésta es la última fase de la vía biosintética.

c) La enzima dopamina-β-hidroxilasa (DBH) es la encargada de convertir DA en NE en las neuronas noradrenérgicas. Esto se lleva a cabo mediante la adición de un grupo hidroxilo en el carbono β de la cadena lateral de la DA. La enzima contiene dos átomos de Cu⁺⁺ que están involucrados en la reacción de transferencia de electrones. Está localizada dentro de las vesículas que almacenan NE, y por lo tanto se libera junto con el transmisor.

d) En las neuronas que contienen epinefrina (E), la feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) transfiere el grupo metilo de S-adenosilmetionina al nitrógeno de la NE, formando así una amina secundaria.

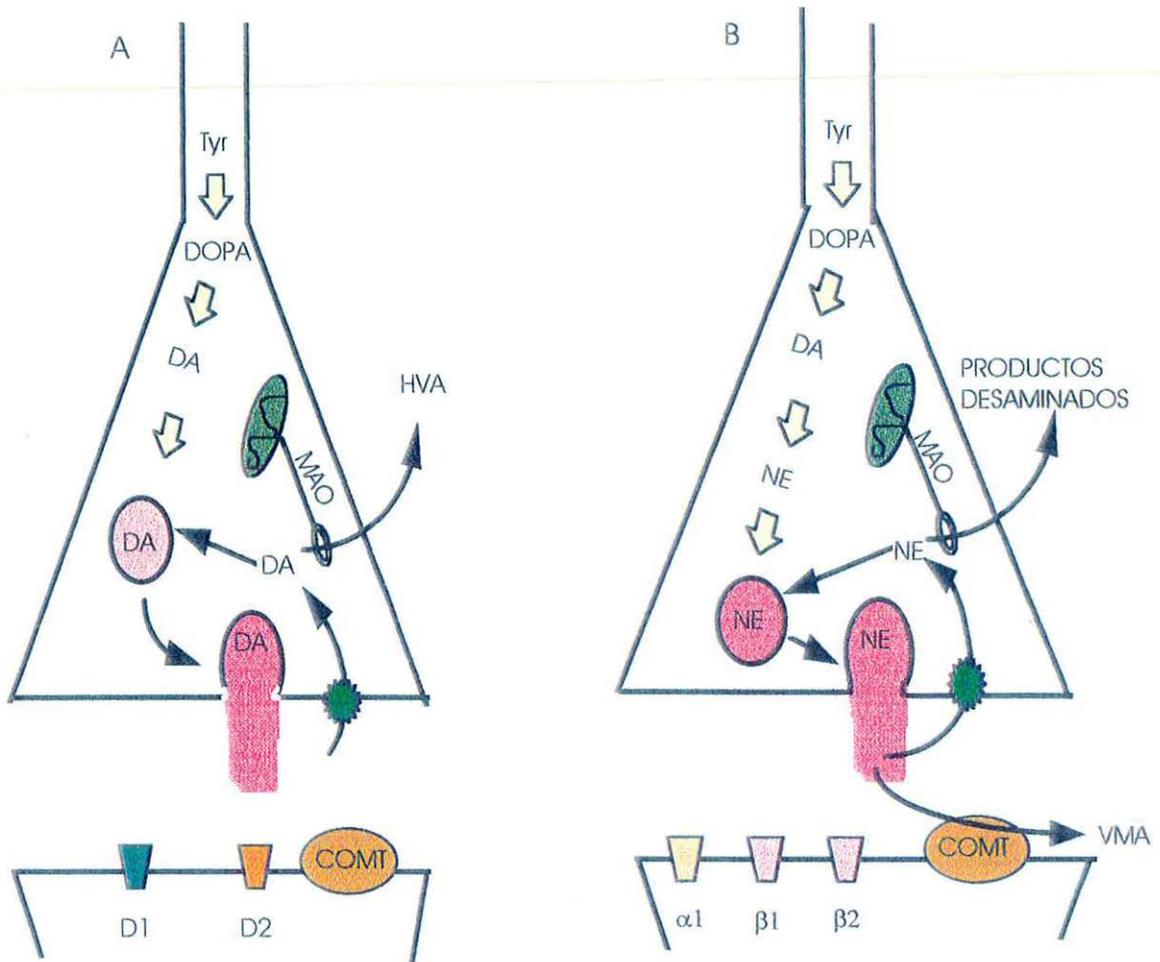


Fig. 11:A: sinapsis dopaminérgica. B: sinapsis noradrenérgica. Ambos neurotransmisores se sintetizan en la terminal catecolaminérgica y se almacenan en vesículas que se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a una entrada de Ca^{++} . Luego de su liberación, pueden interactuar con sus receptores, o ser recapturados por transportadores presinápticos.

El mecanismo que concentra a las catecolaminas en las vesículas es un proceso dependiente de Na^+ unido a una bomba de protones⁵³. La concentración típica de catecolaminas dentro de las vesículas es de aproximadamente 0.5M y existen en forma de complejo con ATP y una proteína ácida llamada cromogranina. El proceso de captura vesicular es inespecífico para varios sustratos: puede transportar una variedad de aminas biogénicas, incluyendo triptamina, tiramina y anfetaminas.

Las vesículas tienen una función doble: por un lado mantienen la disponibilidad de catecolaminas en la terminal nerviosa, y por otro lado median el proceso de liberación. Cuando un potencial de acción alcanza la terminal presináptica catecolaminérgica, se abren canales de Ca^{++} que promueven una corriente entrante de este ión a la terminal; la elevación del calcio intracelular provoca la fusión de vesículas con la membrana citoplásmica, descargando así sus contenidos solubles al espacio extracelular (Fig. 11).

Dos enzimas son las responsables de la inactivación catabólica de las catecolaminas: Monoamino-oxidasa (MAO) y catecol-*O*-metil transferasa (COMT). La MAO es una enzima que se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias, y tiene la capacidad de desaminar las catecolaminas a su aldehído correspondiente, que puede ser posteriormente oxidado, para formar un ácido, o reducido para formar un alcohol. Debido a su localización principalmente intracelular, esta enzima tiene una función estratégica en la inactivación de catecolaminas que están libres dentro de la terminal nerviosa. MAO también puede existir en la membrana de las neuronas postsinápticas y en glia. Por otro lado, COMT actúa sobre catecolaminas extracelulares transfiriendo un grupo metil del co-sustrato *S*-adenosilmetionina, al grupo hidroxilo del anillo catecol, metilando también a los metabolitos ácidos o alcoholes.

Un tercer mecanismo de inactivación de catecolaminas tiene que ver con su recaptura dentro de la terminal presináptica. El acarreador que cumple esta función obedece la cinética de Michaelis-Menten, y la captura está acoplada con gradientes de Na^+ ⁶⁰. Existen acarreadores que transportan específicamente NE en las sinapsis noradrenérgicas, y acarreadores que

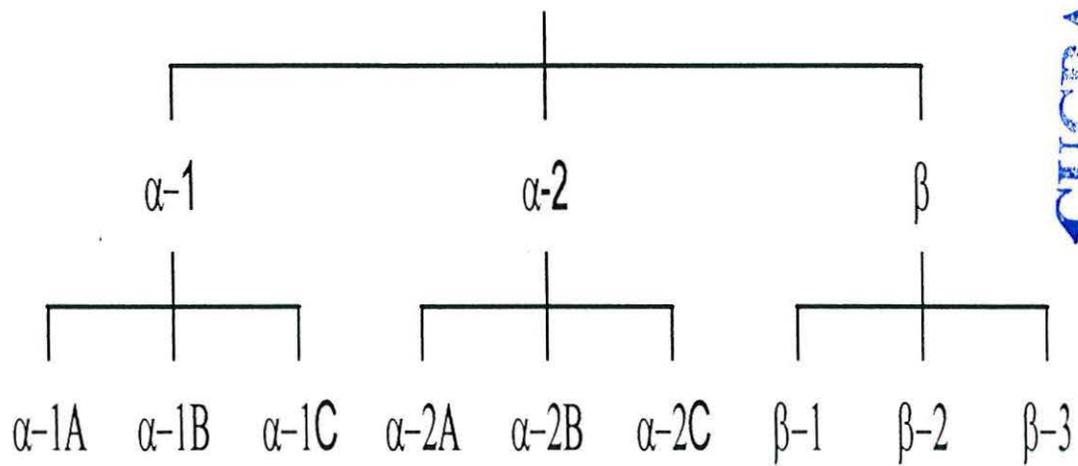
transportan inespecíficamente una variedad de aminas biogénicas en las mismas sinapsis.

La acción de NE y EPI está mediada por receptores adrenérgicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores asociados con proteínas G. Originalmente se dividió a los receptores adrenérgicos en los tipos α y β ^{59,61}; actualmente se ha demostrado la existencia de dos familias de receptores tipo α , denominadas α_1 y α_2 , cada una con varios subtipos^{59,62,63} (Fig. 12). Por otro lado, los primeros estudios⁶⁴ indican una posible correlación entre los subtipos de receptores y las vías de transducción de señales que activan, y al menos en ciertos tejidos, el receptor α_{1B} media un aumento rápido en la formación de trifosfato de 1,4,5 inositol (IP₃), y promueve la liberación de Ca⁺⁺ de almacenes intracelulares^{65,66}, mientras que los receptores α_{1A} parecen estar relacionados con mecanismos de transducción que dependen de la entrada de Ca⁺⁺ extracelular^{67,68,69}. Los tres subtipos conocidos de receptores α_2 se relacionan con la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa^{61,70,71} (tabla 1).

Del mismo modo, existen tres subtipos de receptores β adrenérgicos, de los cuales β_1 y β_2 se localizan en el cerebro y no pueden ser diferenciados en base a sus funciones fisiológicas, sino mediante el uso de antagonistas específicos (tabla 1). El subtipo β_3 está asociado con problemas de obesidad hereditaria, control del metabolismo de lípidos y desarrollo de diabetes. Su ARNm se expresa selectivamente en el tejido adiposo pardo presente en roedores y en humanos recién nacidos. Este subtipo presenta propiedades farmacológicas distintas con respecto a β_1 y β_2 ⁵⁹.

En cuanto a los receptores dopaminérgicos, inicialmente se reconoció la existencia de dos subtipos denominados D1 y D2 y actualmente se acepta la existencia de subtipos semejantes a D1 y de subtipos semejantes a D2, que se denominan D3, D4 y D5^{72,73} (Tabla 2).

Receptores adrenérgicos



CUCBA



Fig. 12: clasificación de los receptores adrenérgicos

SUBTIPOS DE RECEPTORES ADRENERGICOS

	ANTAGONISTAS	MECANISMO EFECTOR
α_{1A}	SNAP5089	?
α_{1B}		IP ₃
α_{1D}	BMY7378, SKF105854	canales de Ca ⁺
α_{2A}	OXIMETAZOLINE, BAM3	Inhibición de adenilato ciclasa
α_{2A}	ARC239, PRAZOSIN	Inhibición de adenilato ciclasa
α_{2C}	BAM1303, WB4101	Inhibición de adenilato ciclasa
β_1	PRACTOLOL, ICI89406	↑ cAMP
β_2	BUTOXAMINA, ICI118551	↑ cAMP
β_3	PINDOLOL, BRL37344	↑ cAMP

Tabla 1: Algunas características de los receptores adrenérgicos. (Fuente: Kuhar, M., Couceyro, P., Lambert, P. "Catecholamines" En *Basic Neurochemistry*, Siegel et al eds. Raven Press, 1999.

SUBTIPOS DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

	D1	D5	D2S/D2L	D3	D4
Aminoácidos (humano)	446	477	415/444	400	387
Ornitosoma	5	4	11	3	11
Vías efectoras	↑cAMP	↑cAMP	↓cAMP ↑canales K ⁺ ↓canales Ca ⁺⁺	↓cAMP	↓cAMP ↑canales K ⁺

Tabla 2: Algunas características de los receptores dopaminérgicos.
(Fuente: Kuhar, M., Couceyro, P., Lambert, P. "Catecholamines" En *Basic Neurochemistry*, Siegel et al eds. Raven Press, 1999.

Todos los receptores catecolaminérgicos tienen la topología típica de los receptores asociados con proteínas G: siete dominios transmembranales con el extremo N-terminal del lado extracelular y el extremo C-terminal del lado citoplásmico.

Sobre la base de sus principales proyecciones axonales, las fibras noradrenérgicas pueden dividirse en dos vías, que se denominan haz dorsal y haz ventral. Los cuerpos celulares de los cuales se origina el haz dorsal están contenidos en un núcleo denso localizado en el cuarto ventrículo, llamado *locus coeruleus*. Los axones de las neuronas que forman este núcleo tienen terminales en el cordón espinal y en el cerebelo, y cursan a través del haz medial del cerebro anterior para inervar la corteza cerebral entera y el hipocampo. Por otro lado, los cuerpos celulares del haz ventral envían fibras que inervan el tallo cerebral y el hipotálamo. En la porción ventral de la médula oblongada y puente existe un pequeño número de neuronas que contienen epinefrina, cuyos axones terminan principalmente en el tallo cerebral y el hipotálamo (Fig. 13).

Las neuronas que contienen DA se dividen en tres grandes grupos, con respecto al área del tallo cerebral donde se originan: nigroestriatales (grupos A8 y A9), mesocorticales o mesolímbico (grupos A10, A11) y tuberohipofisarias (grupos A12, A13 y A14). La vía dopaminérgica principal en el SNC se origina en la zona compacta de la *sustancia nigra*, que envía axones que proporcionan una inervación densa al núcleo caudado y putamen del cuerpo estriado (aproximadamente el 80% de la dopamina cerebral se encuentra en el cuerpo estriado). Las células dopaminérgicas del sistema mesocortical o mesolímbico tienen su origen en los cuerpos celulares del área tegmental ventral, y proveen una inervación difusa y modesta al cerebro anterior, incluyendo la corteza frontal y cingulada, el septum, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, y algunas regiones del sistema límbico. Las células que forman el sistema dopaminérgico tuberohipofisario se originan en el núcleo arcuato y el núcleo periventricular del hipotálamo, y envían axones que inervan el lóbulo intermedio de la pituitaria y la eminencia media. Además de estas vías, se han encontrado

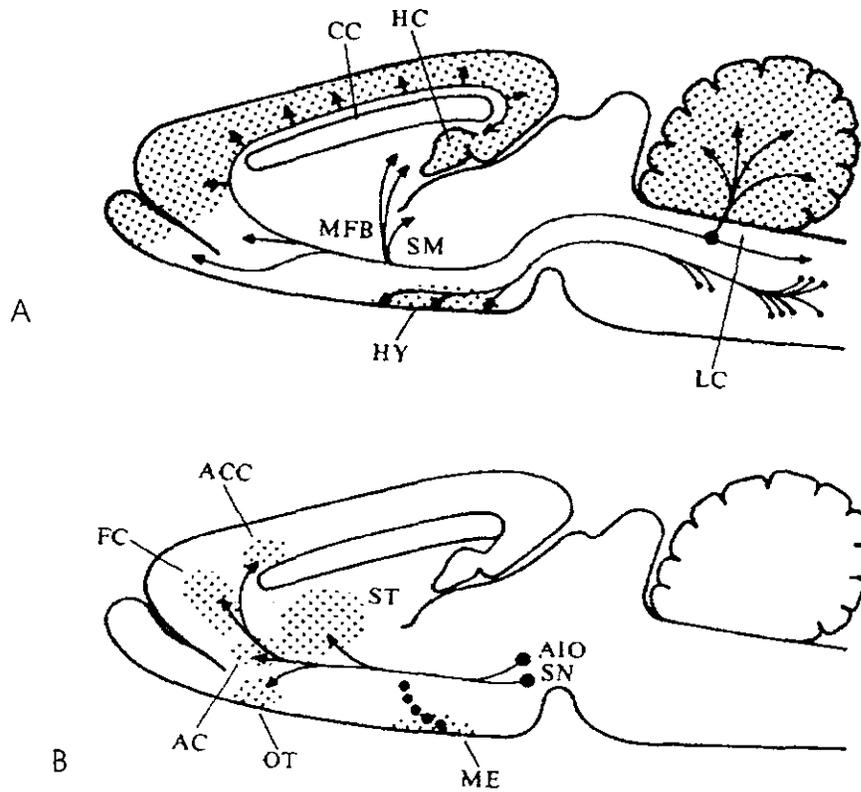


Fig. 13: A) vías noradrenérgicas, B) vías dopaminérgicas. AC: núcleo acumbens; ACC corteza cingulada anterior; CC: cuerpo calloso; FC: corteza frontal; HC: hipocampo; HY: hipotálamo; LC: locus coeruleus; ME: eminencia media; MFB: haz medial del cerebro anterior; OT: tubérculo olfatorio; SM: estria medularis; SN: sustancia nigra; ST: estriado. (Fuente: McGeer, P., McGeer, E. "Catecholamines" En *Basic Neurochemistry*, Siegel et al eds. Raven Press, 1989)

interneuronas que contienen DA en bulbo olfatorio (grupo A16), y en la porción neural de la retina (grupo A15) (Fig. 13).

Las catecolaminas en el proceso convulsivo.

Al igual que para el glutamato, existen evidencias que involucran a las catecolaminas en el fenómeno epiléptico. Una de las primeras líneas de investigación que ligan a las catecolaminas con los fenómenos epilépticos, viene del estudio de animales que muestran propensión genética a padecer epilepsia, sobre todo de una cepa de ratas que se derivó de la Sprague-Dawley, y que es comúnmente llamada ratas genéticamente propensas a epilepsia (RGPE).

Los primeros estudios realizados en este modelo muestran que las neuronas del sistema noradrenérgico central tienen una participación importante en la protección contra de las crisis presentadas por estos animales^{74,75,76}, demostrándose poco después que la deficiencia en NE es innata en esta cepa y no depende de la ocurrencia previa de crisis⁷⁷, y que parece haber áreas cerebrales que tienen que ver con la susceptibilidad y áreas que tienen que ver con la severidad de las crisis en este modelo⁷⁸.

En otro tipo de estudios utilizando este modelo, se demostró que la administración intracerebral de NE⁷⁹ o de drogas que inducen incrementos en su concentración, entre las que se encuentran varias sustancias clasificadas como antidepresivos⁸⁰, tienen efectos anticonvulsivos en las RGPE. Recientemente, el mismo grupo de investigadores encontró que las deficiencias de NE, específicamente en el colículo superior, pueden estar involucradas en la regulación de las crisis presentadas en el modelo, y que además esta regulación podría estar mediada por receptores del tipo α ⁸¹. Por otro lado, se encontró una deficiencia en el desarrollo de extensiones neuríticas de neuronas del *locus coeruleus* (LC) en RGPE, lo que podría tener una relación con las bajas concentraciones de NE encontradas en los campos terminales de las neuronas de este núcleo⁸², así como también se han observado alteraciones en la expresión de ARNm de tirosina hidroxilasa y transportadores de NE en estos animales⁸³.

En el modelo del kindling, se midió la liberación de NE en el hipocampo como resultado de las crisis, encontrándose una marcada reducción de este neurotransmisor a largo término, lo que podría reflejar una degeneración funcional de las aferencias que vienen del LC⁸⁴. En contraste, las drogas que aumentan de alguna manera la liberación de NE suelen tener efectos atenuantes sobre las crisis inducidas con este modelo^{85,86}.

En un interesante intento por demostrar que la inervación catecolaminérgica del LC es determinante para controlar el desarrollo de las crisis, Kokaia y cols.⁸⁷ implantaron un injerto de LC fetal en ratas a las cuales se les había extraído ese núcleo, observando que las conexiones sinápticas que se establecieron entre el injerto y el hipocampo eran suficientes para proteger a los animales de las crisis producidas por kindling. Estas evidencias señalan al sistema noradrenérgico del LC como factor importante en la epileptogénesis por kindling. Existe la idea de que la acción protectora de la NE en este modelo está mediada por activación de receptores del tipo α_2 , ya que se ha observado que el bloqueo de estos receptores anula el efecto anticonvulsivante de la NE⁸⁶.

En pacientes sometidos a ablación del foco epiléptico localizado en la neocorteza temporal, se reportó un incremento en la concentración total de catecolaminas en el tejido, con respecto a la región circundante al foco⁸⁸. En especímenes corticales obtenidos de la misma manera, y por medio de técnicas de citoarquitectura e inmunocitoquímicas, se encontraron alteraciones tanto en la distribución laminar como en la densidad de fibras catecolaminérgicas en las áreas de inicio de crisis, lo que evidencia una asociación entre la actividad epiléptica crónica y alteraciones en la neurotransmisión catecolaminérgica, y según los autores, estas alteraciones podrían estar involucradas en la limitación de la actividad de crisis⁸⁹.

En fluido cerebroespinal obtenido por punción lumbar de pacientes que sufren crisis parciales complejas y crisis tónico-clónicas secundariamente generalizadas, los niveles detectados de NE fueron mayores dos horas después de una crisis parcial compleja (período postictal) que en cualquier otro momento medido, y aún más altos después de una crisis tónico-clónica secundariamente

generalizada, en comparación con sujetos control⁹⁰.

Con respecto a la DA, su participación en las crisis todavía no se ha establecido claramente. A pesar de esto, algunos investigadores han logrado establecer una relación entre alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y crisis, aunque si bien algunos autores encuentran elevaciones en los niveles extracelulares de DA en respuesta a una variedad de estímulos inductores de crisis, otros tantos encuentran disminuciones, y aún ausencia de cambios en este neurotransmisor^{91,92,93,94}.

4-Aminopiridina

La 4-aminopiridina (4-AP) es un bloqueador de los canales de potasio activados por voltaje que se encuentran en la membrana citoplásmica de las neuronas, y cuya activación tiene el efecto de retardar el cierre de los canales de Ca^{++} , aumentando así la entrada de este ión a la célula, lo que se traduce en un incremento de la liberación de neurotransmisores, esto de manera general e inespecífica, independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie⁹⁵. Cuando se administra por vía intraperitoneal (ip) o intracerebral (ic) induce crisis convulsivas en diferentes especies de mamíferos⁹⁶.

La aplicación de 4-AP en preparaciones de neuronas de varias regiones cerebrales produce actividad epileptiforme interictal, lo que se ha observado en el área CA3 del hipocampo⁹⁷, en neuronas de la amígdala de rata⁹⁸, en neuronas neocorticales⁵⁴, y en neuronas neostriatales⁹⁹.

En preparaciones de placa neuromuscular, la 4-AP aumenta la ocurrencia de potenciales postsinápticos excitadores^{100,101}, la excitabilidad eléctrica de la membrana y la actividad mecánica espontánea¹⁰², además de prolongar la duración del potencial de acción¹⁰³. En preparaciones cerebrales tales como sinaptosomas de ratón, produce un aumento en la liberación espontánea de GABA) Glu y ACh de una manera dependiente de Ca^{++} ^{104,105}, mientras que en rebanadas y sinaptosomas de estriado induce un aumento en la liberación espontánea de DA y ACh^{106,107}. La aplicación intraestriatal de 4-AP a través de sondas de microdiálisis, induce aumentos similares en la liberación de

DA y Ach¹⁰⁸, así como de Glu⁵¹.

En general, se acepta que la 4-AP actúa sobre el lado citoplásmico del canal de K⁺¹⁰⁹, aunque el mecanismo de bloqueo no ha sido completamente caracterizado. Se sabe que la 4-AP atraviesa la membrana en su forma no-cargada y se asocia con protones en el citosol^{110,111}. Una vez en su forma activa (catiónica), se cree que la droga se une a la región S4 del canal, inactivándolo por medio de fuerzas electrostáticas o estéricas¹¹³. Posiblemente la 4-AP pueda unirse a cargas negativas fijas sobre la superficie interna de la membrana plasmática^{113,114} (Fig. 14).

Aunque el efecto de la 4-AP sobre la liberación espontánea de neurotransmisores parece depender de la presencia de calcio extracelular¹⁰⁶, se ha sugerido que otras reservas intracelulares del ión pueden estar interviniendo^{104,115}. Al respecto, algunos autores han postulado que la droga facilita el acoplamiento entre el Ca⁺⁺ intracelular y la liberación de transmisores en la membrana presináptica, debido a que es capaz de inducir la liberación de transmisores sin necesidad de que exista un estímulo despolarizante^{104,116}. Otros autores¹¹⁷ proponen que la 4-AP actúa induciendo potenciales de acción repetitivos, y que esto conduce a la apertura aleatoria de canales de Ca⁺⁺ transitorios.

El patrón de crisis inducido por la administración intraperitoneal (ip) de la droga es similar al observado con ácido kainico y Glutamato monosódico (GMS)^{53,118,119}; se presenta un periodo convulsivo largo con una etapa de hiperexcitabilidad inicial seguida de convulsiones clónicas y tónico-clónicas, y muerte durante una convulsión tónica en algunos casos.

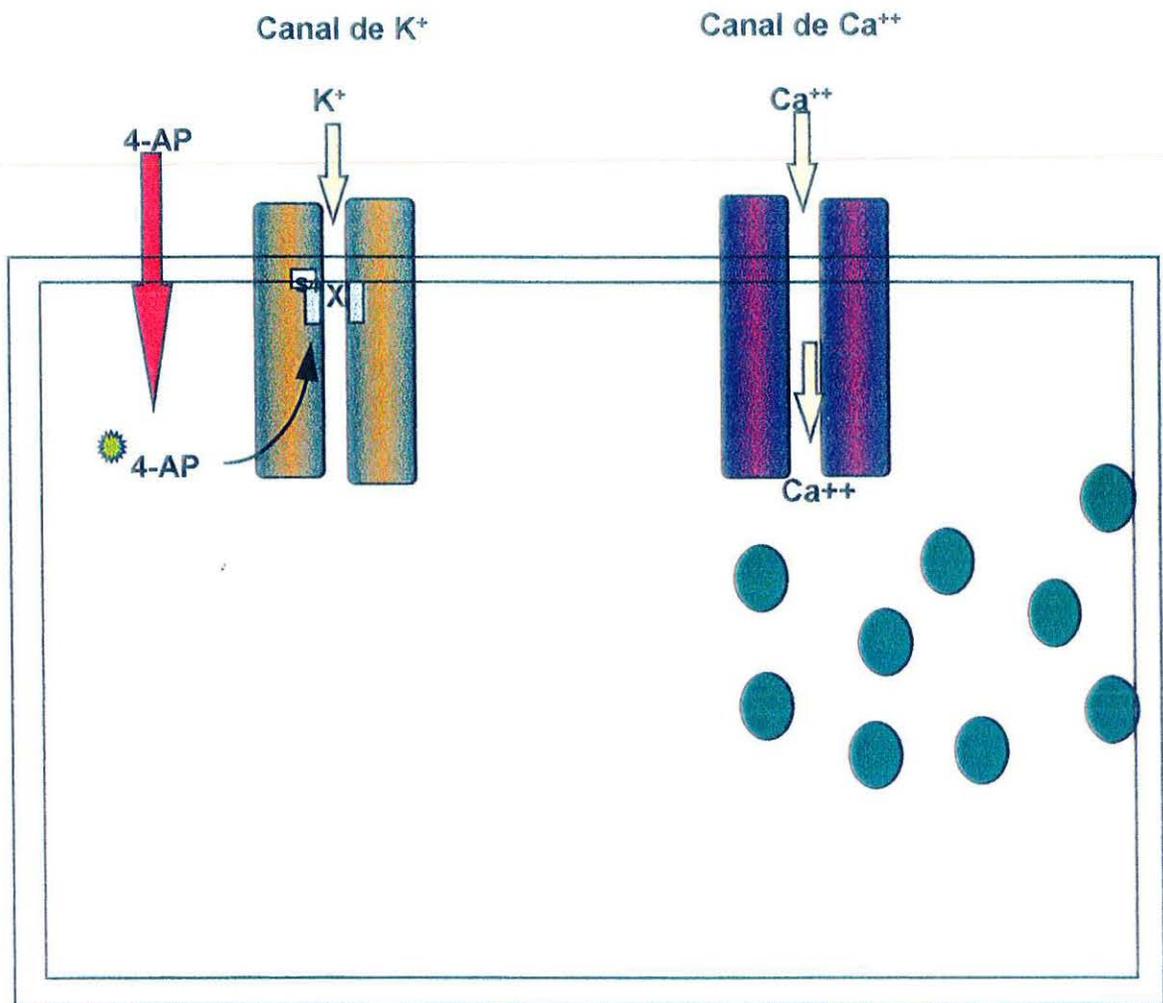


Fig. 14: Mecanismo propuesto para la acción de la 4-AP. La droga pasa la membrana plasmática y se asocia con protones en el citosol. En esta forma cargada puede interaccionar con la región S4 del canal de K^+ inactivándolo, lo que provoca la apertura de canales de Ca^{++} que aumentan la liberación de neurotransmisores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las crisis convulsivas han sido extensamente estudiadas con una gran variedad de técnicas bioquímicas, morfológicas y electrofisiológicas, generalmente en regiones del circuito límbico, como el hipocampo, y generalmente en preparaciones que aíslan las regiones elegidas de sus conexiones sinápticas normales. Además, la mayoría de los estudios se hacen monitoreando las alteraciones bioquímicas o fisiológicas en la misma región donde se produce el estímulo, o en su cercanía, y pocos estudios se han hecho en otras zonas cerebrales *in vivo*, lo que implica un modelo con todos sus sistemas de neurotransmisión intactos, así como las relaciones que se establecen entre estos sistemas. Por otro lado, es importante determinar los efectos locales y a distancia de las crisis, a fin de contribuir al entendimiento de los mecanismos de generalización de las descargas epileptiformes, esto en otras regiones fuera del circuito límbico que también son epileptogénicas, como la corteza motora. Esto hace necesario el desarrollo de metodología que permita obtener una correlación bioquímica-fisiológica simultánea de las regiones estudiadas.

En este trabajo se utilizó la 4-Aminopiridina como herramienta de inducción de crisis debido a que semeja en cierta medida la liberación inespecífica de neurotransmisores que ocurre en la epilepsia "natural", por lo que constituye un modelo adecuado para observar los cambios bioquímicos y electroencefalográficos locales durante el inicio y generalización de las crisis producidas en la corteza motora primaria, tanto en la zona de infusión como en una zona de proyección.

HIPOTESIS

Si los aminoácidos excitadores (AAE), entre ellos el glutamato, son fundamentales en la iniciación de las crisis convulsivas, y las catecolaminas parecen participar en este fenómeno, luego entonces la administración de 4-aminopiridina en la corteza motora primaria producirá la liberación de los AAE y catecolaminas relacionados con el fenómeno de crisis, en el área de infusión de la droga. Esta liberación de neurotransmisores producirá hiperexcitabilidad local que deberá propagarse al área contralateral.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de AAE y catecolaminas en un modelo de inducción de crisis con 4-aminopiridina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar simultáneamente los cambios bioquímicos y electroencefalográficos inducidos por la infusión de 4-aminopiridina en la corteza motora primaria derecha (área de infusión).
- Determinar los cambios bioquímicos y electroencefalográficos en la corteza motora primaria izquierda (área de proyección) inducidos por la propagación de la hiperexcitabilidad inicial producida en la corteza motora primaria derecha.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de los objetivos del presente trabajo, hemos diseñado un aparato que permite realizar estudios bioquímicos mediante la implantación de dos sondas de microdialisis, y obtener el registro electroencefalográfico en el área donde se lleva a cabo la diálisis, esto de manera simultánea.

El diseño consiste de un *swivel* de teflón, de la marca BAS (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN), que ha sido modificado en su parte superior (parte fija). A esta parte se le adaptaron cinco anillos de latón de 1 mm, cada uno de ellos aislado eléctricamente y con un surco en la parte externa. A la parte interna de cada anillo se soldó un alambre aislado de cobre y el conjunto de los alambres se pasó entre la pared del *swivel* y los anillos. A la parte móvil se le adaptó un cilindro de teflón adyacente y de igual manera se montaron sobre él cinco anillos aislados, cada uno con dos agujas soldadas, separadas 180°, las cuales se hicieron coincidir con el surco correspondiente del anillo de la parte fija. A una de las agujas de cada par se le soldó un alambre. Cuatro de ellos se usaron como cables de registro y uno de referencia. Este diseño permite la continuidad eléctrica entre las partes fija y móvil del *swivel* aún cuando la rata se esté moviendo (Fig. 15).

Por otro lado, se elaboraron, también en nuestro laboratorio, las sondas de microdialisis concéntricas con piezas obtenidas comercialmente (Small Parts, Inc; Miami, FL). Estas sondas tienen una superficie activa de membrana de 2 mm de longitud. A cada sonda se le pegó un par de alambres barnizados de cobre, de aproximadamente 125 μm de diámetro, que funcionaron como electrodos bipolares. Los alambres tienen una separación aproximada de 100 μm , y se pusieron tan cerca de la superficie activa de la membrana de diálisis como fue posible. El otro extremo de cada alambre fué soldado al conector fijado en la cabeza de la rata.

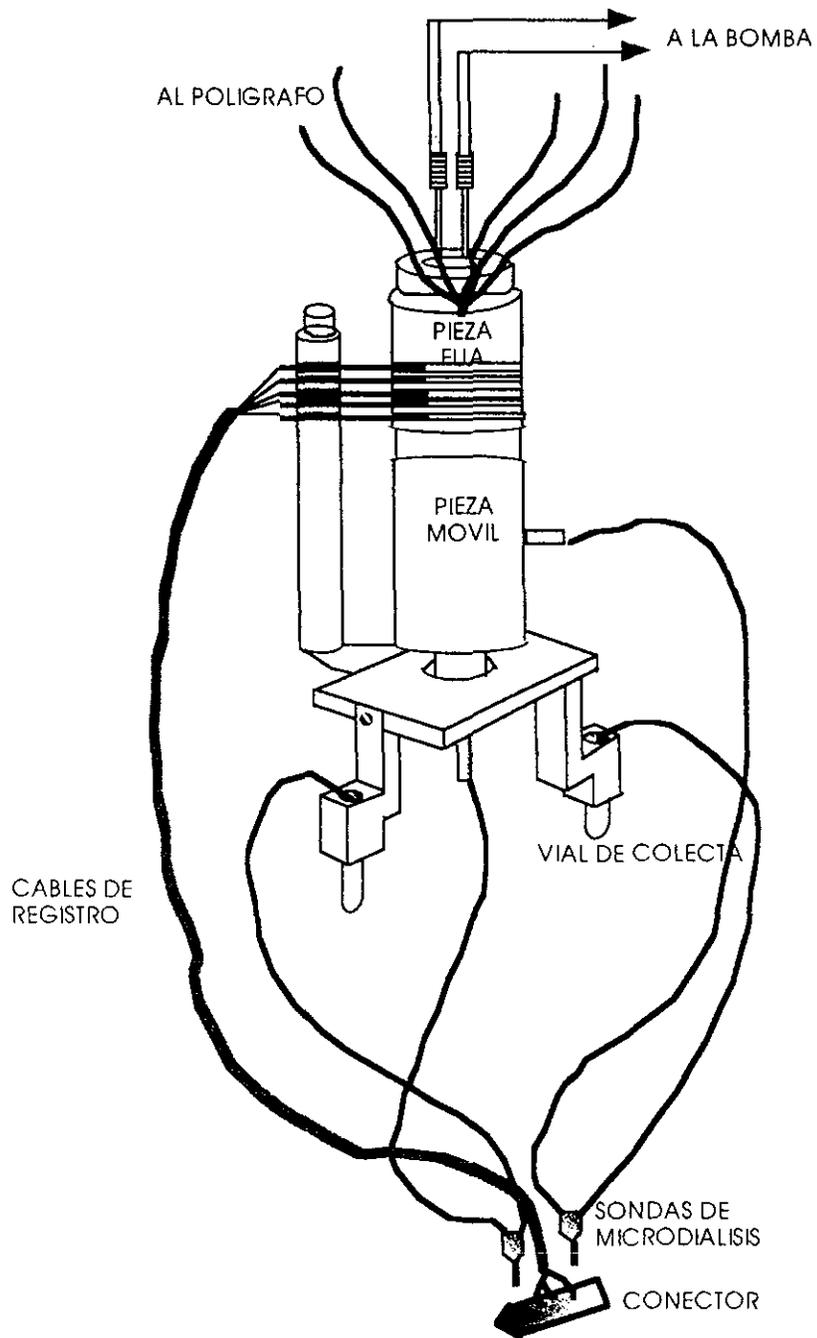


Fig. 15: Esquema de la torre para microdiálisis en libre movimiento. Las sondas de microdiálisis van dentro del tejido cerebral, y el conector va sobre la cabeza de la rata.

Cirugía estereotáxica.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, con un peso entre 240 y 260 g., las cuales se mantuvieron en condiciones de ciclos 12 X 12 de luz-oscuridad, temperatura constante entre 18 y 22°C, y libre acceso al agua y alimento hasta el día de experimentación. Para la realización de la cirugía, se procedió a anestésiar al animal en una cámara donde el aire circundante contenía el anestésico volátil halotano. Una vez anestesiado, el animal se montó en el aparato estereotáxico, donde continuó recibiendo anestésico hasta el final de la cirugía. Se afeitó la parte superior de la cabeza, se limpió la parte afeitada y se realizó una incisión en el cuero cabelludo sobre la línea media de la cabeza. Se retiró el tejido conjuntivo que se encuentra adherido al cráneo con el objeto de visualizar las suturas craneales, y localizar bregma. Luego de localizar bregma, se instaló en la columna del instrumento estereotáxico una cánula guía, que consiste en un tubo de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro externo, y 13 mm de longitud, y se trasladó hasta quedar encima de bregma, punto desde el cual la columna se desplazó hacia las coordenadas estereotáxicas para la corteza motora derecha, (ap: 2.0mm; l: \pm 2.5mm; v: 1.5mm) según el atlas de Paxinos y Watson¹²⁰. Posteriormente se realizó un trépano de paredes lisas en el cráneo de la rata, sin tocar la superficie del encéfalo. La cánula guía se introdujo cuidadosamente en el trépano, quedando posicionada sobre la superficie del cerebro, apenas atravesando el hueso del cráneo. Una vez realizado esto, la cánula guía se fijó con cemento dental sobre el hueso. El mismo procedimiento se realizó para colocar la cánula guía en la corteza motora izquierda. Se implantaron además dos tornillos en el área circundante a las guías, que se utilizaron para proporcionar sostén a las mismas. Un tercer tornillo que tenía soldado un alambre de cobre se sujetó en la parte frontal del cráneo, y sirvió como electrodo de referencia. Después de terminado este procedimiento, las sondas de microdiálisis se insertaron cuidadosamente dentro de las cánulas guías. Una vez ahí, se fijaron firmemente en su sitio mediante unas anclas metálicas que se pegaron al pie de las cánulas guías, por medio de hilo de

resorte. Las sondas se perfundieron todo el tiempo, desde el inicio de la cirugía con solución Krebs-Ringer oxigenada, que tenía la siguiente composición: NaCl 118 mM; KCl 4 mM, K_2PO_4 1.25 mM; $MgSO_4$ 1.17 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; $CaCl_2$ 2.2 mM y Glucosa 10 mM, con un pH 7.4, a una velocidad de flujo de $2.5 \mu L$ por minuto, utilizando para esto una bomba de microinyección marca BAS. Los electrodos pegados a la sonda de microdiálisis se soldaron sobre los dientes del conector, así como el alambre que sirvió como electrodo de referencia. Después el conector se fijó al cráneo con cemento dental, y todos los elementos colocados durante la cirugía fueron envueltos con *parafilm*.

Una vez terminada la cirugía, se retiró el anestésico y se pasó al animal a una caja de acrílico adaptada para experimentos de microdiálisis en libre movimiento, donde el conector que quedó sobre la cabeza de la rata se acopló con el sistema de registro y las salidas y entradas de las sondas de microdiálisis se conectaron con las mangueras correspondientes del sistema de diálisis.

Experimentos de Microdialisis.

Después de un período de equilibrio de 180 min, se colectaron fracciones de 15 min cada una, bajo el siguiente diseño experimental:

- fracciones 1-3: basales, (sin tratamiento)
- fracción 4: infusión de 4-AP 75mM, disuelta en el medio Krebs-Ringer, sólo en la corteza derecha
- fracciones 5-10: regreso a condiciones iniciales (sin tratamiento)

Las fracciones se colectaron en HCl 0.01M para prevenir la oxidación de las catecolaminas. Cada fracción se dividió en dos partes, tomándose $25 \mu L$ para determinar catecolaminas, y aproximadamente $12.5 \mu L$ para determinar aminoácidos.

Cuantificación de Catecolaminas y Aminoácidos.

La concentración de catecolaminas en el dialisado se determinó por

medio de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC Waters), con detección electroquímica, de acuerdo con el método de Marsden y Joseph¹²¹, utilizando columnas C18, de 30 cm de longitud por 0.5 cm de diámetro, y un detector amperométrico marca BAS modelo LC-4B, con un voltaje de oxidación de 0.85V y una sensibilidad de 50 nA. La fase móvil consistió de NaH₂PO₄ 0.1mM, EDTA 0.1 mM, y Acido Octano-Sulfónico 2 mM, con un pH de 3.78, en una forma isocrática con 10% de metanol, a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. Este método permite la determinación de varias monoaminas, entre las que están NE, DA, VMA, HVA, DOPAC, EPI y 5-HT.

La fracción obtenida para aminoácidos se derivatizó con el mismo volumen de o-phtalaldehido , y tres minutos después se inyectaron 20 µL de la mezcla en un sistema de HPLC (Beckman) con columna ODS de 25 cm de longitud por 4 mm de diámetro interno, y con una fase móvil compuesta de Metanol/Acetato de Potasio 0.1 M pH 5.5 a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min en un gradiente lineal de 15 minutos de duración, desde una concentración de 25% hasta una de 75% de metanol en la fase móvil. La detección fue fluorométrica en este caso.

Una vez terminado el experimento, se sacrificó al animal para obtener su cerebro, y determinar la localización de las sondas de microdiálisis, por medio de verificación visual. Sólo se incluyeron los resultados obtenidos de los animales que presentaron una localización correcta de las sondas.

Los resultados obtenidos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA), tomándose como diferencias estadísticamente significativas aquellas con una $p < 0.05$, con respecto al valor basal. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

Valoración Conductual.

Aproximadamente 10 minutos después del inicio de la infusión de 4-AP, los animales mostraron un incremento en la actividad locomotora normal, así como irritabilidad, seguida por movimientos de la cabeza, movimientos masticatorios, y aproximadamente 30 minutos después se observó actividad convulsiva, caracterizada por la aparición de extensiones clónicas de las extremidades anteriores seguidas por convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Después de 25-35 minutos de iniciada la infusión de la droga, los animales entraron en "estatus epilepticus", mismo que se mantuvo durante el resto del experimento. Debido a la intensidad de las convulsiones presentadas, se hizo necesario sostener al animal a partir de la fracción 6.

Valoración electroencefalográfica.

Las alteraciones motoras descritas en el apartado anterior estuvieron acompañadas por descargas epileptiformes en el registro EEG. Estas descargas iniciaron en la corteza infundida con 4-AP (derecha) con una latencia de 15 ± 4 min después del inicio del período de infusión. Las descargas estuvieron caracterizadas por poliespiplas y complejos punta-onda que presentaron baja frecuencia y amplitud al inicio, y fueron aumentando en ambos parámetros, para alcanzar un valor máximo aproximadamente 45 min después. En la corteza contralateral (izquierda) se observó un patrón de descargas electrográficas similar al descrito para la corteza de infusión, mostrando variación solamente en la latencia, que en ésta región fué de 22 ± 7 min. (Fig. 16)

Concentraciones de Catecolaminas y Glutamato.

En el presente trabajo se encontraron modificadas las concentraciones extracelulares de Glu y de las catecolaminas NE, DA y VMA, con respecto a su valor basal.

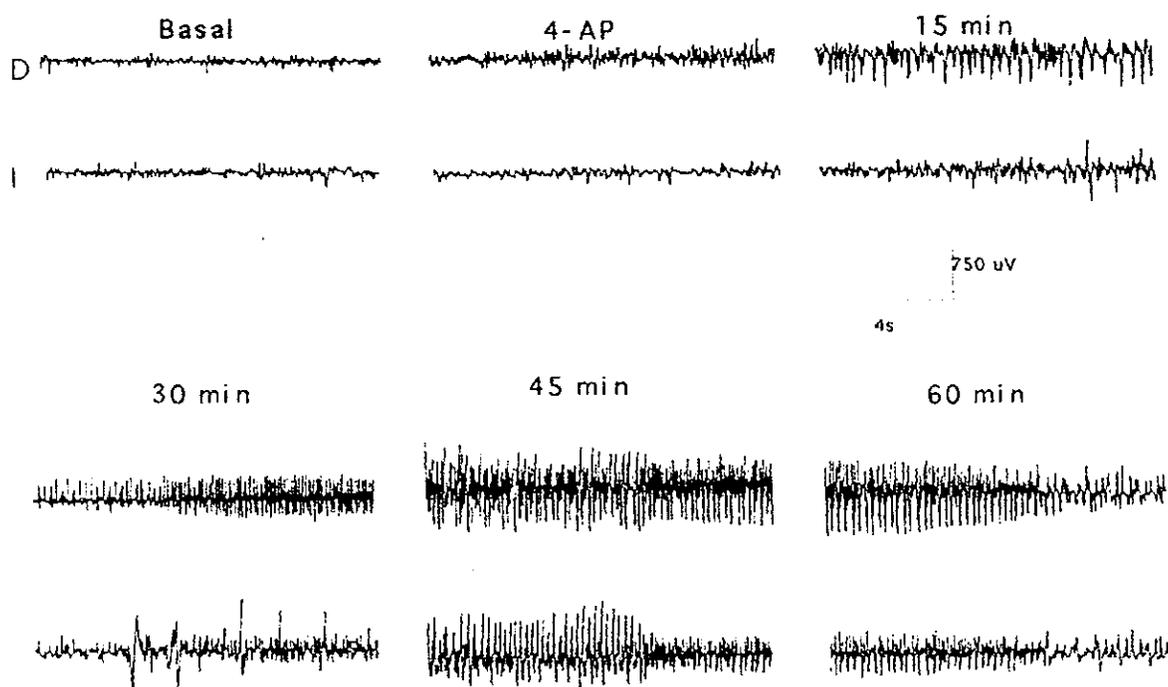


Fig. 16: Registro EEG típico obtenido según la sección de material y método. Basal: registro obtenido durante las tres primeras fracciones (sin tratamiento), antes de la infusión de 4-AP. 15 min: registro obtenido en la fracción 5; 30 min: registro obtenido en la fracción 6; 45 min: registro obtenido en la fracción 7; 60 min: registro obtenido en la fracción 8.

Las concentraciones basales de los compuestos detectados en el dialisado fueron las siguientes, sin considerar la recuperación de las sondas, para las regiones derecha e izquierda respectivamente (μM): Glu: 1.30 ± 0.271 , 1.162 ± 0.333 ($n = 4$); NE: 0.040 ± 0.016 , 0.037 ± 0.019 ($n = 5$); VMA: 1.65 ± 0.317 , 1.48 ± 0.036 ($n = 6$); DA: 0.013 ± 0.004 , 0.012 ± 0.003 ($n = 6$) (Tabla 3).

Los niveles extracelulares de glutamato en la corteza infundida, mostraron su mayor incremento en la fracción de infusión de la 4-AP (4 veces con respecto a su basal), cayendo bruscamente en la siguiente fracción, y mostrando una recuperación parcial en la fracción 6. En el lado contralateral, el glutamato muestra una elevación única hacia la fracción número 7 (Fig. 17).

Los niveles de NE en la corteza derecha se incrementaron en mayor medida durante la fracción de infusión de la droga (2.4 veces con respecto a su basal), manteniéndose ligeramente elevados durante las siguientes dos fracciones, para luego disminuir inclusive más abajo del nivel basal. En la corteza contralateral, el nivel detectado en el dialisado se mantuvo similar al basal mostrando elevación estadísticamente significativa hacia la fracción número 9 (Fig. 18).

El VMA muestra una elevación pequeña, pero que es suficiente para ser estadísticamente significativa, hacia la fracción 6 en la corteza de infusión, manteniéndose elevada hasta el final de la colecta. En la corteza contralateral, este metabolito de la NE se incrementa inicialmente en la fracción 6, mostrando un aumento máximo hacia la fracción número 8, y manteniéndose elevado hasta el final del experimento (Fig. 19).

La DA en la corteza infundida muestra una elevación que inicia en la fracción cuatro y alcanza un incremento máximo en la siguiente fracción (15 veces con respecto a su basal), para luego disminuir, manteniéndose sin embargo sobre el nivel basal durante el resto del experimento. En la corteza izquierda, esta catecolamina se mantiene en los niveles basales hasta la fracción 8, donde se observó un aumento significativo y transitorio en su nivel extracelular (Fig. 20)

	DERECHA	IZQUIERDA
GLUTAMATO (n=4)	1.30 ± 0.271	1.162 ± 0.333
NOREPINEFRINA (n=5)	0.040 ± 0.016	0.037 ± 0.019
AC. VANILMANDELICO (n=6)	1.65 ± 0.317	1.48 ± 0.036
DOPAMINA (n=6)	0.013 ± 0.004	0.012 ± 0.003

Tabla 3: Valores basales de los neurotransmisores detectados. Cada valor es la media de tres determinaciones ± error estándar.

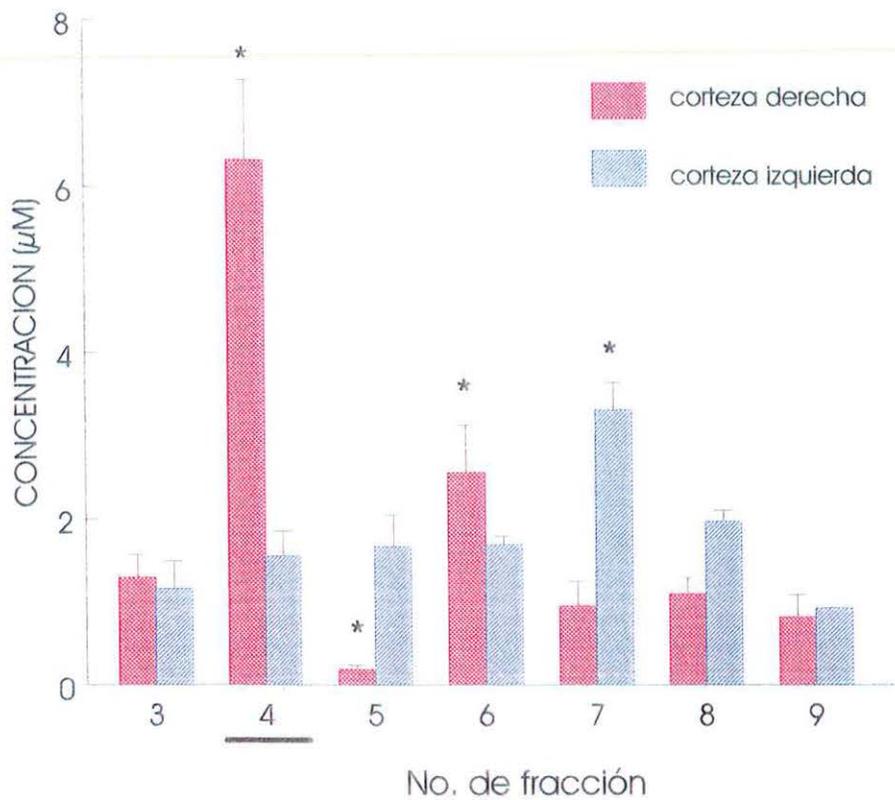


Fig. 17: niveles extracelulares de Glu. El valor basal (fracción 3) es la media de las tres primeras colectas. El mayor aumento se observa en la fracción número 4 en la zona de infusión, y en la fracción 7 en la zona de proyección (n=4). * p<0,05 con respecto al valor basal.

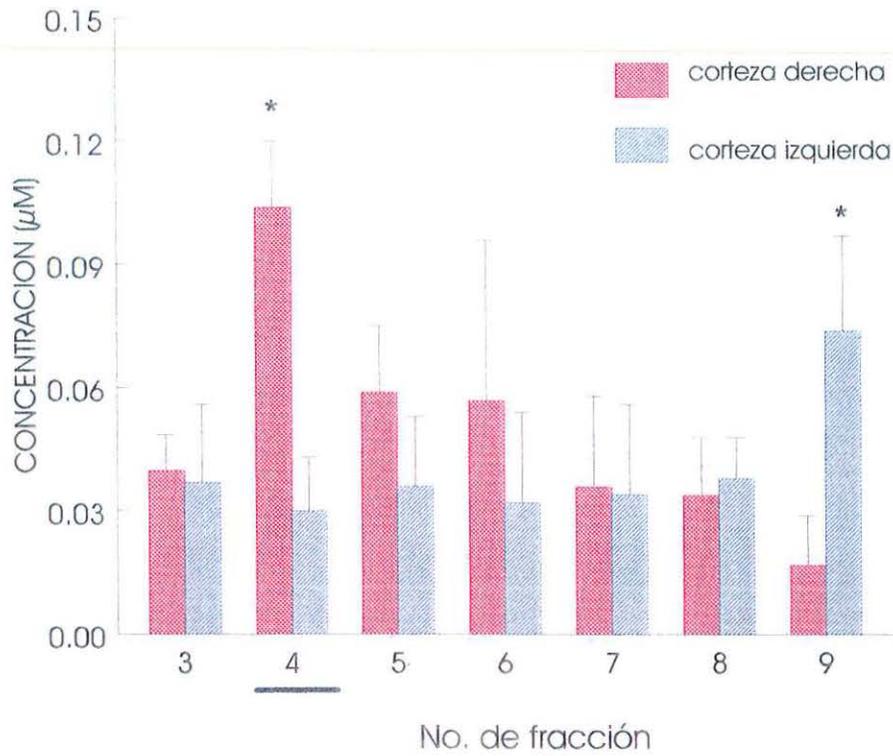


Fig. 18: Niveles extracelulares de NE. El valor basal (fracción 3) es la media de las tres primeras colectas. El mayor aumento se observa en la fracción número 4 en la zona de infusión, y en la fracción número 9 en la zona de proyección (n=5). * $p < 0.05$ con respecto al valor basal.

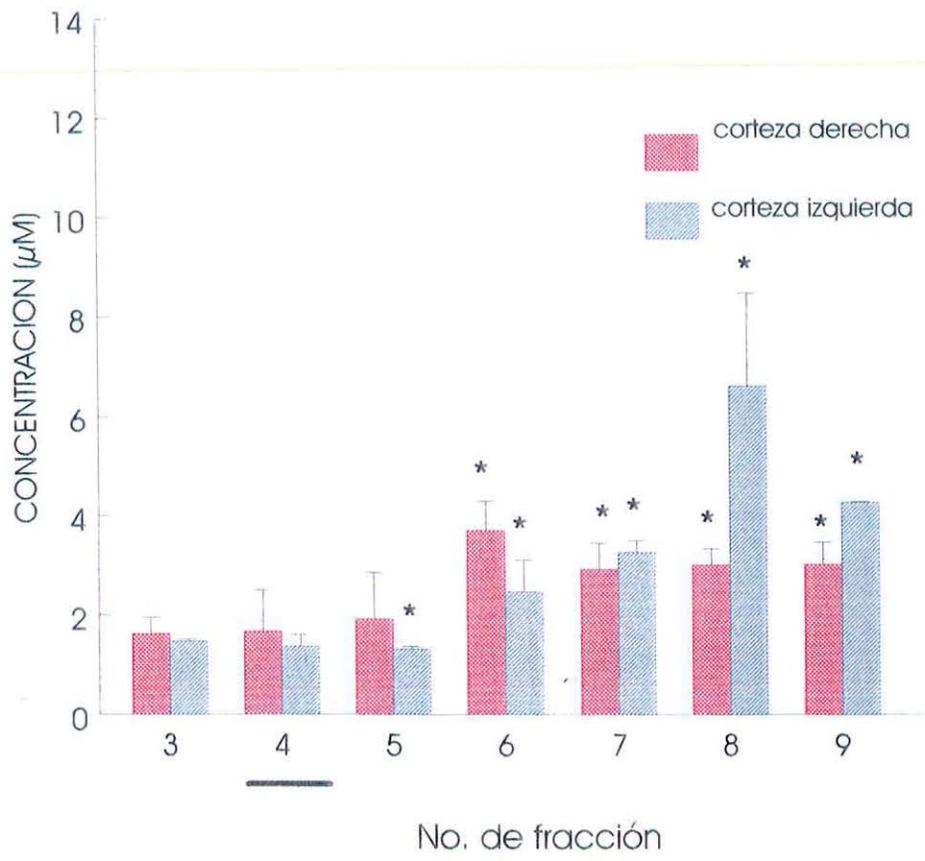


Fig. 19: Niveles extracelulares de VMA. El nivel basal (fracción 3) es la media de las tres primeras colectas. El mayor aumento se observa en la fracción 6 en la zona de infusión, y en la fracción 8 en la zona de proyección. (n=6) *p<0.05 con respecto al valor basal.

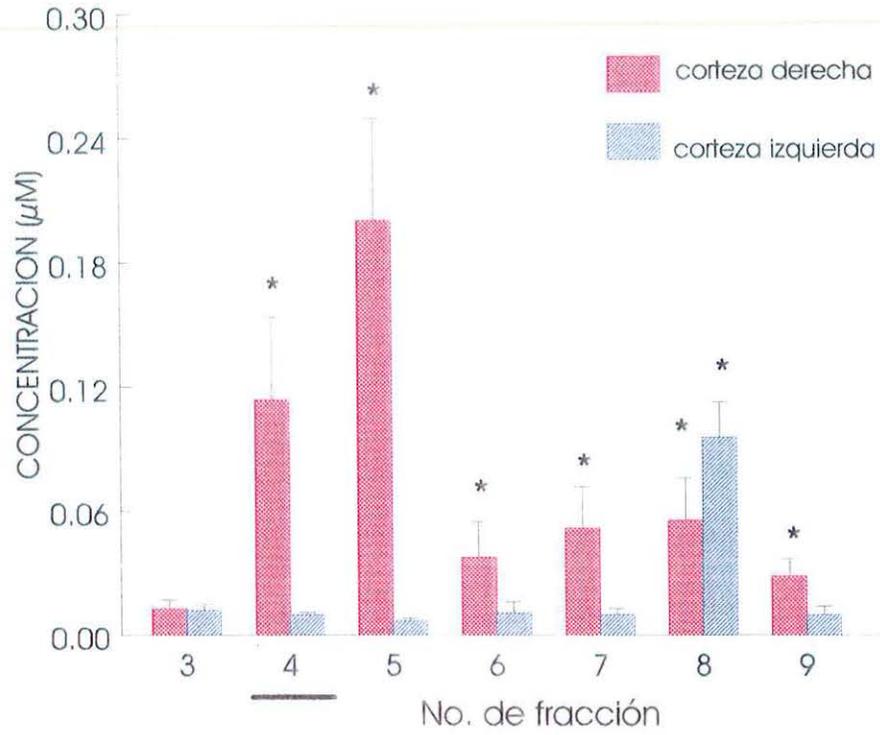


Fig. 20: Niveles extracelulares de DA. El valor basal (fracción 3) es la media de las tres primeras colectas. El mayor aumento se observa en la fracción 4 en la zona de infusión, y en la fracción 8 en la zona de proyección (n=6). * $p < 0.05$ con respecto al valor basal.

DISCUSION

El objetivo principal de este trabajo fué tratar de establecer la participación diferencial de algunos neurotransmisores en un modelo de inducción de crisis, para lo cual se observaron las alteraciones bioquímicas y electroencefalográficas producidas por la administración intracortical de 4-aminopiridina, infundida mediante una sonda de microdiálisis, tanto en la zona de infusión de la droga como en el área contralateral.

Se observaron cambios en las concentraciones extracelulares del aminoácido excitador Glu, y en las catecolaminas NE, DA y VMA, tanto en la región infundida como en el área contralateral.

En vista de los incrementos notables que se observaron en los niveles extracelulares de Glu, es muy probable que las primeras descargas epileptiformes observadas en éste modelo sean consecuencia de ésta liberación de Glu, y que se verifiquen por un efecto directo de la 4-AP sobre las terminales glutamatérgicas presentes en la corteza motora. La participación del Glu como agente iniciador de crisis es un concepto aceptado desde hace tiempo^{122,123,124}, además de que existen varios estudios que concluyen que la generación de descargas disminuye al utilizar antagonistas a receptores glutamatérgicos, esto en tejido cerebral humano, en cerebro de ratas *in vivo*, o en modelos de inducción de crisis con convulsivantes químicos^{52,55,116}, lo que apoya la evidencia de la participación del Glu como agente etiológico importante en el fenómeno de crisis. El hecho de la elevación del Glu en la fracción de infusión de 4-AP podría evidenciar el efecto directo de la droga sobre las terminales, y además se relaciona con el inicio de las descargas epileptiformes en ésta región.

El retraso en la elevación del Glu en el área contralateral posiblemente se debe al tiempo que necesita la hiperexcitabilidad inicial para propagarse por las redes neuronales y aparecer en áreas relacionadas con el foco. Al respecto, se ha demostrado que una cantidad de axones que salen de una columna cortical determinada se comunican con las neuronas de la misma área

contralateral¹²⁵, cursando principalmente por el cuerpo calloso hasta el otro hemisferio cerebral¹²⁶. El aumento en el Glu en la corteza izquierda posiblemente se relacione con el inicio de la actividad eléctrica en ésta región.

Los aumentos observados en los niveles extracelulares de NE y DA en la corteza de infusión también pueden ser reflejo de un efecto directo de la 4-AP sobre las terminales catecolaminérgicas presentes, en virtud de que los aumentos iniciales se dan en la misma fracción de infusión de la droga, con excepción del VMA, que aumenta un poco después, lo que concuerda con el hecho de que la NE se metaboliza posteriormente a su liberación. La corteza motora recibe inervación noradrenérgica originada en el *locus coeruleus*, mientras que la ligera entrada dopaminérgica a la corteza cerebral se origina en la sustancia nigra. Con respecto a los aumentos observados en estas catecolaminas en la región contralateral, tal liberación solo puede reflejar la proyección de la hiperexcitabilidad inducida en la corteza derecha, ya que la corteza izquierda no recibió tratamiento alguno. Como ya se mencionó, en los tiempos en que se observan las elevaciones de neurotransmisores en la región izquierda, las crisis electrográficas se generalizan produciendo el "status epilepticus".

Existe evidencia de que la función principal de la NE en la corteza cerebral es regular la neurotransmisión excitadora en neuronas neocorticales^{127,128,129,130,131}, aparentemente de manera diferencial con respecto al tipo de receptor noradrenérgico activado. Así, se ha observado que la NE es capaz de potenciar la respuesta evocada por Glu o su agonista NMDA en la corteza, efecto que es mimetizado por agonistas β -adrenérgicos¹³². En el hipocampo de rata, también se ha observado un efecto potenciador de la NE o sus agonistas β -adrenérgicos sobre las descargas epileptiformes inducidas con picrotoxina o altas concentraciones de K^{+133} . Estos datos, además de la presencia de receptores adrenérgicos del tipo β en la corteza cerebral¹³⁴, podrían explicar en cierta manera el sostenimiento de la actividad epiléptica durante el tiempo suficiente para lograr la generalización y el "status epilepticus"

en el modelo presentado en este trabajo. Por lo tanto, los sistemas noadrenérgicos podrían estar participando en los procesos de propagación de crisis inducidas con 4-AP, por medio de activación de receptores β -adrenérgicos.

Por otro lado, y en favor del efecto protector de la NE sobre las crisis, existen estudios que muestran que la activación de los adrenoceptores de los tipos α tienen efectos antiepilépticos sobre las crisis inducidas por kindling en el ratón¹³⁵, y en la corteza entorrinal de la rata¹³⁶, donde se observó que la aplicación de NE o agonistas adrenérgicos inhiben de manera efectiva la transmisión sináptica mediada por Glu, lo mismo en hipocampo¹³³, donde la aplicación del agonista α -adrenérgico fenilefrina disminuye la frecuencia de disparo inducido con pilocarpina, o en el circuito amígdala-corteza entorrinal¹³⁷, donde los agonistas a receptores α_2 inhiben los potenciales postsinápticos excitadores inducidos por pulsos de corriente.

En el modelo presentado en este trabajo pueden estar ocurriendo ambos efectos descritos para la norepinefrina, sin embargo, no se realizaron los estudios farmacológicos necesarios para poder discriminar la participación mayoritaria de receptores α o β , por lo que no es posible concluir si la NE está actuando como mecanismo potenciador o protector en este modelo.

La participación de la DA en el fenómeno de crisis es todavía controversial, pues mientras que algunos autores encuentran aumentos en las concentraciones extracelulares, otros reportan disminuciones y aún carencia de cambios en varios modelos de inducción de crisis. Como se mencionó anteriormente, es probable que el incremento inicial en los niveles detectados de DA sean consecuencia de un efecto directo de la 4-AP, sin embargo, no se descarta un efecto posterior del Glu liberado sobre las terminales dopaminérgicas cercanas, pues se sabe de la existencia de receptores glutamatérgicos sobre las terminales dopaminérgicas en el estriado de rata, y es

posible que exista el mismo tipo de interacciones en la corteza cerebral. Esto explicaría el hecho de que las elevaciones de Glu siempre anteceden a las de DA en este modelo.

De igual modo que para la NE, se han descrito efectos moduladores de la DA sobre la neurotransmisión glutamatérgica: por un lado, está documentada la facilitación de la transmisión glutamatérgica en neuronas prefrontales al ponerlas en presencia de DA¹³⁸, y por otro lado se han encontrado efectos opuestos sobre la propagación de las crisis inducidas con litio-pilocarpina, con respecto a los receptores dopaminérgicos activados: mientras el bloqueo de receptores D1 protege contra las crisis, el bloqueo de receptores D2 promueve la aparición de las mismas¹³⁹. Estos datos, junto con la presencia de receptores D1 y D2 en varias regiones de la corteza cerebral^{140,141,142,143}, hacen suponer que el sistema dopaminérgico probablemente sea también un mecanismo de apoyo para la propagación de las crisis, aunque sería necesario comprobar la distribución de receptores dopaminérgicos en las áreas corticales estudiadas.

CONCLUSIONES

- La infusión ic de 4-aminopiridina induce la liberación de Glu, NE, DA en la zona de infusión.
- La infusión de la droga induce la aparición de descargas electrográficas, cuyo inicio se relaciona con las elevaciones de neurotransmisores
- La hiperexcitabilidad producida por la infusión de 4-aminopiridina se proyecta a la zona contralateral, produciendo cambios bioquímicos y electrográficos semejantes a los observados en la zona de infusión.

REFERENCIAS

1. Sahagún, B. (1959) "Historia general de las cosas de la Nueva España" Porrúa, México, pp. 58-62
2. López.-Austin, A. (1980) "Cuerpo humano e ideologías" UNAM, México, p p . 117
3. Adams, F. (1849) "The genuine works of Hippocrates". The Sydenham Society, London, pp. 404 y 466
4. Wallace, H; Shorvon, S; Tallis, R. (1998) "Age-specific incidence and prevalence of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy" *Lancet* 352(9124):1970-3.
5. De la Court, A., Breteler, MM., Meinardi, H., Hauser, W., Hofman, A. (1996) "Prevalence of epilepsy in the elderly: the Rotterdam study" *Epilepsia* 37(2):141-7.
6. Tallis, R., Hall, G., Craig, I., Dean, A. (1991) "How common are epileptic seizures in old age? *Age Agein* 20(6):442-8.
7. Doerfer, J., Wasser, S. (1987) "An epidemiologic study of febrile seizures and epilepsy in children" *Epilepsy Res.* (2):149-51.
8. Rubio-Donnadieu F. (1989) "Generalidades y clasificación de epilepsia" En : *Epilepsia, un enfoque multidisciplinario.* (Feria-Velasco, A., Martinez de Muñoz, Rubio-Donnadieu, F., eds.) Trillas, México. pp. 19
9. Fischer, R. (1982) "Seizure disorders" En *Principles of deambulatory medicine* (Zieve, P., Burton. J., Barker, L. eds.) Williams and Williams, Baltimore, pp. 824.
10. INEGI (1995) "Censo de población y vivienda 1995"
11. Kresch, M., Shaywitz, B., Anderson, G., Leckman, J., Cohen, D. (1987) "Neurotransmitters in human epilepsy" En: *Neurotransmitters and Epilepsy* (Jobe, P., Laird, H. eds.) Humana Press, New York, pp. 321-338
12. Wright, F., Dreiffus, F., Wolcott, G., Swaiman, K., Low, N., Freeman, J., Nelson,

- K. (1982) "Seizure disorders" En *The practice of pediatric neurology* (Swaiman, K., Wright, F. eds.) 2a. ed. C.V. Mosby, St. Louis.
13. Velasco, M., Velasco, F., Romo, R. (1985) "Anatomía Funcional" En *Epilepsia, principios y práctica* (Velasco, M. Edts.) IMSS, México. pp. 61-74.
 14. Fisher, R., Coyle, J. (1991) "Summary: neurotransmitters and epilepsy" En *Neurotransmitters and epilepsy* (Fischer, R. and Coyle, J. eds., Frontiers of clinical neuroscience, Vol. 11) Wiley Liss Inc. New York, pp.247-252.
 15. Solís-Ortiz, H., Arauz-Contreras, J. (1989) "Modelos experimentales de epilepsia" En *Epilepsia, un enfoque multidisciplinario* (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., Rubio-Donnadieu, F., eds.) Trillas, México, pp. 74-79.
 16. Fischer, R. (1989) "Animal models of the epilepsies" *Brain Res. Rev.* 14:245-278
 17. Szentágothai, J. (1978) "The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation" *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 201:219-248.
 18. Kandel, E., Schwartz, J. (1991) "Directly gated transmission at central synapses" En *Principles of neural science* (Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. eds.) 3a. Ed. Elsevier, New York, pp. 153-172.
 19. Bender, A., Schonesboe, A., Reichelt, W., Norenberg, M. (1998) "Ionic mechanisms in glutamate-induced astrocyte swelling: role of K⁺ influx" *J. Neurosci. Res.* (3):307-21.
 20. Lysko, P., Webb, C., Feuerstein, G. (1994) "Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive, as a Na⁺ channel modulator and glutamate transport inhibitor" *Neurosci. Lett.* 171(1-2):77-80.
 21. Inoue, N., Matsui, H. (1990) "Activation of a brain type Na⁺ pump after glutamate excitation of cerebral neurons" *Brain Res.* 534 (1-2):309-12.
 22. Thompson, S., Prince, D. (1986) "Activation of electrogenic sodium pump in hippocampal CA1 neurons following glutamate-induced depolarization" *J. Neurophysiol.* 56(2):507-522.
 23. Dingledine, R., McBain, C. (1999) "Glutamate and Aspartate" En *Basic Neurochemistry* (Siegel, G., Agranoff, B., Alberts, R., Fischer, S., Uhler, M. eds.) 6a. Ed. Raven Press, New York, pp. 315-334.
 24. Foster, A., Fagg, G. (1984) "Acidic amino acids binding sites in mammalian

- neurones membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors" *Brain Res. Rev.* 7:103-164.
25. Watkins, J., Olverman, H. (1987) "Agonist and antagonist for excitatory aminoacids receptors" *Trends. Neurosci.* 10:265-272.
 26. Werner, P., Voight, M., Keianen, K. (1991) "Cloning of a putative high affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells" *Nature* 351:742-744.
 27. Herb, A., Barnashev, N., Werner, P., Sakman, B., Wisden, W., Seeburg, P. (1992) "The KA-2 subunit of excitatory amino acids receptor shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits" *Neuron* 8:775-785.
 28. Sakimura, K., Morita, T., Kushiya, E., Mishina, M. (1992) "Primary structure and expression of the gamma-2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate" *Neuron* 8:267-274.
 29. Iino, M., Ozawa, S., Tsuzuki, K. (1990) "Permeation of calcium through excitatory aminoacids receptor channels in cultured rat hippocampal neurones!" *J. Physiol. (London)* 424:151-165.
 30. Monaghan, D., Bridges, R., Cotman, C. (1989) "The excitatory aminoacids receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system" *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365.
 31. Fletcher, E., Lodge, D. (1996) "New developments in the molecular pharmacology of amino-hydroxy-5-methy-4-isoxazole propionate and kainate receptors" *Pharmacol. Ther.* 70:65-89.
 32. Kleckner, N., Dingledine, R. (1988) "Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes" *Science* 241:835-837.
 33. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A., Prochiantz, A. (1984) "Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurones" *Nature* 307:462-465.
 34. Traynelis, S., Hartley, M., Heneman, S. (1995) "Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines" *Science* 268:873-876
 35. Logan, W., Snyder, S. (1972) "High-affinity uptake systems for glycine ,

- glutamate and aspartate in rat CNS synaptosomes" *Brain Res.* 42:413-431.
36. Stallcup, W., Bulloch, K., Baetge, E. (1979) "Coupled transport of glutamate and sodium in cerebellar nerve cell line" *J. Neurochem.* 32:57-65.
 37. Robinson, M., Dowd, L., (1997) "Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian nervous system" *Adv. Pharmacol.* 37:69-115.
 38. Alexander, G., Grothusen, J., Gordon, S., Schwartzman, R. (1997) "Intracerebral microdialysis study of glutamate reuptake in awake, behaving rats" *Brain Res.* 766:1-10.
 39. Rothstein, J., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. (1996) "Knockout of glutamate transport reveals major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate" *Neuron* 16:675-686.
 40. McGeer, P., McGeer, E. (1989) "Amino acids neurotransmitters" *Basic Neurochemistry* (Siegel, G., Agranoff, B., Alberts, R., Molinoff, P. eds.) 4th. Ed. Raven Press, New York, pp. 311-332.
 41. Becquet, O., Faudon, M., Henry, F. (1990) "*In vivo* evidence for an inhibitory glutamatergic control of serotonin release in the cat caudate nucleus: involvement of GABA neurons" *Brain Res.* 519:82-88.
 42. Kravitz, E., Slater, C., Takahashi, K., Bowden, M., Grossfeld, R. (1970) "Excitatory synaptic mechanism" (Anderson, P., Jansen J. eds) *Universitetsfolaget, Oslo*, pp. 85-93.
 43. Cooper, J., Bloom, F., Roth, R. (1982) "Amino acids" *The biochemical basis of neuropharmacology* Oxford University Press, pp. 286.
 44. Olney, J. (1974) "Toxic effects of glutamate and related amino acids on developing central nervous system" *Heritable disorders of amino acids metabolism* (Nyhan, W. eds.) John Wiley, New York, pp. 124-165.
 45. Sloviter, R. (1983) "Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I: acute electrophysiological and light microscopic studies" *Brain Res. Bull.* 10:675-697.
 46. Van-Gelder, N., Drujan, B. (1980) "Alterations in the compartmentalized

- metabolism of glutamic acid with changed cerebral conditions" *Brain Res.* 200:443-445.
47. Janjua, N., Anderman, E., EegñOlofsson, O., Lemieux, B. (1989) "Plasma amino acids and genetic studies in epilepsy" En *Genetics of the epilepsies* Mannageta, G., Anderseon, V., Doose, Janz, D. edts Springer-Verlag, Berlin, pp. 162-171.
 48. Kalviainen, T., Pitkanen, A., Riekkinen, M. (1993) "Amino acids levels in the cerebrospinal fluids of newly diagnosed epileptic patients: effect of vigabatrin and carbamazepine monotherapies" *J. Neurochem.* 60:1244-1250.
 49. Spreafico, R., Battaglia, G., Arcelli, P., Anderman, F., Dubeau, F., Palmi, A., Olivier, A., Villemure, J., Tampieri, D., Avarizin, G., Avoli, M. (1998) "Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients" *Neurology* 50:27-36.
 50. Köhling, R., Lücke, A., Straub, H., Speckmann, E., Tuxhorn, I., Wolf, P., Pannek, H., Ooppel, F.(1998) "Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients" *Brain* 121:1073-1087.
 51. Morales-Villagran, A., Tapia, R. (1996) "Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rats striatum *in vivo*" *Neurochem. Int.* 28(1):35-40.
 52. Smolders, I., Van-Belle, K., Ebinger, G., Michotte, Y. (1997) "Hippocampal and cerebellar extracellular amino acids during pilocarpine induced seizures in freely moving rats" *Eur. J. Pharmacol.* 319:21-29.
 53. Morales-Villagran, A., Ureña-Guerrero, M., Tapia, R. (1996) "Protection by NMDA receptors antagonists against seizure induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine" *Eur. J. Pharmacol.* 305:87-93.
 54. Siniscalchi, A., Calabresi, P., Mercuri, N., Bernardi, G. (1997) "Epileptiform discharges by 4-aminopyridine in magnesium-free medium in neocortical neurons: physiological and pharmacological characterization" *Neurosci.* 81(1):189-197.
 55. Lopantsev, V., Avoli, M. (1998) "Laminar organization of epileptiform

- discharges in the rat entorhinal cortex *in vivo*" J. Physiol. 509(3):785-796.
56. Miller, H., Levey, A., Rothstein, J., Zingoonis, V. Conn, P. (1997) "Alterations in transporter protein levels in kindling-induced epilepsy" J. Neurochem, 68:1564-1570.
 57. Da-Silva, L., Pereira, P., Elisabetsky, E. (1998) "A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice" Gen. Pharmacol. 31(1):47-50.
 58. Schröder, H., Becker, A. Lösner, B. (1993) "Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylenetetrazol-kindled rats" J. Neurochem. 60:1007-1011.
 59. Kuhar, M., Couceyro, P. (1999) "Catecholamines" En Basic Neurochemistry (Siegel, G., Agranoff, B., Alberts, R., Molinoff, P. eds.) 4ta. Ed. Raven Press, New York, pp. 311-332.
 60. Bogdanski, D., Tissari, A. (1967) "Sodium dependent uptake and storage of amines in synaptosomes" Pharmacologist 9:250-258.
 61. Bylund, D. (1992) "Subtypes of α_1 and α_2 -adrenergic receptors" FASEB J. 6:832-839.
 62. U'Prichard, D., Snyder, S. (1979) "Distinct α -noradrenergic receptors differentiates by binding and physiological relationships" Life Sci. 24:79-88.
 63. Hieble, J., Bylund, D., Clarke, D. (1995) "International union of pharmacology recommendation for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update 1995" Pharmacol. Rev. 47:267-270.
 64. Johnson, R., Minneman, K. (1987) "Differentiation of α_1 -adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain" Mol. Pharmacol. 31:239-246.
 65. Han, C., Wilson, K., Minneman, K. (1990) " α_1 -adrenergic receptors subtypes and formation of inositol phosphates in dispersed hepatocytes and renal cells" Mol. Pharmacol 37:903-910.
 66. Wilson, K. Minneman, K. (1990) "Different pathways of [³H]inositol phosphate formation mediated by α_{1a} and α_{1b} -adrenergic receptors" J. Biol. Chem. 265:17601-17606.

67. Michel, M., Hanft, G., Gross, G. (1990) " α_{1B} - but not α_{1A} -adrenoceptors mediate inositol phosphates generation" *Naunyn Schmiedebergis Arch. Pharmacol.* 341:385-387.
68. Suzuki, E., Tsujimoto, G., Tamura, K., Hashimoto, K. (1990) "Two pharmacologically distinct adrenoceptor subtypes in the contraction of rabbit aorta: each subtypes couples with a different Ca^{++} signalling mechanism and plays a different physiological role" *Mol. Pharmacol.* 38:725-736.
69. Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, E., Hashimoto, K. (1989) "Glucogen phosphorylase activation by two different α_1 -adrenergic receptor subtypes: methoxamine selectively stimulates a putative α_1 -adrenergic receptor subtype that couples with Ca^{++} influx" *Mol. Pharmacol* 36:166-176.
70. Schwinn, D., Lamasney, J., Lorenz, W., Szklut, P., Fremeau, R., Yang-Feng, T., Caron, M., Lefkowitz, R., Cotecchia, S. (1990) "Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype" *J. Biol. Chem.* 265:8183-8189.
71. Bylund, D., Ray-Prenger, L. (1989) "Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*251:640-644.
72. Gingrich, J., Caron, M. (1993) "Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors" *Annu. Rev. Neurosci.* 16:299-321.
73. Sibley, D., Monsma, F. (1992) "Molecular biology of dopamine receptors" *Trends Pharmacol. Sci.* 13:61-68.
74. Jobe, P. (1981) "Pharmacology of audiogenic seizure" *En Pharmacology of hearing: experimental and clinical bases* (Brown, R., Daigneault, E. eds.) Wiley Interscience, New York, pp. 271-304.
75. Jobe, P., Brown, R. (1980) "Auditory pharmacology" *Trends Pharmacol. Sci.* 1:202-206.
76. Jobe, P., Laird, Hill, (1981) "Neurotransmitters abnormalities as determinants of seizure susceptibility and intensity in the genetic models of epilepsy"

Biochem. Pharmacol. 30:3137-3144.

77. Jobe, P., Laird, H-II., Ko, K., Ray, T., Dailey, J. (1982) "Abnormalities in monoamines levels in the central nervous system of the genetically epilepsy-prone rats" *Epilepsia* 23:359-366.
78. Dailey, J., Mishra, P., Ko, K., Penny, J., Jobe, P. (1991) "Noradrenergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naive genetically epilepsy-prone rats" *Epilepsia* 32(2):168-173.
79. Mishra, P., Kahle, E., Bettendorf, A., Dailey, J. Jobe, P. (1993) "Anticonvulsant effects of intracerebroventricularly administered norepinephrine are potentiated in the presence of monoamine oxidase inhibition in severe seizure genetically epilepsy-prone rats (GERPR-9s)" *Life Sci.* 52:1453-1441.
80. Yan, P., Jobe, P., Dailey, J. (1993) "Noradrenergic mechanism for the anticonvulsant effect of desipramine and yohimbine in genetically-prone rats: studies with microdialysis" *Brain Res.* 61:24-31.
81. Yan, Q., Dailey, J. Steenbergen, J., Jobe, P. (1998) "Anticonvulsant effect of enhancement of noradrenergic transmission in the superior colliculus in genetically epilepsy-prone rats (GEPR): a microinjection study" *Brain Res.* 780(2):199-209.
82. Clough, R., Peterson, B., Steenbergen, J. Jobe, P. (1998) "Neurite extension of developing noradrenergic neurons is impaired in genetically epilepsy-prone rats (GEPR-3s): an in vitro study on the locus coeruleus" *Epilepsy Res.* 29(2):135-146.
83. Szot, P., Reigel, C., White, S., Veith, R. (1996) "Alterations in mRNA expression of systems that regulate neurotransmitter synaptic content in seizure-naive genetically epilepsy-prone rats (GEPR): transporter proteins and rate-limiting synthesizing enzymes for norepinephrine, dopamine and serotonin" *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43(1-2):233-245.
84. Bengzon, J., Kalen, P., Lindvall, O. (1990) "Evidence for long-term reduction of noradrenaline release after kindling in the rat hippocampus" *Brain Res.* 535:353-357.
85. Löscher, W., Hönack, D. (1995) "Anticonvulsant and antiepileptogenic effect



- of L-deprenyl (selegiline) in the kindling model of epilepsy" J.Pharmacol.Exp. Ther. 274:307-314.
86. Shouse, M., Langer, J., Bler, M., Farber, P. Alcalde, O., Moghimi, R., Richkind, M., Szymusiak, R. (1996) "The α 2-adrenoreceptor agonist clonidine suppresses seizure, whereas the α 2-adrenoreceptor antagonist idaxozan promote seizure in amygdala-kindled kittens: a comparison of amygdala and pontine microinfusion effects" *Epilepsia* 37(8):709-717.
 87. Kokaia, M., Cenci, M., Elmer, E., Nilsson, O., Kokaia, Z., Bengzon, J., Björklund, A., Lindvall, D. (1994) "Seizure development and noradrenaline release in kindling epilepsy after noradrenergic reinnervation of the subcortically deafferented hippocampus by superior cervical ganglion or fetal locus coeruleus grafts" *Exp. Neurol.* 130:351-361.
 88. Pintor, M., Mefford, I., Hutter, I., Pocotte, S., Wyler, A., Nadi, S. (1990) "Levels of biogenic amines, their metabolites and tyrosine hydroxylase activity in the human epileptic temporal cortex" *Synapse* 5:152-156.
 89. Trottier, S., Evrard, B., Biraben, A., Chauvel, P. (1994) "Altered patterns of catecholaminergic fibers in focal cortical dysplasia in two patients with partial seizure" *Epilepsy Res.* 19:161-179.
 90. Devinsky, O., Emoto, S., Goldstein, D., Stull, R., Porter R., Theodore W., Nadi, S. (1992) "Cerebrospinal fluid and serum levels of DOPA, catechols and monoamine metabolites in patients with epilepsy" *Epilepsia* 33(2):263
 91. Starr, M. (1996) "The role of dopamine in epilepsy" *Synapse* 22:159.
 92. You, Z., Tzschentke, T., Brodin, E., Wise, R. (1998) "Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate and dopamine release in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats" *J, Neurosci.*18(16):6492-6500
 93. Alam, A., Starr, M. (1996) "Regional changes in brain dopamine utilization during status epilepticus in the rat induced by systemic pilocarpine and intrahippocampal carbachol" *Neurophar.* 35(2):159-167.
 94. Mintz, M., Reyneke, L., Villiers, A., Allin, R., Rusell, V., Daniels, W.Spuy, G., Jaffer, A, Kallaway, L., Douglas, R., Taljaard, J. (1992) "Effect of amygdaloid kindling

on dopamine and acetylcholine release from rat prefrontal cortex and striatal slices" *Brain Res.* 592:115-121.

95. Thesleff, S. (1980) "Aminopyridines and synaptic transmission" *Neurosci.* 5:1413-1419.
96. Glover, W. (1982) "The aminopyridines" *Gen. Pharmacol.* 13:259-285
97. Voskyul, R., Albus, H. (1985) "Espontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine" *Brain Res.* 342:54-66.
98. Gean, P., Shinnick-Gallagher, P. (1990) "The epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala slices: antagonism by non-NMDA receptor antagonists" *Brain Res.* 530:251-256.
99. Flores-Hernandez, J., Galarraga, E., Pineda, J. Bargas, J. (1994) "Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-Aminopyridine" *Neurophysiology* 72(5):2246.
100. Lundh, H., Leander, S., Thesleff, S. (1976) "Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat" *J. Neurol. Sci.* 32:29-43.
101. Molgo, J., Lemeighan, M., Lechat, P. (1977) "Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 203:653-663.
102. Arzate, M., Ponce, H., Pasantes-Morales, H. (1984) "Antagonistic effects of taurine and 4-aminopyridine on guinea pig ileum" *J. Neurosci. Res.* 11:271-280.
103. Van-Bogaert, P., Snyders, P. (1982) "Effects of 4-aminopyridine on inward rectifying and pacemaker currents of cardiac purkinje fibers" *Eur. J. Physiol.* 394:230-238.
104. Tapia, R., Sitges, M. (1982) "Effects of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes" *Brain Res.* 250:291-299.
105. Tapia, R., Sitges, M., Morales E. (1985) "Mechanisms of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes" *Brain res.* 361:373-382.
106. Arzate, M., Moran, J., Pasantes-Morales, H. (1986) "Inhibitory effects of taurine on 4-aminopyridine stimulated release of labelled dopamine from

- striatal synaptosomes" *Neurophar.* 25:689-694.
107. Dolezal, V., Tuckey, M. (1983) "The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on release of acetylcholine from rat striatal slices" *Naumnyin Schmied. Arch. Pharmacol.* 323:90-95.
 108. Damsda, G., Biessels, P., Westerink, B., De-Vries, J., Horn, A. (1988) "Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rats measured by intrastriatal dialysis" *Eur. J. Pharmacol.* 145:15-20.
 109. Kirsch, G., Drewe, J. (1993) "Gating-independent mechanism of 4-aminopyridine block in related potassium channels" *J. Gen. Physiol.* 102:797-816.
 110. Choquet, D., Korn, H. (1992) "Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes" *J. Gen. Physiol.* 99:217-240.
 111. Kirsch, G., Narahashi, T. (1983) "Site of action of active form of aminopyridines in squid axon membranes" *J. Phar. Exp. Ther.* 226:174-179.
 112. McCarmack, K., Joiner, W., Heineman, S. (1994) "A characterization of the activation structural rearrangement in voltage-dependent shaker K⁺ channels" *Neuron* 12:301-315.
 113. Shieh, C., Kirsch, G. (1994) "Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K⁺ channels" *Biophysical J.* 67:2316-2325.
 114. Bouchard, R., Fedida, D. (1995) "Closed and open states binding of 4-aminopyridine to the clones human potassium channel Kv 1.5" *J. Phar. Exp. Ther.* 275:864-876.
 115. Huang, H., Hertting, G., Allgaier, C., Jackisch, R. (1989) "3,4-diaminopyridines-induced noradrenaline released from CNS tissue as a model for action potential-evoked transmitter release: effects of phorbol ester" *Eur. J. Pharmacol.* 169:115-123.
 116. Freedman, S., Dawson, G., Villereal, M., Miller, R. (1984) "Identification and characterization of voltage-sensitive calcium channels in neuronal clonal

- cell lines" *J. Neurosci.* 4:1453-1467.
117. Tibbs, G., Dolly, J., Nicholls, D. (1989) "Dendrodotoxin, 4-aminopyridine and β -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca^{++} -dependent release for glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes" *J. Neurochem.* 52:201-206.
 118. Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Berger, M., Nitecka, L. (1984) "Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats" *Dev. Brain Res.* 14:284-288.
 119. Frago-Veloz, J., Massieu, L., Alvarado, R., Tapia, R. (1990) "Seizure and wet dog shakes induced by 4-AP and their potentiation by nifedipine" *Eur. J. Pharmacol.* 178:275-281.
 120. Paxinos, G., Watson, C. (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates" 2da. Ed. Academic Press, New York.
 121. Marsden, C., Joseph, M. (1986) "Biogenic Amines" En *HPLC of small molecules: a practical approach* (Lim, C. edts.) IRL Press, Oxford, Washington, D.C. pp. 29-48-
 122. Meldrum, B. (1991) "Excitatory amino acids transmitters in epilepsy" *Epilepsia* 32 (Suppl. 2):S1-S3.
 123. Löscher, W. (1993) "Basic aspects of epilepsy" *Curr. Op. Neurobiol. Neurosur.* 6:223-232.
 124. Bradford, H. (1995) "Glutamate, GABA and epilepsy" *Progress in Neurobiology* 47:477-511.
 125. Eccles, J. "The cerebral neocortex: a theory of its operation" En *Cerebral Cortex* (Jones, E., Peters A. edts) Plenum Press, New York, pp. 1-38.
 126. Spencer, S. (1988) "Cortical and intercortical seizure spread" En *Anatomy of Epileptogenesis* (Meldrum, B., Ferrendelli, J., Wieser, H. edts) John Libbey, London, pp. 139-154.
 127. Dodt, H., Pawelzik, H., Zieglensberger, W. (1991) "Actions of noradrenaline on neocortical Neurons in vitro" *Brain Res.* 545:307-311.
 128. McCormick, D., Williamson, A. (1989) "Convergence and divergence of neurotransmitter action in human cerebral cortex" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8098-8102.

129. Morrison, J., Foote, S., O'Connor, D., Bloom, F. (1982) "Laminar, tangential and regional organization of the noradrenergic innervation of the monkey cortex: DBH immunohistochemistry" *Brain Res. Bul.* 9:309-319.
130. Waterhouse, B., Moises, H., Woodwars, D. (1980) "Noradrenergic modulation of somatosensory cortical neuronal response to iontophoretically applied putative neurotransmitters" *Expl. Neurol.* 69:30-49.
131. Waterhouse, B., Sessler, F., Cheng, J., Woodward, D., Azizi, S., Moises, H. (1988) "New evidence for a gating action of norepinephrine in central neuronal circuits of mammalian brain" *Brain Res. Bull.* 21:425-432.
132. Radisavljevic, Z., Cepeda, C., Peacock, W., Buchwald, N., Levina, M. (1994) "Norepinephrine modulates excitatory amino acid-induced responses in developing human and adult rat cerebral cortex" *Int. J. Devl. Neuroscience* 12(4):353-361.
133. Rutecki, P. (1995) "Noradrenergic modulation of epileptiform activity in the hippocampus" *Epilepsy Res.* 20:125-136
134. Pralong, E., Magistretti, P. (1995) "Noradrenergic increases conductances and reduces glutamatergic transmission in the mouse enthorinal cortex by activation of adrenoreceptors" *Eur. J. Neurosci.* 7:2370-2378.
135. Janumpalli, S., Butler, L., MacMillan, L., Limbird, L., McNamara, J. (1998) "A point mutation (D79N) of the alpha2A adrenergic receptors abolishes the antiepileptogenic action of endogenous norepinephrine" *J. Neurosci.* 18(6):2004-2008.
136. Nicholas, A., Pieribone, A., Hokfelt, T. (1993) "Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an *in situ* hybridization study" *Neuroscience* 56(4):1023-1039.
137. Ferry, B., Magistretti, J., Pralong, E. (1997) "Noradrenaline modulates glutamate mediated neurotransmission in the rat basolateral amygdala *in vitro*" *Eur. J. Neurosci.* 9:1356-1364.
138. Otani, S., Blond, O., Desce, J., Crepel, F. (1998) "Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex" *Neurosci.* 85(3):669-676

139. Barone, P., Palma, V., DeBartolomeis, A., Tedeschi, E., Muscettola, G., Campanella, G. (1991) "Dopamine D1 and D2 receptors mediate opposite functions in seizure induced by lithium-pilocarpine" *Eur. J. Pharmacol.* 195:157-162.
140. Khan, Z., Gutierrez, A., Martin, R., Penafiel, A., Rivera, A., De la Calle, A. (1998) "Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain" *J. Comp. Neurol.* 402(3):353-71.
141. Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J., Pappy, M., Levenson, R., Goldman-Rakic, P. (1995) "Regional, cellular and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain" *J. Neurosci.* 15(12):7821-36.
142. Lidow, M., Wang, F., Cao, Y., Goldman-Rakic, P. (1998) "Layer V neuron bear the majority of mRNAs encoding the five distinct dopamine receptor subtypes in the primate prefrontal cortex" *Synapse* 28(1):10-20.
143. Choi, W., Machida, C., Ronnekleiv, O. (1995) "Distribution of dopamine D1, D2 and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis" *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 31(1-2):86-94.

CUCB



SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES

Preguntas y comentarios.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL