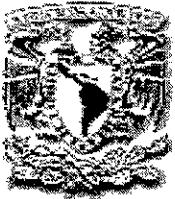


00346 7
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Modificación de receptores a benzodiazepinas
Durante el desarrollo del kindling.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

PRESENTA: Biol. JOSÉ LUIS CHÁVEZ JÚAREZ

México, D.F. Noviembre de 1999

274559.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

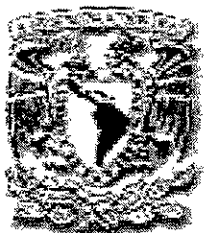
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

00346

7
251



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Modificación de receptores a benzodiazepinas
Durante el desarrollo del kindling.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

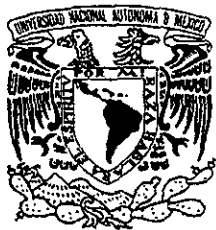
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

PRESENTA: Biol. JOSÉ LUIS CHÁVEZ JÚAREZ

TUTOR: Dr. Hugo José Solís Ortiz

1999

TESIS CON
LA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/118799
Asunto: Asignación de jurado
Expediente: 72515

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
Presente

Por este conducto informo a usted, a través de esta División, que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al BIOL. JOSE LUIS CHAVEZ JUAREZ, el siguiente jurado para obtener el grado de la Maestría en Ciencias (Biología Celular):

Presidente	Dr. GEORGES DREYFUS CORTES
Primer vocal	Dr. HUGO JOSE SOLIS ORTIZ
Segundo vocal	Dr. ALFREDO IGNACIO FERIA VELASCO
Tercer vocal	Dra. MARIA DE LOURDES VALENZUELA SANCHEZ
Secretario	M. en C. CARLOS ALEJANDRO TORNER AGUILAR
Suplente	M. EN C. DANIEL GRANADOS FUENTES
Suplente	Dra. ROSALVA ESTHER TALAVERA CUEVAS

Título de la tesis: MODIFICACION DE RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS DURANTE EL DESARROLLO DEL KINDLING

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 1999
EL JEFE DE LA DIVISION

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del jurado

Dr. JORGE DREYFUS CORTEZ
Dr HUGO JOSE SOLIS ORTIZ
Dr ALFREDO IGNACIO FERIA VELASCO
Dra MARIA DE LOURDES VALENZUELA SANCHEZ
Dra ROSALVA ESTHER TALAVERA CUEVAS
M en C DANIEL GRANADOS FUENTES
Dr. CARLOS TORNER AGUILAR

.....por el tiempo.....

A la Dra. Dalila Martínez de Muñoz
Por todas las aportaciones

En particular agradezco a la Dra Lourdes y a mi buen amigo Daniel por los enormes comentarios y el gran esfuerzo. GRACIAS.

DEDICATORIAS

A TODOS MIS GRANDES AMIGOS DEL LAB 205

A MI PORQUE A PESAR DE TODO NUNCA AFLOJE

A MI FAMILIA: J.F., ERENDIRA Y A ROSALINA

PERO PRINCIPALMENTE A MI PADRE....

Indice

Resumen

Introducción

Sinapsis.....	1
Transmisión sináptica.....	4
Neurotransmisores.....	6
Técnicas para el estudio de receptores.....	12
Modelos animales de epilepsia.....	14

Participación del GABA en la epilepsia

GABA en la epilepsia.....	20
Receptores a Benzodiazepinas.....	24

El Kindling como modelo de epilepsia.....	26
Kindling eléctrico.....	27
Kindling químico.....	28
Participación del GABA en el Kindling.....	29
Planteamiento del Problema.....	33
HIPOTESIS.....	35
Objetivos.. ..	36

Material y Métodos

Curva dosis respuesta.....	37
Desarrollo del Kindling.....	39
Análisis de receptores.....	43

Resultados

Kindling con PTZ.....	44
Análisis del modelo.....	45
Kindling eléctrico.....	46

Análisis de Receptores

Kindling Kindling con PTZ.....	47
Kindling eléctrico.....	49
Kindling crónico.....	50
Tabla número 1 Kindling PTZ.....	52
Tabla número 2 Kindling eléctrico.....	53
Discusión.....	54
Conclusiones.....	61
Perspectivas.....	62
Referencias.....	63

RESUMEN.

Se ha definido al kindling como un incremento en la susceptibilidad a las convulsiones inducidas por estimulación eléctrica subumbral repetida. Este fenómeno se ha descrito tanto para el ratón como para la rata. También se ha descrito el modelo de kindling con PTZ (pentilentetrazol) el cual se desarrolla en la rata como en el ratón.

En el presente trabajo se planteo que tanto la estimulación con PTZ como eléctrica inducen modificaciones en el receptor a benzodiazepinas de manera particular para cada modelo.

Se encontró que la mejor dosis subconvulsiva es la 27 mg/Kg. ya que no mostraba ningún evento conductual, con esta dosis se probó el modelo y se encontró que el kindling con PTZ induce modificaciones importantes tanto en B_{max} como en K_d , también que se presentan cierto grupo de animales que no desarrollan ninguna convulsión y mostró muy poco cambio en cuanto a su afinidad respecto al control, por otra parte el grupo de diez días mostró cambios significativos respecto al control.

En el análisis del kindling eléctrico, se observó que los cambios en las constantes analizadas se incrementa conforme avanza el número de estímulos y el mayor cambio se da tanto en el kindling crónico como en el agudo.

En conclusión ambos modelos inducen selectivamente cambios en los receptores a benzodiazepinas dependiendo del nivel de estímulo, esto es si la estimulación es eléctrica el cambio se dará de una manera y si es químico de otra.

INTRODUCCION

La base fundamental del funcionamiento del sistema nervioso está determinada por la comunicación que se establece entre las células que lo forman. Esto ha sido el resultado de los procesos evolutivos que han conferido a las neuronas la posibilidad de comunicarse entre ellas y con otras células del organismo. (Agranoff 1967).

En el sistema nervioso central (SNC) existe una gran complejidad de funciones en comparación con los otros tejidos. Las neuronas establecen redes tridimensionales de contactos múltiples que se relacionan con los eventos fisiológicos de corto, mediano y largo plazo. Para llegar a comprender estos procesos es necesario conocer cómo se comunican las neuronas, y cuales son los fenómenos químicos y aspectos morfológicos relacionados con dicha comunicación. (Eccles, 1964).

Sinapsis.

La teoría de la "doctrina neuronal" fue establecida por Santiago Ramón y Cajal (1911), y provee las bases para el entendimiento de un arreglo neuronal esto es células individuales más que sincicial del tejido neural. La neurona es una célula altamente especializada, que está constituida por un soma o cuerpo neuronal con una serie de proyecciones que se ramifican y establecen contacto con otras células. Las prolongaciones neuronales que son los axones y las dendritas. Esta nomenclatura depende de la dirección en que se transmite la señal y tiene una estrecha correlación

morfológica a saber, las dendritas son especializaciones que reciben las señales, en tanto que los axones forman la vía de salida de información de las neuronas.

El axón de una neurona puede establecer contactos sinápticos con el axón, soma o dendritas de otras neuronas (Kandel, 1977). Esta interacción se lleva a cabo a través de la sinapsis, que está constituida por una serie de especializaciones estructurales de la terminal axónica y de la membrana de la célula adyacente con la que hace contacto.

La estructura de estos puntos de contacto tanto en el sistema nervioso periférico como central, fue visualizada con el advenimiento del microscopio electrónico de transmisión. Con esta nueva tecnología se describió la interacción entre las células nerviosas, y se observó una hendidura sináptica, las vesículas sinápticas claras, el material electrodensito cercano a la membrana pre y postsináptica y a las mitocondrias (Palade y Palay, 1954; Palay, 1956 y 1958). La porción correspondiente al axón se considera presináptica e informadora, mientras que la parte que recibe la información se denomina membrana postsináptica o receptora.

Las sinapsis se clasifican como químicas o eléctricas dependiendo del tipo de mecanismo que se utilice para la transferencia de señales por lo que la estructura de estas dos clases de sinapsis es diferente. En las sinapsis eléctricas las señales que viajan a través de la membrana presináptica pasan directamente a la membrana receptora por conducción. En esta sinapsis la distancia entre ambas membranas es de 2 a 5 nm. En el caso de las sinapsis químicas, se requiere una serie de traducciones

de la información a diferentes "lenguajes": una señal eléctrica en la membrana presináptica es traducida a una señal química, que una vez liberada al espacio sináptico, se une con receptores químicos específicos en la membrana postsináptica donde se genera nuevamente una señal eléctrica (Palay, 1958; Gray, 1959). La capacidad de las sinapsis químicas para liberar un mensajero químico o transmisor y la presencia de receptores en la membrana postsináptica proveen de un mecanismo para la transmisión unidireccional de la información en los diferentes circuitos neuronales. (Agranoff, 1967; Eccles, 1964; Papas y Waxman, 1972).

En la región presináptica se encuentran todos los elementos para la transferencia de señales eléctricas o de mensajes químicos. Esta región constituye el botón sináptico, que contiene: mitocondrias, vesículas sinápticas y un engrosamiento de la membrana celular que se restringe a la zona de contacto con la membrana postsináptica, la cual también se encuentra engrosada. En estas sinapsis, las membranas pre y postsináptica están separadas por una distancia aproximada de 30 nm (Eccles, 1964; Kandel, 1977).

TRANSMISION SINAPTICA.

El origen de la teoría química de la transmisión nerviosa se remonta a 1848 cuando Du Bois Raymond postuló que una sustancia excitadora podría ser la causante de la contracción muscular. Posteriormente en 1904, T.R.Elliot descubrió que la adrenalina mimetizaba la acción de los nervios simpáticos; además esta sustancia podía ser secretada por las terminales nerviosas de los nervios simpáticos y actuar como una sustancia excitadora en la glándula adrenal. Poco después, Otto Loewi demostró que al perfundir un corazón de rana y estimular el nervio vago eléctricamente, el latido del corazón disminuía o se detenía y que el líquido que bañaba a este órgano, inducía una inhibición del latido de otro corazón sin estimular el nervio vago.

Con estas observaciones se concluyó que en dicha preparación el estímulo nervioso inducía la liberación de una sustancia inhibitoria. Sin embargo, no fue sino hasta los experimentos de Dale en 1924, cuando se dio el paso decisivo para que la teoría química de la transmisión nerviosa se aceptara. Estos experimentos mostraron que cada vez que se estimulaba el nervio vago se inducía la liberación de una sustancia química llamada acetilcolina. De esta manera surgió la teoría de la transmisión nerviosa mediada por sustancias químicas. (Kandel, 1978).

Actualmente se considera que la corriente eléctrica viaja a través del axón y alcanza la terminal sináptica desencadenando una serie de modificaciones químicas específicas que conducen a la transferencia de esta información por medio de una

sustancia química, la cual atraviesa el espacio intersináptico e interacciona con la membrana postsináptica. (Kandel, 1978).

Esta serie de eventos suceden de la siguiente manera: Previamente a la llegada del estímulo eléctrico a la terminal nerviosa, la membrana sináptica posee un potencial de reposo originado por la distribución selectiva de los iones K^+ , Na^+ . En el reposo, el K^+ se encuentra muy concentrado en el interior de la célula, mientras que el Na^+ está más concentrado en el exterior.

Una vez que ha llegado el estímulo a la terminal ocurre un cambio en la polaridad de la membrana, que se debe a la modificación de su permeabilidad de los canales de Na^+ , el ion Na^+ se acumula en el interior de la célula; esto trae como consecuencia la apertura de los canales de K^+ y la consecuente salida de este ion, lo que produce una recuperación del potencial. El cambio transitorio del potencial activa los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje lo cual permite la entrada de estos iones a través de la membrana presináptica.

Ya en el interior de la terminal sináptica, los iones Ca^{++} son los responsables de disparar los mecanismos de liberación del transmisor químico, ya sea directamente desde pozas citoplasmáticas como ocurre con pozas de GABA y de ácido glutámico o a través de la exocitosis de vesículas sinápticas que se encuentran en la terminal. Una vez que la estimulación ha cesado, la polaridad de la membrana se restablece, los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje se cierran y el transmisor deja de ser liberado (Kandel, 1978; Llinas, 1976). Después de liberado el transmisor, éste atraviesa el

espacio sináptico e interacciona con un receptor membranal postsináptico, lo que origina una alteración en la permeabilidad iónica de esta membrana, o bien la generación de un segundo mensajero (Neher, 1988; Strange, 1987)

La terminal sináptica cuenta con la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis y manejo del transmisor y además de que regula la remoción del transmisor una vez que éste es liberado y ha dejado de actuar (Kandel 1978, McBurney 1987, Parnas y Segal 1989).

NEUROTRANSMISORES.

Se han postulado al menos 30 sustancias diferentes como posibles moduladores o transmisores en el SNC; algunas son de bajo peso molecular, como los aminoácidos GABA, glicina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, y taurina; y otras que son de alto peso molecular como las aminas dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina y otras moléculas como la acetilcolina.

También se han postulado como mensajeros químicos algunos péptidos como la sustancia P, las encefalinas, la neurotensina y la somatostatina que podrían además participar en la regulación de la liberación de otros transmisores (Leonard 1984).

CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROTRANSMISORES.

Desde el descubrimiento de la acetilcolina, se ha intentado adjudicar parámetros para el estudio de los mediadores químicos involucrados en la comunicación neuronal. No fue sino hasta 1966 que R. Werman formalizó los criterios para la identificación de sustancias neuroactivas en el sistema nervioso. Actualmente se aceptan cinco criterios básicos, los cuales se mencionan a continuación.

A) Presencia de un compuesto.

El candidato a transmisor debe estar presente en la neurona que lo libera y necesita encontrarse potencialmente accesible para su utilización. A partir del concepto de *compartamentalización* del metabolismo, se ha sugerido la coexistencia de varias pozas de un mismo metabolito, cada una de éstas pozas puede contar con precursores específicos y enzimas características para la síntesis del metabolito.

Mediante el concepto de *compartamentalización* se ha podido explicar la presencia de aminoácidos con papel de mediadores en la transmisión, que pueden localizarse en una poza específica accesible para la liberación, e independiente de la poza relacionada con el metabolismo intermedio (Cooper y Bloom 1974).

B) Presencia de enzimas para la síntesis del neurotransmisor.

La neurona que utiliza cierto neurotransmisor, debe contar con la maquinaria enzimática que lo sintetiza. En cuanto a la ubicación celular de dichas enzimas se han postulado 2 opciones. Por una parte, se ha sugerido que es necesario la localización sináptica de las enzimas de síntesis del transmisor. Por otro lado, se piensa que sólo sería necesario contar con una poza metabólica sináptica del transmisor que esté accesible para la liberación, independientemente de que la síntesis del mediador se realice en el botón sináptico o de que éste sea transportado desde el sitio de síntesis en el soma neuronal a través del axoplasma.

C) Liberación del transmisor.

Durante la estimulación de la terminal sináptica, la sustancia postulada como transmisor, deberá ser detectada en el fluido extracelular de la región de la sinapsis activada. En la actualidad, se enfatiza que los procesos de secreción y liberación de compuestos en muchos tipos de tejidos glandulares y terminales nerviosas requieren de Ca^{++} en el medio externo o de Ca^{++} en compartimentos intracelulares (Sandoval 1980).

Esta dependencia al Ca^{++} , es un evento crucial en el acoplamiento estímulo-secreción que se ha desarrollado como una analogía del fenómeno de acoplamiento estímulo-contracción en el tejido muscular dependiente de calcio, el cual requiere de Ca^{++} . (Douglas, 1968 Penner, 1988).

D) Inactivación del compuesto.

Debe existir un sistema efectivo y rápido para eliminar o inactivar el transmisor liberado, una vez que ha efectuado su acción sináptica. Se ha demostrado que además de los mecanismos enzimáticos, existen sistemas de recaptura de alta afinidad para las sustancias neuroactivas presentes en el líquido extracelular. Estos sistemas se han descrito tanto en neuronas como en células gliales. (Hamberger 1976)

E) Identidad de la acción fisiológica.

El compuesto propuesto adicionado de manera exógena deberá inducir en la célula postsináptica el mismo efecto que el producido por el transmisor natural que es liberado por la terminal presináptica en la célula. Es decir, deberá modificar la conductancia iónica de la membrana de manera similar y a través de los mismos mecanismos que el transmisor endógeno.

De esta manera, el criterio de identidad se relaciona con la presencia de receptores postsinápticos que se han estudiado actualmente desde el punto de vista fisiológico y farmacológico. (Lindstrom, 1978; Bennet, 1978).

El término de receptor fue propuesto por Lagley en 1878, quien sugirió que la nicotina y el curare deberían combinarse con constituyentes de las células musculares. Estos constituyentes desconocidos fueron llamados "sustancias

receptivas". Por lo tanto en ocasiones se utiliza para designar la totalidad de eventos en donde el reconocimiento de un neurotransmisor altera la función celular; y también se refiere a las proteínas membranales específicas que reconocen y unen a los neurotransmisores. (Snyder, 1984).

Se han realizado diferentes estudios para entender el funcionamiento de los sitios de recepción de los diferentes neurotransmisores; así cómo de las diferentes moléculas denominadas ligandos tanto agonistas cómo antagonistas, que se unen al receptor. Como resultado de estos estudios, se ha propuesto que debe existir un receptor altamente específico para cada ligando, y han sido descritos al menos dos tipos de receptores: uno que se encuentra predominantemente en la membrana celular, y otro que se encuentra en el citosol o en la membrana nuclear. (Dietel, 1987).

Los receptores membranales son glico-proteínas anfipáticas, que se encuentran insertadas en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular. Estos receptores consisten de 3 dominios o subestructuras:

- 1) Un dominio extracelular hidrofílico capaz de unir específicamente a su ligando.
- 2) Un dominio transmembranal lipofílico que transmite la señal a través de la membrana.
- 3) Un dominio intracelular con actividad enzimática.

Después de la unión del ligando al receptor, se inician dos procesos diferentes:

- a) La traducción inmediata de la señal por medio de un sistema de efectores intracelulares, cómo pudiera ser la apertura de un canal.

- b) El procesamiento de la señal por medio de la producción de un segundo mensajero. Los receptores identificados hasta la fecha se han dividido en dos grandes familias de acuerdo a cómo el receptor está acoplado a su función.

En una de las familias, el receptor regula directamente la actividad de apertura de un canal iónico mediante los diferentes dominios de la macromolécula proteica. A está familia pertenecen el receptor nicotínico de la acetilcolina, el de GABA-benzodiazepina, el de glicina, el de AMPA (kainato-quisqualato) y el NMDA (N-metil-D-aspartato).

En la otra familia, los receptores están acoplados a canales de manera indirecta, en está familia se considera a los receptores adrenérgicos α y β , los de serotonina, los de dopamina y muscarínicos de acetilcolina, así cómo los de neuropéptidos y de rodopsina. En cada uno de los miembros de está familia, la molécula receptora está acoplada a proteínas G, de cuya acción depende la activación de diferentes proteínas efectoras. Típicamente el efector es una enzima que produce un segundo mensajero; por ejemplo, el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), el diacilglicerol, o bien el inositol trifosfato.

Los segundos mensajeros disparan una cascada bioquímica que involucra una serie de fosforilaciones; o bien la movilización de iones Ca^{++} desde almacenes

intracelulares, lo que origina que se lleven acabo cambios en el estado eléctrico de la célula y por lo tanto modificaciones en la transferencia de señales. (Kandel, 1991)

Técnicas para el estudio de receptores.

La metodología utilizada por primera vez para el estudio de la unión del ligando al receptor fue el marcaje de la molécula alfa-búngaro toxina con $^{125}\text{Yodo}$; esta molécula se une irreversiblemente al receptor para acetilcolina del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*.

En el órgano eléctrico de este pez, el 20% de la proteína total son moléculas del receptor de acetilcolina ; sin embargo, se ha calculado que en el SNC de mamíferos este receptor no comprende mas de una millonésima del peso total de la proteína.

Actualmente una de las técnicas utilizadas en el estudio de los receptores es la autoradiografía, la cual permite localizar las zonas de mayor densidad de receptores e inferir la distribución de las terminales sinápticas, mediante trazadores radiactivos de alta actividad y de gran especificidad. (Herkenham, 1987)

Otra de las técnicas utilizadas para el estudio de receptores es la secuenciación de los genes que la codifican; así como la expresión de la proteína o receptor en una célula que no tiene este tipo de receptores, como es el huevo no fecundado de la rana (*Xenopus laevis*). En este modelo se pueden determinar los eventos electrofisiológicos que se desencadenan después de la unión de ligandos específicos a los diferentes receptores. (Neher, 1988)

Sin embargo, la técnica más utilizada debido a su gran versatilidad, es la formación del complejo ligando-receptor, que consiste en el empleo de marcadores radiactivos y filtración rápida, que aunado a lavados con el amortiguador adecuado, posibilita la remoción del exceso del marcador de sitios no específicos, lo cual permite que la unión del ligando a su receptor se mantenga inalterada. (Snyder, 1984)

Las técnicas antes mencionadas han permitido estudiar las modificaciones de los receptores que están asociadas a diversas enfermedades, cómo la epilepsia, ya que permiten cuantificar el número de receptores, así cómo los cambios en su afinidad por el ligando.

Los eventos analizados con estas técnicas se han podido determinar debido a que los receptores pueden ser regulados en respuesta a la exposición prolongada de una célula a un ligando específico, lo cual provoca una disminución en el número de receptores; o bien, la ausencia del ligando induce un aumento en el número de receptores. La afinidad también está sujeta a estos cambios pero en función inversa, ya que por lo general si aumenta el número de receptores disminuye la afinidad y viceversa. (Maharaj, 1992).

EPILEPSIA.

La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta prevalencia e incidencia, cómo por sus consecuencias médicas y sociales. Etimológicamente, la palabra epilepsia se deriva del griego *epilambanein*, que significa ser sobrecogido bruscamente. Actualmente la epilepsia se ha definido cómo una afección crónica de etiología diversa caracterizada por crisis recurrentes que son debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), y que se asocian eventualmente con diversas manifestaciones clínicas.(Rubio, 1989)

Se ha observado que en el foco epiléptico que genera la epilepsia, el número de algunos receptores disminuye probablemente cómo resultado de un aumento en la liberación del transmisor al que unen, en cambio en otros sistemas de transmisión se incrementa (Maharaj 1992).

Debido a que la epilepsia presenta una etiología muy diversa es que se ha estudiado desde diferentes puntos de vista, con el fin de valorar su posible origen y prevención, y para poder comprender el desarrollo de está enfermedad se han desarrollado diferentes modelos experimentales

Modelos Animales de Epilepsia y Crisis Experimentales.

Los modelos animales de epilepsia son necesarios para la investigación de nuevos fármacos antiepilépticos. Estos modelos permiten el descubrimiento de las disfunciones neuronales básicas que se encuentran en la epilepsia humana.

Los modelos de crisis experimentales en animales se han considerado cómo modelos válidos para ciertos tipos de epilepsia, cuando las drogas antiepilépticas que son

efectivas en los modelos animales también lo son en las epilepsias humanas para prevenir las crisis convulsivas. Esto último facilita la síntesis de nuevas drogas antiepilépticas.

Para desarrollar un modelo experimental de epilepsia, generalmente se eligen mamíferos que presentan manifestaciones eléctricas y conductuales similares a las que ocurren en la epilepsia humana.

Dado que la conducta animal y la humana tienen considerables diferencias, muchas veces no es posible evaluar satisfactoriamente las manifestaciones conductuales en los modelos experimentales de epilepsia, sobre todo si hay ausencia de actividad motora. En estos casos, el criterio principal está dado por la identificación de las manifestaciones eléctricas del sistema nervioso.

Para que un modelo experimental se considere como modelo de epilepsia se requiere que las alteraciones paroxísticas (o de máxima intensidad) sean "espontáneamente" recurrentes. En la actualidad, los modelos de epilepsia más estudiados son: el provocado por la estimulación eléctrica repetitiva y subumbral (Kindling) y los inducidos por la aplicación de crema de alúmina o polvo de cobalto en la corteza cerebral así como también el Kindling químico con pentilentetrazol (PTZ). (Fisher, 1991). También, existe una gran variedad de modelos experimentales en los que es posible inducir, en forma aguda, un número variable de crisis convulsivas apreciables conductuales y/o electrofisiológicas. (Solis, 1989)

Varias especies de animales exhiben epilepsias reflejas las cuales se dan al presentarse algún estímulo ambiental, por ejemplo luz o sonido a cierta frecuencia; en el simio Papio Papio, al ser estimulado con luz, pueden ser provocadas crisis mioclónicas. También en algunas especies de ratones y ratas se pueden desarrollar crisis convulsivas por estimulaciones auditivas. (Killan, 1966)

Por otra parte se ha observado que algunos estímulos ambientales pueden generar convulsiones tónico-clónicas y la aparición de mioclonias; además se han observado crisis febriles en distintos animales. (Solis, 1986)

Los modelos se pueden clasificar considerando tres criterios principales (en Martínez de Muños 1987):

- a) Por el procedimiento de inducción.
- b) Por los mecanismos neuronales implicados en su producción.
- C) Por las manifestaciones conductuales.

1. Los modelos experimentales pueden clasificarse cómo inducidos por agentes físicos o químicos. En la primera categoría, los agentes físicos pueden afectar receptores sensoriales (cómo en la epilepsia refleja), o afectar directamente áreas encefálicas (cómo en el electrochoque). A su vez, la categoría de los modelos inducidos por agentes químicos incluye:

- a) los provocados por la aplicación tópica de penicilina o crema de alúmina,

- b) por la administración intraventricular de potasio o ouabaina,
- c) la aplicación intracisternal de rojo de rutenio,
- d) la aplicación sistémica de PTZ o bicuculina,
- e) los inducidos por supresión de barbitúricos, o bien por carencia metabólica de otros cómo la piridoxina o el calcio.

2. Al considerar el tipo de mecanismos implicados en la producción de las crisis, los modelos generalmente se clasifican en los que son provocados por interferencia o incremento en la función de sinapsis inhibitorias o excitatorias específicas (bicuculina, estriknina, etc.). Otros mecanismos de producción de las crisis pueden alterar el metabolismo neuronal (hidrazonas del fosfato de piridoxal, alilglicina, etc.) o bien las que destruyen a las neuronas inhibitorias (crema de alúmina, etc.). (Fisher, 1991) .

3. Finalmente, pueden identificarse los modelos sin manifestaciones motoras o con ellas. En el primer caso, la validez del modelo está dada por la caracterización electroencefalográfica de la crisis, mientras que en el segundo, las manifestaciones pueden incluir crisis paroxísticas de actividad motora, cómo carrera compulsiva, actividad tónica, actividad clónica o combinaciones de éstas .(Brailowsky,1988).

También debe considerarse si las manifestaciones motoras son focalizadas, generalizadas o inicialmente localizadas y secundariamente generalizadas; así mismo, si se presentan de una manera crónica o aguda.

En la actualidad, el estudio controlado y sistematizado de los modelos ha tenido tres aplicaciones fundamentales:

a) En el ensayo de compuestos anticonvulsivantes que pudieran tener una aplicación efectiva en la terapéutica de la epilepsia en humanos.

a) En el estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación y autosupresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsivantes.

c) En el estudio de los mecanismos neuronales que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad en el SNC y de la actividad motora.

A pesar de los diversos mecanismos de inducción o precipitación de las crisis y de la variedad de manifestaciones eléctricas y clínicas, debe haber factores comunes implicados en los mecanismos básicos en la generación de todas las crisis. Se ha propuesto al sistema GABAérgico como uno de los posibles controles de la epilepsia, en vista de que antagonistas del GABA son capaces de provocar crisis convulsivas que pueden ser controladas por muchos de los fármacos anticonvulsivantes.

Uno de los modelos experimentales que inducen convulsiones es el modelo del Kindling (denominado como encendido), que usualmente es considerado por sus características farmacológicas, como un modelo de epilepsia de "grand mal" o de crisis generalizadas. No obstante que el descubrimiento del Kindling se describió

hace más de 20 años, se desconocen las modificaciones a nivel de neurotransmisión química que ocurren en su desarrollo y establecimiento.

Con el modelo de Kindling se han observado diferentes alteraciones en distintos sistemas de neurotransmisión, cómo modificaciones en el sistema de transmisión noradrenérgico, serotoninérgico, GABAérgico, o glutamatérgico; sin embargo no se ha determinado con exactitud los cambios en estos sistemas. (Biziére y. Chambon, 1987; Gloor, 1988; Marescaux et al, 1984).

PARTICIPACION DEL GABA EN LA EPILEPSIA

Algunos sistemas de neurotransmisores han sido implicados en los mecanismos que regulan la aparición del Kindling. La evidencia más clara sugiere cambios en los niveles de neurotransmisores, modificación de la síntesis de los mismos, así como alteraciones en la tasa de respuesta a la estimulación repetida durante el Kindling . (Kamphuis, F. H López 1990).

El ácido gama-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC de mamíferos, tanto por el número de sinapsis, como por su relevancia funcional. El GABA es sintetizado a partir de su precursor, que es el ácido glutámico, por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en las neuronas GABAérgicas. Una vez que las neuronas GABAérgicas han sido estimuladas, el GABA es liberado del botón sináptico hacia la superficie de la membrana postsináptica y es ahí donde interactúa con los receptores gabaérgicos.

Se han descrito hasta la fecha tres tipos de receptores, los cuales han sido denominados como receptores GABA_a, GABA_b y GABA_c. Estos receptores, además se han caracterizado farmacológicamente por su afinidad con diferentes agonistas y antagonistas, y por los sistemas efectores a los cuales están acoplados . Desde el punto de vista fisiológico y farmacológico, el receptor GABA_a es el más importante, ya que

presenta diferentes sitios alostéricos que son capaces de modular su actividad. (Haefely, 1990).

Por otra parte, se ha descrito que el receptor de GABA_A esta formado por un complejo glicoprotéico heterooligomérico, el cual actúa como un canal iónico para el Cl⁻, el sitio de recepción para el propio GABA_A además del sitio de unión para las benzodiazepinas (BZ).

La distribución de los receptores a GABA_A se ha determinado por autoradiografía con flunitrazepam [³H] y clonazepam [³H], ambos ligandos marcados en la posición 7; estos ligandos se unen irreversiblemente con el receptor de BZ bajo luz U.V. (Richards y Mohler, 1984). Con esta técnica, se ha descrito que la distribución del receptor de GABA_A se encuentra de la siguiente manera: corteza cerebral (frontal, prefrontal) > corteza cerebelar > amígdala > hipocampo > hipotálamo > núcleo acumbens > putamen > globus pallidus > sustancia nigra > tegmentum > médula oblongada y cuerpo calloso. (Richards, 1984).

Los receptores GABA_B, únicamente han sido descritos en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos; se han caracterizado farmacológicamente por su capacidad de unión con baclofen(-) son insensibles a la bicuculina, a las BZ y a los barbitúricos. (Hill, 1981)

Se ha postulado que el receptor de GABA_B puede regular la actividad de los canales de Ca⁺⁺ y K⁺; por otra parte, se ha propuesto que además puede regular la actividad de adenilato ciclasa a través de la interacción de proteínas G. También se ha descrito que en tanto que los receptores GABA_A son predominantemente postsinápticos, los receptores GABA_B pueden ser pre o postsinápticos. (Andrade, 1986).

Se ha sugerido la posible existencia de una tercera clase de receptores de GABA que se ha encontrado en membranas de hipocampo. Este tipo de receptor denominado GABA_C, es insensible tanto al baclofen como a la bicuculina. (Stephenson, 1988).

Por medio de técnicas de biología molecular, ha sido posible deducir la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos que forman subunidades de los receptores GABAérgicos.

Mediante esta técnica ha sido posible demostrar que el receptor de GABA_A presenta de 10 a 20% de similitud con los receptores nicotínicos y con los receptores de glicina sensibles a estricnina. Cada polipéptido está representado por una familia de genes, que presentan una semejanza entre el 60-80% en su secuencia de aminoácidos. Las regiones de secuencias de aminoácidos conservadas y variables, sugieren dominios estructurales dentro de cada polipéptido. (Olsen, 1990).

La farmacología del receptor al GABA_A es extremadamente rica y presenta al menos 3 sitios posibles de interacción alostérica, en las cuales se unen diferentes ligandos. El

primer sitio, que es la parte de recepción para el GABA, puede ser activada por muscimol y es inhibida competitivamente por bicuculina. Otro sitio de unión es para BZ y el otro es para barbitúricos.

Las BZ son drogas que potencian la función del receptor de GABA_A, incrementando la afinidad por el neurotransmisor GABA y facilitando la frecuencia de apertura del canal de Cl⁻ sin alterar su conductancia.(Study ,1981).

El otro sitio de interacción se localiza dentro del canal de Cl⁻ y es ocupado por algunos compuestos convulsivantes como la picrotoxina, el metrazol, sus derivados, y el t-butilbiciclo-fosforotionato (TBPS). Otro grupo de compuestos que se une al canal de Cl⁻ son los barbitúricos; su actividad anticonvulsiva, sedante y ansiolítica se debe a la potenciación del receptor de GABA_A, así como también por la activación directa del canal de Cl⁻.

Los barbitúricos se unen al sitio de unión de TBPS, desplazándolo con diferentes potencias, que en orden decreciente son: pentobarbital> metobarbital> hexobarbital, sin embargo el fenobarbital no presenta ningún efecto sobre el sitio del canal de Cl⁻. (Eldefrawi,1987).

RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas (BZ) han sido consideradas como potentes anticonvulsivos en una gran variedad de modelos animales de epilepsia. En humanos se han utilizado en el tratamiento de la ansiedad, insomnio, y en ocasiones en el control de la espasticidad. (Richards and Mohler 1984)

Las BZ son particularmente efectivas contra crisis epilépticas inducidas por PTZ, también han mostrado su efectividad contra otras sustancias convulsivas como son la picrotoxina y el fluorotil. Las BZ se han probado tanto en modelos de crisis focales inducidos por aplicación de alúmina o estriknina, como también en las epilepsias reflejas que ocurren en los simios fotosensibles y en los ratones audiogénicos, además han probado su efectividad en las crisis convulsivas durante el Kindling y en las crisis de ausencia que ocurren en la cepa de ratones mutantes. (Swinyard, 1983; Martínez de Muñoz, 1986).

La capacidad de las BZ para potenciar la neurotransmisión GABAérgica fue descubierta durante los años 70's por Haefely (Haefely, 1990); subsecuentemente, la existencia de un sitio de unión para BZ, de alta afinidad fue identificado y caracterizado con técnicas de unión con ligandos marcados radiactivamente (Squires, 1977; Moler, 1977).

La participación de estos sitios de unión en la acción anticonvulsiva de las diferentes BZ, ha sido apoyada por la alta correlación que existe entre la potencia anticonvulsivante de los agonistas del receptor a BZ y sus afinidades de unión al receptor en experimentos *in vitro*.(Miller 1974).

Otra evidencia que apoya el efecto anticonvulsivo de BZ, es la protección contra las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol (PTZ). Por otra parte, se ha observado que sólo una fracción de aproximadamente 30% de receptores a BZ es necesaria para manifestar una protección eficaz contra las crisis inducidas en los modelos con estimulación química (PTZ). Una evidencia más que apoya el hecho de la actividad anticonvulsivante de las BZ, es la capacidad del antagonista (de los receptores a BZ) denominado flumazenil (Ro 15-1788) de inhibir la actividad anticonvulsiva del diazepam en el Kindling amigdalino (Haefely, 1990).

El Kindling como modelo de epilepsia.

El Kindling es el fenómeno por el cual, la aplicación repetida de estímulos eléctricos a una determinada región cerebral da como resultado un incremento en la excitabilidad neuronal de la región estimulada y consecuentemente la aparición de fenómenos paroxísticos.(Goddard1967) el paradigma de kindling ha venido a ser uno de los modelos más populares en los que se producen cambios plásticos en la actividad cerebral a largo plazo. Se ha propuesto que este tipo de cambios plásticos, no solo suceden durante la epileptogénesis sino también en los procesos de memoria y aprendizaje. (Goddard, 1975)

El modelo de Kindling se ha relacionado conceptualmente a los modelos de potenciación a largo plazo, aunque el modelo de Kindling tiende a ser de mayor duración que los eventos de potenciación a largo plazo, los cuales están enfocados a cambios en la amplitud de las respuestas en la actividad eléctrica; por otra parte el Kindling ha sido producido en una gran variedad de especies como son: reptiles, anfibios, ratas, ratones, cujos, hurones, lagomorfos en general, gatos, perros y primates. (Majkowski,1986)

El fenómeno de Kindling se desarrolla inicialmente por la estimulación eléctrica de la amígdala; sin embargo, varias zonas del cerebro pueden ser sujetas a Kindling aunque, con diferentes susceptibilidades, por ejemplo: la corteza anterior, así como las áreas

premotoras, motoras y límbicas son susceptibles al Kindling; además la estimulación es más efectiva en la corteza asociativa que en la corteza asociativa primaria. (Goddard, 1969)

Por otra parte las áreas más resistentes para desarrollar Kindling son principalmente los núcleos subcorticales; y solamente algunos núcleos del hipotálamo son sensibles al Kindling. Existen otras áreas, como es el cerebelo en donde hasta el momento no ha sido posible demostrar sensibilidad alguna a este modelo (Majkowski, 1986).

Para el desarrollo del Kindling con estimulación eléctrica, se han descrito diferentes intervalos de tiempo y en ratas se ha logrado instaurar el denominado Kindling rápido como un modelo de *estatus epilepticus*, esto se ha logrado estimulando en intervalos de pocas horas.

Kindling químico

El fenómeno del Kindling también se ha podido inducir por medio de la administración de algunas sustancias químicas, y por lo tanto se le ha denominado “Kindling químico” (Lewin 1989).

El Kindling químico se ha desarrollado por medio de la microinyección diaria de muscarina (agonista colinérgico) durante 20 días. Además, otras sustancias que decrementan los umbrales de disparo de las neuronas, si se administran sistemáticamente en pequeñas dosis, dan origen al fenómeno del Kindling; por ejemplo, con fluorotil, cocaína, lidocaina, y metrazol (PTZ), se ha logrado desarrollar el modelo de Kindling químico principalmente en ratas (Vindrola, 1984). Este paradigma ha sido posible inducirlo también en gatos pero por inhalación de solventes industriales. (Majkowski, 1986)

Participación del GABA en el Kindling.

Se han llevado a cabo diferentes investigaciones para entender la posible relación entre el Kindling y las alteraciones del metabolismo del GABA, o bien las acciones sobre el polireceptor GABA_A, que incluye los sitios para BZ, para barbitúricos y para el canal de cloro.

Algunos fármacos que modifican la neurotransmisión GABAérgica han sido probados en el desarrollo del Kindling, dentro de éstos se pueden mencionar el diazepam, la carbamazepina, el fenobarbital y el ácido valpróico. Estos fármacos también disminuyen o bloquean el Kindling amigdalino en ratas y gatos. (Kamphuis, 1990).

Por otra parte, el SKF89976-A, un inhibidor de la recaptura de GABA, inhibe la aparición del Kindling, y cuando este compuesto se deja de administrar, el Kindling se desarrolla más rápido ya que probablemente en algún grado, se ha establecido el cambio en la excitabilidad neuronal de la región afectada. (Fariello, 1991)

También, los inhibidores de la síntesis de GABA como el ácido 3-mercaptopropiónico y la bicuculina aceleran el proceso del Kindling. También se ha observado que la administración sistemática de bicuculina o del agonista de BZ, la β -carbolina, dan origen al desarrollo de crisis similares a las originadas por estimulación eléctrica durante el Kindling amigdalino. (Morin, 1986)

El PTZ en el desarrollo de crisis epilépticas.

Otro tipo de agente convulsivo ampliamente utilizado que afecta la transmisión GABAérgica es el PTZ. Este agente induce convulsiones en ratones, ratas, gatos y primates. Esta droga convulsiva, durante algún tiempo fue utilizada en el tratamiento de la esquizofrenia, y para el control del envenenamiento por barbitúricos.

El PTZ es además un estimulante de la circulación, y fue utilizado en el tratamiento de colapsos respiratorios; sin embargo, debido a las múltiples contraindicaciones, actualmente la droga ha sido retirada del mercado desde el punto de vista terapéutico. (Meduna,1939)

El PTZ es un convulsivo sintético que inicialmente produce sacudidas mioclónicas, las cuales después dan origen a convulsiones tónico-clónicas generalizadas.

En los protocolos de prueba se ha descrito que una sola administración de 50 mg/Kg de PTZ induce convulsiones clónicas y la administración de PTZ a 90 mg/Kg de peso provoca convulsiones tónico-clónicas y como consecuencia la muerte de los animales. (Little, 1986)

También la administración subcutánea de PTZ con dosis de 70 a 85 mg/Kg de peso da origen a convulsiones clónicas en el 97% de animales. (Pohlm1986)

Los sitios de acción del PTZ solo están parcialmente estudiados; se ha propuesto que tiene su principal sitio de acción en la corteza (Pohlm,1986); sin embargo se ha postulado que la administración sistémica de PTZ activa la formación reticular antes que la corteza. (Velasco, 1975)

Se ha descrito que la inyección de gama-vinil GABA en la formación reticular, en el hipotálamo anterior y en el hipotálamo caudal, bloquea la aparición de crisis inducidas por PTZ. (Miller, 1987)

En el ámbito molecular se ha propuesto que el mecanismo de acción del PTZ es el de interactuar con el polireceptor de GABA (Olsen, 1981), probablemente disminuyendo la permeabilidad del cloro y por lo tanto dando origen a convulsiones.

Por otra parte, se ha sugerido que el PTZ bloquea la inhibición mediada por GABA ; sin embargo los antagonistas de BZ aparentemente no inhiben pero si antagonizan las convulsiones inducidas por PTZ (Chavoix, 1988;(Tallman, 1980) por lo tanto es probable que ambos compuestos interaccionen sitios diferentes del polireceptor.

Posteriormente a estos experimentos se ha encontrado que a pesar de que del PTZ no tiene efecto sobre la unión de dihidropicrotoxina a membranas de cerebro completo de rata, la unión de la dihidropicrotoxina es inhibida por diferentes compuestos que deprimen la transmisión GABAérgica (Olsen, 1981, Leeb-Lundberg, 1980), por lo que

es probable que PTZ interactúe en un sitio cercano al de picrotoxina. Con estos experimentos se ha determinado que el PTZ despliega una mayor afinidad por el sitio cercano al canal de cloro más que por el sitio a BZ del polireceptor de GABA. Muchos compuestos que son utilizados crónicamente inducen hiposensibilidad o bien hipersensibilidad del receptor en respuesta al estímulo, esto es factible de inducir en los diferentes sistemas de neurotransmisión.

Se ha encontrado que el receptor a BZ se modifica por la inducción de crisis convulsivas mediante estimulación eléctrica, así como en el Kindling eléctrico y químico inducido por PTZ en ratas. Estas modificaciones han sido encontradas inmediatamente después de la última crisis convulsiva: Mcnamara (1980) ha mostrado que inmediatamente después de la convulsión, se da una elevación en la cantidad de los receptores a BZ en membranas aisladas de las neuronas de hipocampo; Niznik (1983) por otra parte, ha encontrado disminución en la unión de flunitrazepam [^3H] (FTZ) en membranas aisladas de células de corteza ipsilateral, así como en las de hipotálamo de ratas que desarrollaron Kindling amigdalino.

Estos datos sugieren que la actividad del receptor GABA_A puede ser alterada por la administración de drogas, las cuales modulan al receptor, lo antagonizan o bien lo sobreestiman, originando un cambio en el número de receptores (B_{max}), o bien modificando su afinidad (K_d) por el ligando.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Mucho de lo que se conoce hasta la fecha con relación a la epilepsia, se ha logrado entender gracias al empleo de modelos en animales utilizando principalmente a la rata y al ratón.

El empleo de modelos animales como sistemas de prueba, en particular el modelo de Kindling ha permitido introducir nuevos fármacos para controlar las diferentes afecciones que se presentan en la epilepsia, no obstante el uso intensivo de estos modelos animales, existen lagunas en cuanto al entendimiento del como se desarrollan algunos de estos modelos, como en el modelo de Kindling en cuanto a que sistemas de neurotransmisión son los principalmente afectados.

El sistema de neurotransmisión GABAérgico es a la fecha el mas ampliamente mencionado debido a que este es el neurotransmisor inhibitor por excelencia. También se puede mencionar que es ubicuo en el sistema nervioso central y esta abundantemente distribuido en la corteza cerebral en donde además, se encuentran extensamente difundidos los receptores de GABA_A como responsables en la neurotransmisión GABAérgica. Se ha observado que al antagonizar o modificar la neurotransmisión GABAérgica se facilita la aparición de crisis convulsivas como en el Kindling con PTZ o en el Kindling eléctrico.

En el presente trabajo me propongo comparar dos modelos de epilepsia los cuales difieren en cuanto a la forma de estímulo, el químico es por medio de la administración de un agente convulsivante que actúa a nivel del receptor de GABA_A, el otro que se lleva a cabo por medio de la estimulación eléctrica. El utilizar estos dos modelos y el

analizarlos mediante la técnica de ligando-receptor me permite evaluar la participación de los receptores de GABA_A en el desarrollo del Kindling y discernir la cualidad como modelo en cada uno de ellos.

OBJETIVOS GENERALES

En el presente trabajo se planteó comparar los cambios bioquímicos que ocurren en los receptores a benzodiazepinas durante el Kindling eléctrico inducido en la rata con los cambios bioquímicos por el Kindling con PTZ en los ratones.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar la cinética de unión de (3H) flunitrazepam a los receptores a BZ de la corteza cerebral de ratones a diferentes tiempos de estímulo con el PTZ.
- 2) Analizar la cinética de unión de (3H) flunitrazepam a los receptores a BZ de la corteza cerebral de ratones una vez establecido el Kindling químico inducido con PTZ.
- 3) Analizar la cinética de unión de (3H) flunitrazepam a los receptores a BZ de la corteza cerebral de ratas durante diferentes tiempos de aplicación del estímulo eléctrico para inducir Kindling.
- 4) Analizar la cinética de unión de (3H) flunitrazepam a los receptores a BZ de la corteza cerebral de rata una vez establecido el Kindling eléctrico.
- 5) Comparar los resultados obtenidos en ambos modelos experimentales.

MATERIAL Y METODOS

Curva Dosis Respuesta de PTZ

Para encontrar la dosis adecuada subconvulsiva de pentilenetetrazol (PTZ) (Sigma qt.) se elaboró una curva dosis vs respuesta. A grupos de 20 ratones machos adultos (cepa NMR-1) de 27 a 30 g de peso se les administró PTZ en dosis de 27 a 75 mg/K vía intraperitoneal . Se les cuantificó la latencia de aparición de la primera crisis convulsiva, el desarrollo del cuadro convulsivo y el porcentaje de animales muertos .

Desarrollo del kindling químico .

Para el desarrollo del kindling con PTZ, a ratones machos adultos de 27 a 30 g, se les administró diariamente (entre las 17 hrs-19 hrs)por vía intraperitoneal la dosis subconvulsiva de 27 mg/Kg de PTZ. A los animales se les valoró en cuanto a su peso así como en el desarrollo del cuadro convulsivo. De la misma forma que a los animales experimentales se trató a un grupo de animales testigo con solución salina (NaCl 0.9%) y se les observó durante 5 min. en paralelo.

Todos los animales fueron sacrificados en grupos de 20 a los 10 días; y al final del desarrollo del kindling, esto es, a los 30 días. En todos los casos los animales fueron sacrificados 24 hrs después del último estímulo .Los grupos

fueron designados como “Kindling químico” sí los animales desarrollaron crisis convulsivas consecutivas durante los 30 días de análisis; y se les llamó “resistentes” sí los animales no desarrollaron crisis convulsivas durante los 30 días; grupo “diez días” a los animales que fueron tratados con PTZ durante 10 días, y “control” aquellos animales a los que se les inyectó durante 30 días con solución salina (NaCl 0.9%).

Desarrollo del Kindling eléctrico:

a)Crónico

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas wistar adultas macho (grupos de 5 animales), con un peso de 200 a 270 gr. Bajo anestesia general se colocaron electrodos en la corteza sensitivomotora los cuales fueron fijados al cráneo del animal con un conector pequeño. Una semana después de la implantación de los electrodos, los animales fueron sometidos a un régimen de estimulación eléctrica, el cual consistió en la aplicación de un estímulo cada 24 hrs constituido por un tren de pulsos de 1 milisegundo de duración, con una frecuencia de 100 Hz y con una intensidad de 270 microamperios. Los animales se sacrificaron a los 4, 6, 7 y 14 días de estimulación y 24 hrs después de último estímulo, a estos grupos se les denomino por días como K4, K6, K7, y al de 14 días como Kcrónico, el grupo control se manejo de la misma manera en paralelo pero sin estímulo.

b) Agudo.

Los animales (grupos de 5 animales), fueron anestesiados e inmovilizados y se colocaron en el aparato estereotáxico. Se les estimuló la corteza cerebral cada 30 minutos, como se mencionó en el párrafo anterior, hasta que la

postdescarga (pd) mostró una duración de 60 segundos; a este grupo se le designo como Kagudo..

Obtención de la fracción membranal de corteza cerebral.

Los animales (ratones y ratas) se sacrificaron por decapitación, se les disecó la corteza cerebral rápidamente en hielo, el tejido se homogeneizó en 20 vol. de agua a una temperatura de 0-4 C° mediante un Tissumizer durante 40 seg. Una vez homogeneizado el tejido se centrifugó a 48000 x g durante 20 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 20 vol. de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, posteriormente se centrifugó a 48000 x g durante 20 min, esta operación se realizó dos veces más. Al finalizar este procedimiento, se tomaron muestras de 100 µl para determinar proteínas por el método de Lowry y las membranas fueron almacenadas a -70 °C hasta su utilización.

Ensayos de unión o formación del complejo ligando-receptor

Los ensayos de unión de Flunitrazepam [³H](FTZ) (actividad 77 Ci/mmol New England) a las membranas, se realizaron con tres ensayos por triplicado, de la siguiente manera:

Curva de concentración de ligando:

Se incubaron 350 µg de proteína de la fracción membranal de la corteza de los diferentes grupos analizados, en presencia de concentraciones crecientes

(0.1 a 5.0 nmol) de FTZ, el volumen final del medio de incubación fué de 1 ml de amortiguador Tris 50 mM pH 7.4 . De esta curva se gráfico la unión total del ligando a los receptores membranales. Para cuantificar la unión inespecífica se añadió a cada punto de la curva de FTZ una alícuota de 1.0 mM de diazepam para obtener una concentración final de 0.1 mM, y ambos grupos de tubos se incubaron en forma simultánea.

Para todos los casos el tiempo de incubación fue de 60 minutos a una temperatura de 0-4 °C (temperatura de agua de hielo); para terminar la incubación se utilizó el sistema de filtración rápida en filtros whatman GF/B, la cuantificación de la radiactividad se realizó utilizando un líquido de centelleo el cual contenía, Tolueno Baker (1 L), 1,4-bis(5-pHenyloxazolyl)benzene (popop) sigma (0.5g) y 2,5-dipHenyloxazole (ppo) sigma (1 g), en un contador de centelleo líquido.

La unión específica se definió como la unión total menos la unión inespecífica. Las constantes de unión se determinaron mediante el análisis gráfico de Scatchard, utilizando un programa de computación con regresión lineal (Harvard GraphHics) . Este tipo de análisis involucra la ley de acción de masas que, en forma resumida, adopta la siguiente ecuación:

$L+R \rightleftharpoons LR$ donde L= concentración del ligando radioactivo (FNZ [3H]) utilizado y R es el receptor al cual se unirá el ligando.

La constante "K" de asociación K_a y disociación K_d esta definida como sigue:

$$K = \frac{[LR]}{[L][R]} \text{ (los corchetes denotan concentración).}$$

En el análisis de Scatchard, se gráfica $\frac{[U]}{[L]}$ vs U

Donde el eje de las abscisas es la relación unido(U) / libre (L) (U/L) y en el eje de las ordenadas el unido (U), por lo cual una ecuación del tipo hipérbola rectangular se convierte en una línea recta, la ecuación en resumen queda como sigue:

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{B_{max}}{Kd} \left(\frac{1}{Kd} \right) B \quad \text{En donde la } B_{max} \text{ corresponde a la unión máxima.}$$

Con este método la K_d se obtiene como la inversa de la pendiente $\left(\frac{1}{\text{Pendiente}} \right)$

lo cual nos permite determinar el grado de afinidad del receptor; el intercepto en las abscisas nos proporciona la aproximación de la B_{max} o cantidad de receptores (Zivin,1982; Feldman,1972; G. Scatchard,1949).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó el análisis de varianza (anova de una vía) y para ver diferencias significativas entre los grupos, se utilizó una comparación múltiple con la prueba de Dunnett's.

RESULTADOS

Kindling producido por PTZ.

Desarrollo del modelo.

En la curva dosis vs respuesta de PTZ (**Fig. 1a**) se muestra que conforme se incrementa la concentración suministrada de PTZ aumenta el número de animales que convulsionan. Se observa una meseta con la dosis de 40 a 50 mg/Kg y se llega al máximo de animales que convulsionan después de la dosis de 65 mg /Kg.

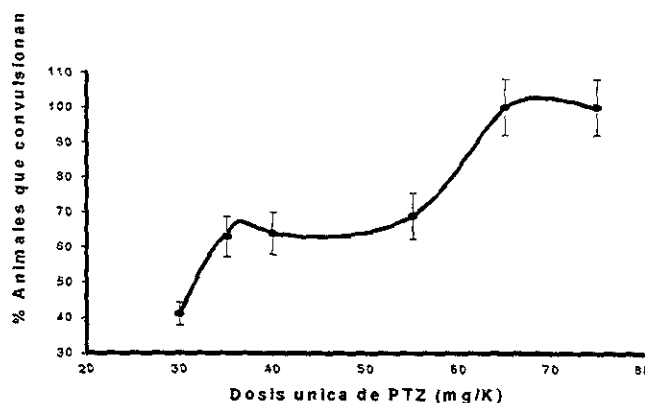


Fig 1a. En la grafica se muestra el efecto de la administracion de una dosis unica de PTZ a diferentes concentraciones y se observa el incremento de animales convulsionados en relacion a la dosis suministrada.

En la (**Fig. 1b**) se observa que con las primeras 3 dosis probadas, los animales no mueren. A partir de la dosis de 40 mg/Kg se presentan casos de animales muertos, y se

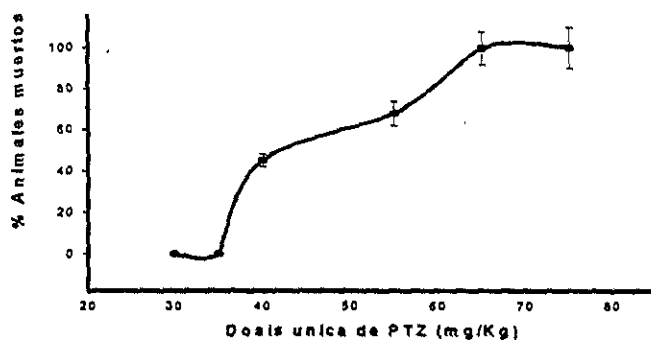


Fig 1b. En la grafica se observa que despues de la dosis de 40 mg/Kg comienza a incrementarse el porcentaje de animales muertos conforme aumenta la dosis de PTZ.

llega al 100% de mortalidad a partir de la dosis de 65 mg/Kg.

En la (Fig. 1c) se observó el tiempo que tarda en aparecer las convulsiones después del tratamiento con una dosis de 27 mg/Kg de PTZ no produce ningún evento apreciable durante el tiempo de observación (60 min.). Sin embargo, después de la dosis de 30 mg/Kg el tiempo de aparición de la primera crisis convulsiva disminuye rápidamente conforme aumenta la dosis suministrada hasta alcanzar una latencia de alrededor de un minuto en la dosis más alta.

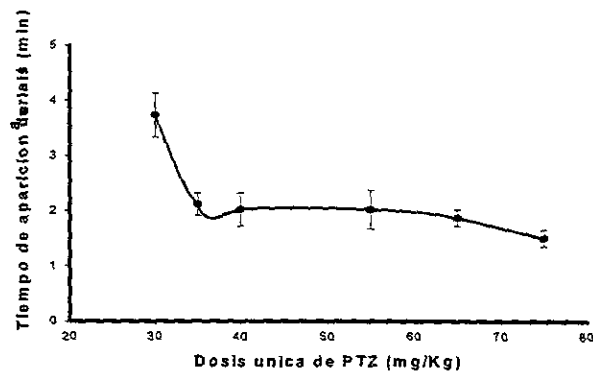


Fig 1c. En la grafica se observa que al aumentar la dosis de PTZ el tiempo de aparición de la primera crisis disminuye considerablemente a menos de dos minutos.

Con la concentración de PTZ de 27 mg/Kg no se presentan animales convulsionados ni muertos por lo que se consideró a esta dosis como dosis subumbral.

Análisis del modelo de Kindling con PTZ.

Para iniciar el desarrollo del modelo, los ratones se inyectaron con una dosis de 27 mg/Kg cada 24 hrs y se determinó que en los 10 primeros días alrededor del 50% de los animales había presentado al menos una convulsión. Con esta dosis el evento convulsivo se hizo más evidente a los 18 días de estímulo. A partir de este día se observó que un número importante de animales (95%) había convulsionado, y se advirtió que el evento decae después del día 20 y se mantiene en un 80% de animales convulsionados (Fig 2).

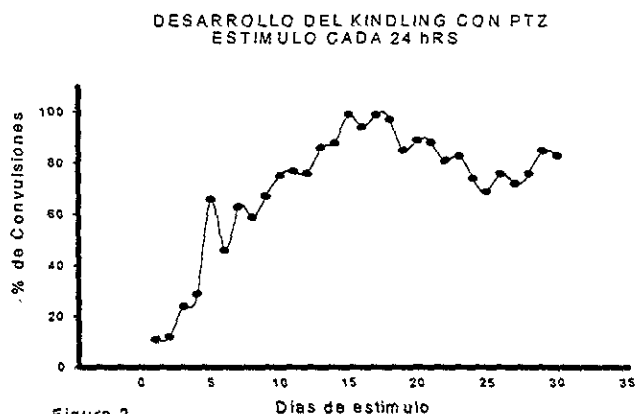


Figura 2.
Desarrollo de Kindling
Los animales se mantuvieron en grupos de 10 animales por caja en condiciones constantes y luz 12:12; los ratones fueron inyectados cada 24 hrs con un dosis subconvulsiva de PTZ (27 mg/K) entre las 18-19 hrs. la grafica muestra el porcentaje de animales convulsionados con relacion a la cantidad de estímulos

Después del día 25 a este grupo de animales se le suspendió la administración de PTZ durante 10 días, al cabo de los cuales se reinició el tratamiento por 5 días más; en este lapso de tiempo, el porcentaje de mortalidad fue del 5%. La reactivación del evento se observó en el 80% de animales que respondió a la misma dosis subumbral de PTZ, los animales que siguieron presentando susceptibilidad al PTZ se les consideró como grupo

de Kindling Químico ya establecido. Por otra parte, al grupo de animales que no desarrolló convulsión alguna (15%) se les consideró como resistentes al PTZ .

Para valorar el evento a corto plazo, otro grupo de animales fue inyectado solo durante 10 días y se observó que presentaron convulsiones el 70% de los animales.

Kindling eléctrico agudo.

Todas las ratas mostraron una respuesta del EEG característica de la postdescarga, la cual se incrementa con relación al número de estímulos (Fig 3).

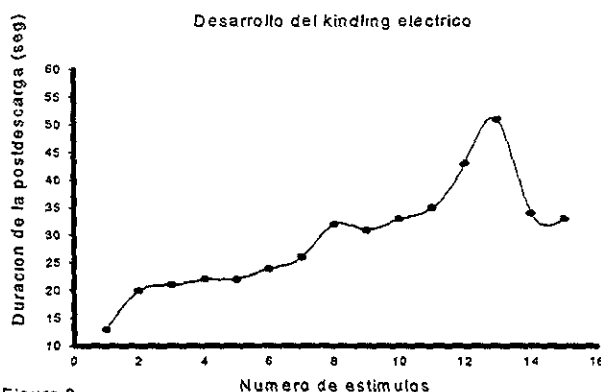


Figura 3.
Kindling electrico
Para el desarrollo del kindling, ratas wistar macho de 250g fueron sometidos a un regimen de estimulación electrica, el cual consistio en la aplicacion de un estímulo cada 24 hrs. El estímulo fue un tren de pulsos de un milisegundo de duracion, con una frecuencia de 100 Hz y con una intensidad de 250 microamperios durante un segundo.
Todas las ratas mostraron una respuesta del EEG característica de la postdescarga, la cual se incrementa en relación al número de estímulos.

Kindling eléctrico crónico.

La conducta de las ratas progresó hasta el estadio 5 descrito por Racine (el cual consiste de convulsiones tónico-clónicas) por lo cual se consideró que el kindling estaba establecido a partir del día 14 de tratamiento.

Análisis de receptores.

Kindling con PTZ.

En la unión de Ftz^[3H] a membranas de corteza cerebral de ratones, el análisis de varianza de la Bmax nos muestra que los ratones resistentes a la estimulación con PTZ, no tienen diferencias significativas con respecto al grupo tratado con PTZ durante 10 días; así como tampoco el grupo de 10 días de estímulo con PTZ tiene diferencia con respecto al control (Fig 4) ($p < 0.05$), $F(8,3)=1523$.

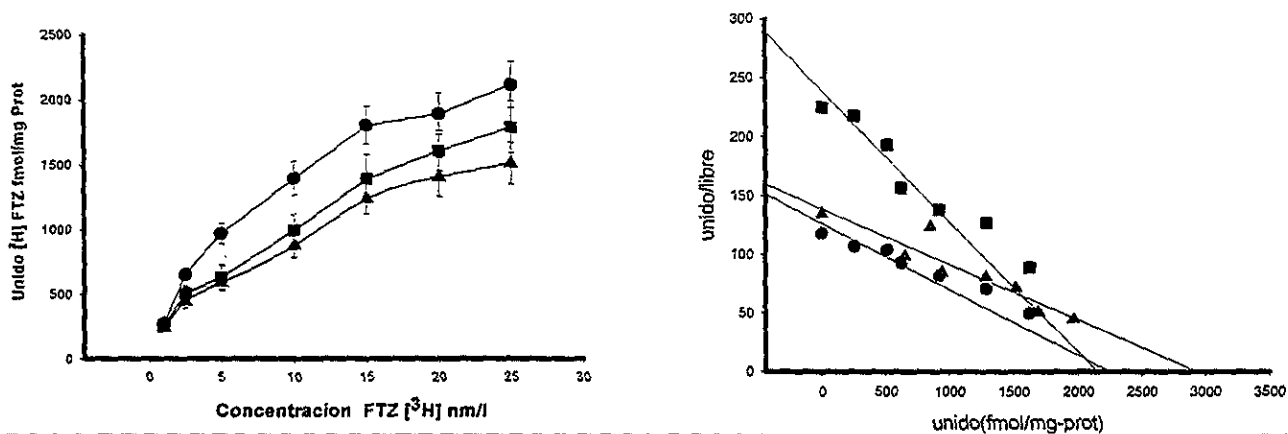


Fig 4. (A). Unión de FTZ [³H] en membranas cerebrales de corteza de ratón. Las curvas de saturación muestran la unión específica como función de la concentración de FTZ [³H] en tejido homogenado de corteza de animales control (○), estimulados durante 10 días (□) y animales resistentes (△). (B) El análisis de scatchard derivado de la unión específica muestra los siguientes resultados: Control Kd=2.16 nM, Bmax=2863 fmol/l; 10 días Kd=1.84 nM, Bmax=2962; resistentes Kd=1.53 nM, Bmax=3078 fmol/l

El grupo que presentó un incremento con respecto al control fue el de kindling, con un incremento del 88.3% respecto al control (Fig 5). Este grupo de kindling también mostró diferencias significativas respecto a los demás grupos tratados (Tabla 1) ($p < 0.05$), $F(8,3)=1523$.

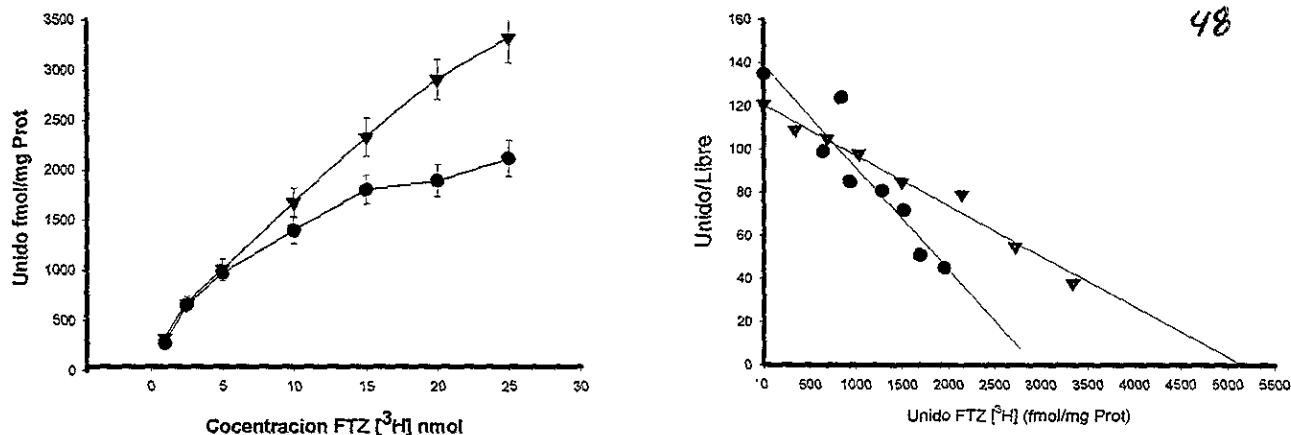


Fig 5. (A). Unión de FTZ [3H] en membranas cerebrales de corteza de ratón. Las curvas de saturación muestran la unión específica como función de la concentración de FTZ [3H] en tejido homogenado de corteza de animales control () y animales con kindling con PTZ (). (B) El análisis de scatchard derivado de la unión específica muestra los siguientes resultados: Control $K_d=2.16$ nM, $B_{max}=2863$ fmol/l; kindling con PTZ $K_d=4.31$ nM, $B_{max}=5392$ fmol/l.

El análisis de varianza muestra que la K_d mostró cambios en los siguientes grupos: el grupo de 10 días de estímulo con PTZ con una disminución en la K_d de 14.7% con respecto al control, y el grupo de kindling presentó un aumento en la K_d del 100 % con respecto al control ($P<0.05$) $F(8,3)=169748$. El grupo de ratones resistentes al PTZ también mostró un incremento pequeño pero significativo (14.5%) con respecto al control ($P<0.05$) $F(8,3)=169748$. Por otra parte, el grupo de diez días mostró una disminución significativa del 27 % con respecto al grupo de ratones resistentes y del 57 % con respecto al grupo de kindling con PTZ ($P<0.05$) $F(8,3)=169748$.

Kindling eléctrico.

Kindling eléctrico agudo

Como se evidencia en la Fig 6 el número de receptores del grupo Kagudo disminuyó significativamente con respecto al control en un 20%; además se advierte en el análisis de varianza, que el grupo Kagudo es significativamente diferente con respecto a los demás grupos estimulados eléctricamente ($P < 0.05$), $F(8,3)=15049$ (tabla 2).

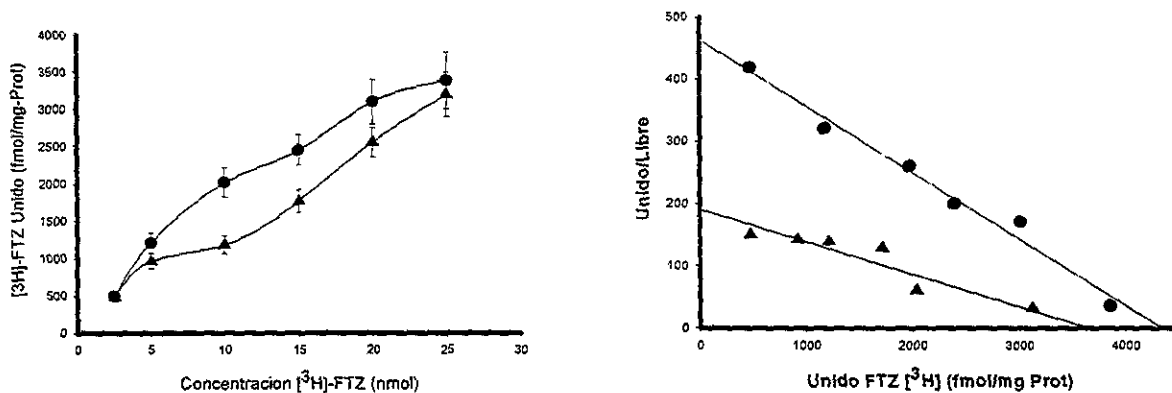


Fig 6. (A). Unión de FTZ $[^3H]$ en membranas cerebrales de corteza de rata. Las curvas de saturación muestran la unión específica como función de la concentración de FTZ $[^3H]$ en tejido homogenado de corteza de animales control () y kagudo (). (B) El análisis de scatchard derivado de la unión específica muestra los siguientes resultados: Control $K_d=0.52$ nM, $B_{max}=4314$ fmol/l; kagudo $K_d=1.65$ nM, $B_{max}=3480$ fmol/l

La K_d del grupo Kagudo presenta un incremento del 223% con respecto al control y es significativamente diferente a la K_d de los grupos que recibieron 6 y 7 estímulos ($P < 0.05$), $F(8,3)=1225$ (Tabla 2).

Kindling Crónico.

En el Kindling crónico el número de receptores aumentó un 33% con respecto al valor obtenido para el grupo control (Fig 7) y es significativamente diferente en un 65% respecto al número de receptores presentes en el grupo con Kagudo, y un 12% respecto al grupo de 4 estímulos del kindling. Por otra parte, el kindling crónico muestra diferencias significativas en la Bmax con los grupos de 6 y 7 estímulos ($P < 0.05$), $F(8,3) = 15049$. (tabla 2).

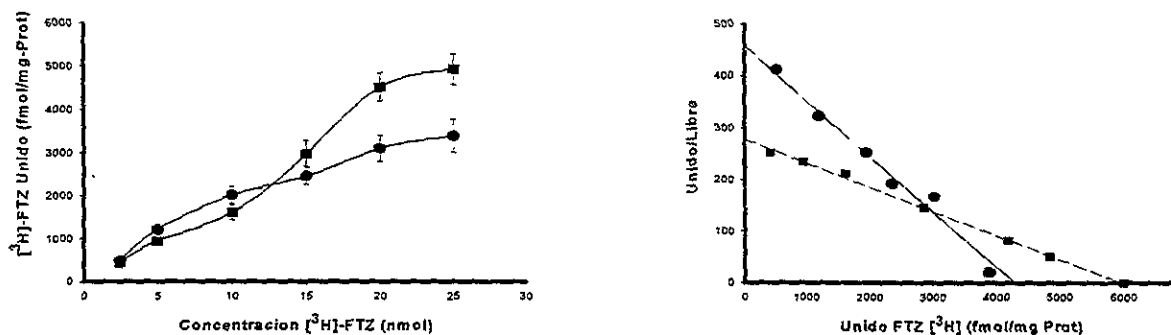


Fig 7. (A). Unión de FTZ [^3H] en membranas cerebrales de corteza de rata. Las curvas de saturación muestran la unión específica como función de la concentración de FTZ [^3H] en tejido homogenado de corteza de animales control () y animales con kindling crónico (). (B) El análisis de scatchard derivado de la unión específica muestra los siguientes resultados: Control $K_d = 0.52$ nM, $B_{max} = 4314$ fmol/l y el kindling crónico $K_d = 1.76$, $B_{max} = 5778$ fmol/l

En el análisis de la Bmax en los grupos de diferentes días de estimulación (Fig 8), se observa que el grupo de cuatro estímulos es significativamente diferente respecto al control con un incremento del 19 %, es significativamente diferente de los grupos de 6 y 7 estímulos. Respecto a los grupos de 6 y 7 estímulos, son diferentes entre sí y muestran incrementos con respecto al control del 46% y 59% respectivamente ($P < 0.05$), $F(8,3) = 15049$ (tabla 2).

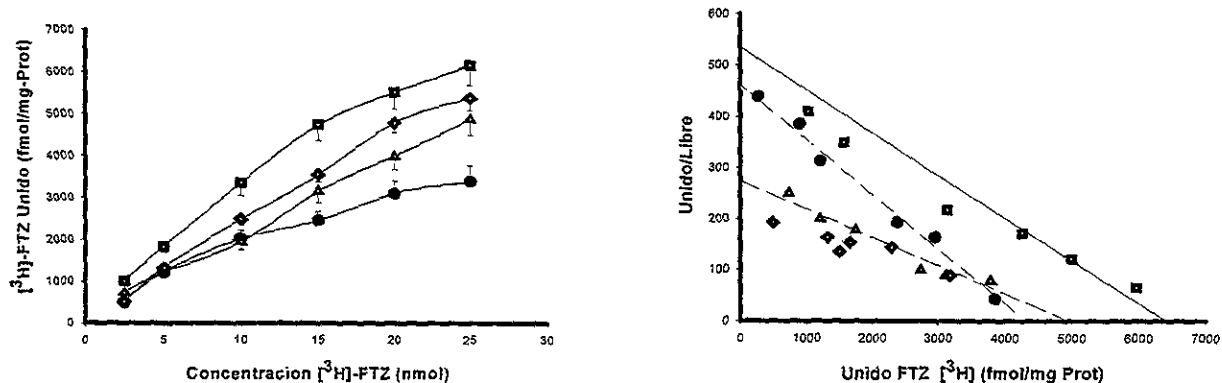


Fig 8. (A). Unión de FTZ [^3H] en membranas cerebrales de corteza de rata. Las curvas de saturación muestran la unión específica como función de la concentración de FTZ [^3H] en tejido homogenizado de corteza de animales control (), 4estímulos (), 6estímulos () y 7estímulos (). (B) El análisis de scatchard derivado de la unión específica muestra los siguientes resultados: Control $K_d=0.52$ nM, $B_{\text{max}}=4314$ fmol/l; 4estímulos $K_d=1.67$ nM, $B_{\text{max}}=5139$ fmol/l, 6 estímulos $K_d=1.45$ nM, $B_{\text{max}}=6312$ fmol/l; 7estímulos $K_d=1.27$, $B_{\text{max}}=6869$ fmol/l.

En el análisis de varianza de la K_d , se observa que el grupo de kindling crónico es significativamente diferente con respecto al control con un incremento del 242 %; con los demás grupos analizados los cambios observados son del 31 % con el grupo 7estímulos, y del 16 % con el grupo 6estímulos ($P<0.05$), $F(8,3)=15049$ (Tabla 2)

Aplicando el análisis estadístico y comparando la K_d de los grupos con diferentes días de estimulación, el grupo de 4 estímulos es significativamente distinto de los grupos de 6 y 7 estímulos y presenta un incremento de 229% con respecto al control ($p<0.05$). Al comparar los grupos de 6 y 7 días de estimulación, éstos muestran diferencias significativas entre sí del 12%, y muestran incrementos respecto al control del 196 % y 160 % respectivamente ($P<0.05$), $F(8,3)=15049$ (Tabla 2).

TABLA num 1

	<i>Bmax (fmol)</i>	<i>Kd (nmol)</i>
<i>Control</i>	2863 ± 34	2.16 ± 0.0059
<i>Resistentes</i>	3078 ± 59 ^{a*}	2.53 ± 0.0065 ^{b*}
<i>Diez Días</i>	2962 ± 75 ^{a*}	1.84 ± 0.002 ^{b*}
<i>Kindling</i>	5392 ± 36 ^{a*}	4.312 ± 0.001 ^{b*}

Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos por triplicado ± el error estándar. Las concentraciones de FTZ[³H] utilizadas fueron de 0.1 a 5.0 nmol/l y la unión inespecífica fue menor del 10% el análisis estadístico con respecto al control en la Bmax; fue de (^{a*})p<0.05 y F(8,3)=1523.86; para la Kd el análisis estadístico con respecto al control fue de (^{b*}) p<0.05 y F(8,3)=169748.

TABLA num 2.

	Bmax (fmol)	Kd (nmol)
CONTROL	4314 \pm 26 ^{c*}	0.52 \pm 0.22 ^{d*}
KAgudo	3480 \pm 11.5 ^{c*}	1.65 \pm 0.08 ^{d*}
4Estímulos	5139 \pm 23 ^{c*}	1.67 \pm 0.09 ^{d*}
6Estímulos	6312 \pm 12.7 ^{c*}	1.45 \pm 0.18 ^{d*}
7Estímulos	6869 \pm 16.7 ^{c*}	1.27 \pm 0.22 ^{d*}
KCrónico	5778 \pm 37 ^{c*}	1.76 \pm 0.09 ^{d*}

Los datos se presentan como el promedio de 3 experimentos por triplicado, el grupo kindling agudo fue sacrificado 1 hr después del último estímulo y los demás animales fueron sacrificados 24 hrs después del último estímulo. Las concentraciones de Ftz [³H] fueron de 0.1 a 5.0 nmol/l y la unión no específica fue menor del 10%, el análisis estadístico con respecto al control en la Bmax (^{c*}) fué de p<0.05 y F(8,3)=15049; para la Kd el análisis estadístico con respecto al control (^{d*}) fue de p<0.05 y F(8,3)=1225.

DISCUSIÓN.

Se ha definido al kindling como un incremento en la susceptibilidad a las convulsiones inducidas por estimulación eléctrica repetida. Este fenómeno se ha descrito para muchas especies dentro de las cuales se puede mencionar al ratón y a la rata.

También se ha descrito el modelo del kindling químico con PTZ el cual se desarrolla de la misma manera en ratas y en ratones; no obstante, el modelo está poco entendido, así como también son muy escasos los estudios que comparan los eventos bioquímicos del kindling eléctrico con el kindling químico inducido con PTZ.

En el presente trabajo, para encontrar la dosis subconvulsiva de PTZ, se administró a un grupo de ratones una dosis única de PTZ. Las dosis de 27 y 30 mg/Kg no mostraban ningún efecto, así que se decidió que la de 27 mg/Kg era la dosis subconvulsiva adecuada por ser la de más baja concentración. Como se advierte en los resultados, conforme aumenta la concentración de PTZ se hacen más notorias las crisis convulsivas, y también se evidencia la disminución en la latencia de aparición de la primera crisis.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el grupo de ratones utilizado tiene una sensibilidad superior si se compara con los resultados de otros autores, ya que estos describen concentraciones por arriba de 40 mg/Kg para alcanzar las convulsiones y establecer el modelo de Kindling (Karler 1989) en cambio en el presente trabajo se utilizó una dosis menor a 35 mg/Kg. Este hecho puede deberse probablemente a cambios en los lotes de PTZ o bien, a que se utilizaron otras cepas de ratones las cuales podrían tener diferentes umbrales de respuesta al PTZ .

También se ha encontrado que la sensibilidad al PTZ se modifica durante el transcurso del día, y se ha observado que los ratones responden mejor a dosis bajas por la tarde-noche que por la mañana (Granados 1989), lo cual podría explicar en parte los resultados encontrados por otros autores. En el presente trabajo la administración de PTZ se realizó entre las 18:00 y las 19:00 hrs y se desconoce los horarios utilizados por otros autores.

Al comparar con otros informes con el presente trabajo, se observa que cuando se administra el PTZ por vía subcutánea a una dosis de 40 mg/Kg, se requiere de un tiempo menor para la aparición de las crisis aunque semejante a las dosis de 45 mg/Kg (Karler 1989). Se ha descrito que depende de la vía de administración el tiempo que tarda en aparecer la primera crisis epiléptica ya que el tiempo de absorción es diferente. El PTZ administrado por vía intraperitoneal tarda un tiempo menor en llegar al cerebro en concentraciones suficientes para producir crisis; en cambio la administración subcutánea de PTZ requiere de casi el doble de tiempo

para que el compuesto logre la concentración óptima que origina las convulsiones (Yonekawa 1980); aunque estos resultados contradicen lo encontrado por Karler (1989).

En el presente estudio observamos que con la dosis intraperitoneal de 40 mg/Kg los animales tienen un número importante de convulsiones (50%) así como de animales muertos (40%) y en las dosis de 60 y 70 mg/Kg el tiempo de aparición de la primera crisis se reduce considerablemente, a demás de que el número de animales muertos se incrementa al 100%. En particular en la cepa utilizada por nosotros entre la dosis de 40 mg/Kg y 50 mg/Kg se encuentra un punto de inflexión el cual pudiera estar dado por cuestiones de cepa o bien porque únicamente se cuantificó el evento de crisis tónico-clónicas y no otro tipo de parámetros que se sabe aparecen en diferentes momentos del modelo de convulsión.

Durante la administración intraperitoneal diaria de PTZ, el kindling se estabilizó después de los 12 días y hasta el día 20 de inyección, obteniéndose un número importante de animales con Kindling permanente así como un grupo pequeño de animales muertos (5%); estos resultados hacen de este modelo una buena opción para el estudio de las crisis convulsivas ya que además presenta un manejo más fácil así como el poco espacio que necesitan los ratones en el bioterio, en comparación con las ratas en las cuales se necesita un gran número de animales debido a que muere una proporción importante.

Por otra parte, en nuestros resultados se observa que un grupo de animales no desarrolló ninguna convulsión durante la administración de PTZ, y por lo tanto no

desarrollaron Kindling. La resistencia a desarrollar kindling también ha sido descrita en el Kindling producido por β Carbolina en donde se ha encontrado un grupo de ratones que no desarrollan ninguna crisis convulsiva, a esta observación no se le ha encontrado explicación (Little, 1984; Lewin, 1989).

Este hecho nos permite especular que probablemente un factor genético pudiera estar involucrado en la sensibilidad a las convulsiones, dado que tanto el PTZ como la β Carbolina no afectan de ninguna manera a los ratones resistentes. Esto pudiera ser debido a que los ratones resistentes tengan un polireceptor de GABA_A diferente al de los animales sensibles.

Cuando se compara el desarrollo conductual del kindling con PTZ y el Kindling eléctrico crónico, se observa que al aumentar la duración de la postdescarga en los animales estimulados eléctricamente, aumentan las crisis, y conforme aumenta el número de estímulos con PTZ se incrementan las convulsiones de una manera muy similar en ambos grupos.

Desde el punto de vista bioquímico, el cambio en las constantes analizadas mostró diferencias entre los distintos modelos. En el kindling con PTZ se determinó un incremento notable en el número de receptores, en el kindling eléctrico agudo solo se observa una disminución en la B_{max}, y en el kindling crónico, se manifiesta un ligero aumento en los receptores. Este evento puede explicarse desde la perspectiva

de que el PTZ antagoniza al polireceptor de GABA_A directamente lo que origina una respuesta neuronal que aumenta el número de receptores.

Durante el desarrollo del Kindling crónico, se observa un cambio gradual en la constante B_{max}: conforme aumenta el número de estímulos eléctricos, se incrementa el número de receptores, observándose el máximo aumento en la estimulación número 7. Sin embargo, el principal cambio detectado durante el desarrollo del Kindling a diferentes días de estimulación eléctrica, es la disminución en la afinidad del receptor la cual podría ser causada por la estimulación eléctrica *per se*, ya que el estímulo es menos específico y genera despolarizaciones masivas de las áreas localizadas cerca del electrodo. Estas despolarizaciones podrían originar cambios en los neurotransmisores involucrados en esas zonas al producir cambios en la conductancia a diferentes iones (Horstterman, 1993). Este cambio en la conductancia podría generar una regulación indiscriminada de los diferentes neurotransmisores, que en particular llevaría a modificaciones importantes en la K_d del sistema gabaérgico desde los primeros estímulos y a cambios no tan rápidos en la cantidad de receptores ya que estos no reciben una estimulación directa.

Esta observación es diferente cuando se estimula con PTZ el cual, como se sabe ahora, interacciona con el polireceptor de GABA_A (Ramanjaneyulu 1983). La administración repetida de dosis subconvulsivas de PTZ da origen a una progresiva sensibilización, que trae como consecuencia el denominado Kindling químico. Al

estudiarlo desde el punto de vista de receptores a Bz la respuesta inicial que se detectó fue un incremento en la afinidad del receptor al ser estimulado repetidamente. Esta constante disminuye dramáticamente cuando se establece el Kindling con PTZ, a diferencia de la B_{max} la cual se incrementa notablemente. En cambio en los animales resistentes, las modificaciones en las constantes no son claras lo que apoyaría el hecho de que el PTZ en estos animales probablemente no interacciona igual con los receptores a GABA_A.

El PTZ distingue dos subtipos de receptores de benzodiazepinas en el cerebro, en tanto que en el cerebelo, distingue solo un tipo de receptor. En la corteza cerebral se ha descrito que al PTZ afecta al receptor del tipo I de la misma manera que la β Carbolina, lo que explica la semejanza en cuanto a los resultados obtenidos al producir kindling con ambas sustancias (Little 1984).

Nuestros resultados sugieren que el desarrollo del Kindling químico depende principalmente de la estimulación directa con PTZ en el receptor probablemente de tipo I, al igual que ocurre en el Kindling descrito con β Carbolina, esto explicaría los cambios en cuanto a K_d y B_{max} observados en el presente trabajo y la diferencia con el Kindling agudo y crónico generados con estimulación eléctrica, que afecta además del sistema GABAérgico a diferentes sistemas de neurotransmisión (Kamphuis 1990).

El hecho de que en ambos modelos el polireceptor se regule de manera distinta, nos habla de que se está dando una respuesta diferente de los sistemas de neurotransmisores involucrados que están actuando en cada uno de los modelos. Por otra parte se tiene claro que el PTZ interactúa competitivamente con el sitio de unión de picrotoxina dentro del canal de cloro del polireceptor de GABA, disminuyendo el flujo de iones Cl^- a través de la membrana, esto explicaría el incremento en el número de receptores con baja afinidad como respuesta al bloqueo del receptor. Sin embargo, para las crisis inducidas por estimulación eléctrica se sugieren cambios en el potencial de membrana así como modificaciones en las concentraciones intercelulares de K^+ , Na^+ , Cl^- y Ca^{++} , que dan como consecuencia una depolarización generalizada (Heinemann, 1986); y además podría proponerse que debido al cambio en la conductancia a estos iones se puede llevar a cabo la activación de la fosforilación dependiente de AMPc, la cual regula la activación del receptor de GABA_A (Leidenheimer, 1991). Esto pudiera explicar que el principal cambio ocurre en la afinidad del receptor.

CONCLUSION.

- 1) En el Kindling producido por la administración de PTZ conforme aumenta el número de estímulos, se modifica el número de receptores a Bz, lo cual sugiere que sea debido a la estimulación directa del receptor por el PTZ.

- 2) Los receptores a Benzodiazepinas, al estimularse con PTZ, cambian su sensibilidad al GABA; y por lo tanto desarrollan una actividad epileptogénica que se ha denominado como Kindling químico. Al producir el Kindling con PTZ se encontró una población resistente a la crisis, en estos animales no se modifica el número de receptores debido a que el receptor de GABA_A quizá presenta una afinidad diferente al PTZ.

- 3) La estimulación eléctrica crónica, dio origen a un cambio modesto en el número de receptores, no obstante la KD se aumentó considerablemente, esto trae como consecuencia una importante disminución en la afinidad del receptor, por lo que es probable que este efecto en el receptor facilite el desarrollo del Kindling.

- 4) La estimulación eléctrica aguda, provoca principalmente cambios en la afinidad del receptor de GABA_A, disminuyéndose como una respuesta a la estimulación eléctrica repetida durante cortos periodos de tiempo.

Perspectivas

Los resultados bioquímicos presentados en este trabajo demuestran que existen diferentes respuestas neuronales en cada tipo de crisis convulsiva que es generada por los distintos métodos. Teniendo en cuenta estas diferentes respuestas neuronales, podremos proponer el uso de estos modelos, considerando los cambios en los distintos neurotransmisores, como procedimientos de prueba para los diferentes anticonvulsivos y con estos conocimientos poder ampliar el entendimiento de cómo funcionan las drogas antiepilépticas. Por otra parte el tener cierto grupo de ratones resistentes al PTZ nos permite especular la presencia de ciertos elementos genéticos en el desarrollo de las crisis convulsivas y nos sugiere el que el sistema GABAérgico definitivamente juega un papel preponderante en la epilepsia.

REFERENCIAS

- 1.- Agranoff, B.W., Agents that block the memory. In Quarto In. G and Melnechuk. T (eds.), Neuroscience a study program, The University Rockefeller, New York, 1967, pp. 756-764.
- 2.- Andrade R. Malenka RC, Nicoll RA. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus, *Science* 234 2161-1265 (1986)
- 3.- Baba, H., Facilitatory effects of intermittent photostimulation on visual cortical Kindling *Epilepsia*, 23(1982) 663-670.
- 4.- Bennet, J.P., Neurotransmitter receptor binding: methods in binding studies Raven Press, New York, 1978.
- 5.- Bizire, K. and Chambon, J.P., Models Animaux D'Epilepsie et crises experimenteles, *Rev. Neurol. (Paris)*, 143(5) (1987)329-340.
- 6.-Brailowsky S. Kunimoto M, Menini C. Silva-Barrat C. Richie D, Naquet The GABA withdrawal syndrome : A new model of focal epileptogenesis. *Brain Research* 23 : 175-179 (1988)
- 7.- Chavoix, C.H., Brouillet, M., Guibert, B., Fukuda, H.S.,Fournier, D., Naquet R. and Mazire, M., Status epilepticus induced by pentilenetetrazole modulates in vivo (IICjRo 161788 binding to benzodiazepine receptor complex, *Eur. J.Pharmacol*, 146 (1988) 207-274.
- 8.-Cooper, J. and Bloom, J.E., Biochemistry of the central nervous system. In Bloom.F. E (ed.), *The bichemical basies of neuropharmacology*, Oxford University Press, New York, 1974, pp. 43-64.
- 9.- Craig, R. and Colasanti, B., A study of pentylenetetrazol Kindling in rats and mice *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 35 (1989) 867-870.

- 10.- Karlerr,L, D, Calder.L, P, Sangdee.,and A, Turkanis.S.,Interaction between delta-9 tetrahydrocannabinol and Kindling electrical and chemical stimuly in mice *Neuropharmacology*, 23 (1989) 1315-1320.
- 11.- de la Florida, A. and Delgado, J.M., Lasting behavioral and EEG changes in cats induced by prolonged stimulation of the amigdala, *AM.J. Physiol*, 193 (1958) 223-229.
- 12.- Diechter, R. and Sidman, R.J., Anticonvulsant sensitivity of absence seizures in the totteriin mutant mouse, *Epilepsia*,25 (1983) 25-34.
- 13.- Dietel, M., Whats new in receptor mediated growth promotion of normal and malignant cells?, *Path. Res. Pract*, 182 (1987)
- 14.- Dietel, M., Koustrouch, P., Courtoy, J., Boonstrou, J. and Thot, J., What's new in the importance of receptors in pathology?, *Path. Res. Pract.*, 184 (1989) 116-127.
- 15.- Douglas, W.W., Stimulus-secretion coupling: The concept from chromaphine and other cells, *Brit J. Pharmacol*, 34 (1968) 451-474.
- 16 Eccles, J.C., *The physiology of synapsis* Verlag Inc., Berlin,1964.
- 17 Eldefrawi, A. and Eldefrawi, M., Receptors for gama-aminobutiric acid and voltage dependent chloride chapels as targets for drug and toxicans, *FASEB Journals*, 1 (1987) 9-17
- 18.- Fariello RG, Forcheti CM, Fisher MD. Gabaergic function in relation to seizure phenomena pp 77-93 en *Neurotransmitters and Epilepsy* ed. Robert S. Fisher and Joseph T. Coyle edts. Wiley-Liss 1991.
- 19.- Feldeman, F., Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: Some methods for parameter , *Analytical Biochemistry*, 48 (1972) 317-338.

- 20.- Fisher S.Robert. Animal Model of the Epilepsies pp 61-93 en
Neurotransmitters and Epilepsy ed. Robert S. Fisher and Joseph T. Coyle eds.
Wiley-Liss 1991
- 21.- Gloor, P. and Farinello, p., Generalized epilepsy: some of its cellular
mechanism differ from those of focal epilepsy, TINS, 11(2) (1988) 63-67.
- 22.- Godard, G.V., McIntyre, G. and Leech, C.K., Exp. Neurol, 25(1969) 295-330.
- 23.-Goddard, G.V., Development of epileptic seizures throng brain stimulation at
low intensity, Nature, 214 (1967) 1020-1021.
- 24.- Goddard, G.V. and Douglas, R.M., Does the engram of Kindling model the
engram of normal long term daily memory?, Can. J.Neurol Sci, 2 (1975) 385-399.
- 25.- Granados Fuentes Daniel. Modificación de Parametros convulsivos despues
de la administración de la hormona melatonina (Tesis de licenciatura) 1990.
- 26.- Gray, E.J., Axo-somatic and Axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An
electron microscope study,, 93 (1959)420-433.
- 27.- Salomon. and Snyder, H., Drug and neurotransmitter receptors in the brain,
Science, 224 (1984) 22-30.
- 28.- Haefely, F.W., The neurobiology of axiety. In Anne son (ed.), Handbook of
anxiety,Plenum Press, New York, 1990, pp. 165- 187.
- 29.- Hamberger, A. and Nystrom, M., Amino acid transport phenomena in the
nervous system Plenum Press, New York, 1976.
- 30.- Herkenham, H., Mismatches between neurotransmitter and receptor
localisation in brain: observations and implications, Neurociences, 1 (1987) 1-38.
- 31.- Hill DR, Bowrey NG ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive
GABAa sites in rat brain . Nature 290 (1981) 149-152.
- 32.- Kamphuis, W. and Lopes-da Silva, F., The Kindling model of epilepsy: The role
of GABAergic inhibition, Neuroscience Research Communications, 6(1) (1990) 1-9.

- 33.- Kandel, E.R., Cellular Bases of Behaviour: An introduction to behavioural neurobiology Freeman Co., San Francisco, 1977.
- 34.- Kandel, E.R., A cell-biological approach to learning grass lecture monograph Society for Neuroscience, Bethesda, 1978.
- 35.- Kanphuis, M. and Lopes-daSilva, F., The Kindling model of epilepsy: The role of GABAergic inhibition, Neuroscience's Research Communications, 6(1) (1990) 256-258.
- 36.- Karler, P., Murphy, V., Calder, L. and Turkanis, S.A., Pentylentetrazole Kindling in mice, Neuropharmacology, 28(8) (1989) 775-780.
- 37.- Karler, R.L., Calder, R.D., Sangdee, P. and Turkanis, S.A., Interaction between delta9-tetrahydrocannabinol and Kindling electrical and chemical stimuli in mice, Neuropharmacology, 23 (1984) 1315-1320.
- 38.- Killam KF. Killamn EK. Naquet R. Bert J. Paroxysmal responses to intermittent light stimulation in a population of baboons (*Papio papio*) *Epilepsia* 7 (1966) 215-219
- 39.- Lara, R. and Sandoval, M.E., Hacia un enfoque de sistemas biológicos (Cerebro, Metáforas y Modelos Consejo Nacional de Ciencias y T, Distrito Federal, 1986.
- 40.- Leach, M.J., Marden, C.M., Miller, A. and O'Donelle, J., Changes in cortical amino acids during electrical Kindling in rats, Neuropharmacol, 24(10) (1985) 937-940.
- 41.- Leeb-Lundberg, F., Napias, S. and Olsen, R.W., Dihydropicrotoxinin binding sites in mammalian brain: Interactions with convulsant and depressant benzodiazepines, Brain Res. 216 (1980) 399-400.

- 42.- Leonard, P., Interrelationship between neurotransmitter, *Neuropharmacology*, 23(2B) (1984) 213-218.
- 43.- Lewin, E. and Peris, J., Chemical Kindling decrease GABA- activated chloride channels of mouse brain, *European Journal of Pharmacology*, 160 (1989) 101-106.
- 44.- Lindstrom, J., *Biochemica studies with antibodies* Raven Press, New York, 1978.
- 45.- Little, H.J., Nutt, D.J. and Taylor, S.C., Optimizing the pentylenetetrazole seizures thresholds, *Br. J. Pharmacol (suppl)*, 88 (1986) 326.
- 46.- Little, J. and Nutt, D., Acute and chronic effects of the benzodiazepine receptor ligand FG 7142: proconvulsant properties and Kindling, *Br. J. Pharmacol*, 23 (1984) 8395.
- 47.- Llinas, R. and Steinberg, I., Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for the calcium gate, *Proc.Acad.Nat.Sci*, 873 (1976) 2918-2922.
- 48.- Maharaj K.Tiku, Shrinivas K. Kulkarni. Modulatory role of GABA receptor subtypes and glutamate receptors in the anticonvulsan effect of barbiturates en Neurotransmitter in Epilepsy capitulo 8 pp 57-86 (1992) Elsiwer Science Publishers.
- 49.- Majkowsky, J., A model for epilepsy and memory, *Acta Neurol Scand*, 74(109) (1986) 97-108.
- 50.- Marescaux, J., Micheletti, J., Vergnes, M. and Depaulis, P., A model of chronic spontaneous petit mal-seisures in the rat:Comparation with pentylenetetrazol-induced seisures, *Epilepsia*, 25(3) (1984) 326-331.

- 51.- Martinez de Muñoz, D., Modo de Accion de Algunos Farmacos Antiepilepticos. In Feria-Velasco A, Martinez de-Muñoz D, and Rubio-Donnadieu F. (eds.), *Epilepsia un Enfoque Multidisciplinario*, Trillas, D.F., 1986, pp. 140-167.
- 52.- Mcburney, R. and Neering, R., Neuronal Calcium homeostasis, *TINS*, 10(4) (1987) 164-169.
- 53.- Meduna, L. and Friedman, E., The convulsive-irritative therapy of psychoses, *J. Am. Med. Assoc.* 112 (1939) 501-509.
- 54.- Miller, J.W., Mackeon, A.C. and Ferrendelli, J.A., Functional anatomy of pentylenetetrazole and electroshock seizures in the rat brainstem, *Mol.Cell.Biochem*, 39 (1974) 217-249.
- 55.- Miller L.G. Greenblat, D.J. Benzodiazepine receptor binding; influence of physiologic and pharmacology factors *Biopharm-Drug-Dispos*, 1987 8 (2) 103-114.
- 56.- Moheler, H. and Okada, P.J., Benzodiazepine receptor occupation: demostration in the central nervous system, *Sciences*, 198 (1977) 849-851.
- 57.- Morin A.M. Beta-carboline kinling of the benzodiazepine receptor. *Brain research* 1984 29 ; 321 (1): 151-154
- 58.- Neher, E., The use of the patch clamp technique to study second messenger-mediated cellular events, *Neurosciences*,26(3) (1988) 727-734.
- 59.- Niznik-H.B. Kish S.J. Decreased benzodiazepine receptor binding in amygdala-kinled rat brains. *Life Sciences* 1983, Agu 33(5); 425-30
- 60.- Olsen, R.W., GABA Benzodiazepine-barbiture receptor interactions, *J. Neurochem*, 37(1) (1981) 214-216.
- 61.- Olsen, W. and Tobin, A., Molecular biology of GABA_A receptors, *FASEB Journal*, 4 (1990) 1469-1480.

- 62.- Palade, G.E. and Palay, S., Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anatomical Res.*, 118 (1954) 335-336.
- 63.- Palay, S., Synapses in the central nervous system, *J. Biophys Biochem Cytol*, 2 (1956) 193-206
- 64.- Palay, S., The morphology of synapses of central nervous system, *Exp. Cell. Res.*, 5 (1958) 420-433.
- 65.- Papas, G.D. and Waxman, S.J., Structure and function of synapses Purpura D. P., New York 1972
- 66.- Parnas, H. and Segal, L., Facilitation as a tool to study the entry of calcium and the mechanism of neurotransmitter release, *Progress in Neurobiology*, 32 (1989) 1-9.
- 67.- Paul, S.M., Syapin, R.J., Moncada, P. and Skolnik, P., Correlation between benzodiazepine receptor occupation and anticonvulsant effects of diazepam, *Nature*, 198 (1977) 849-951.
- 68.- Penner, P. and Neher, E., The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells, *J. Exp. Biol*, 139 (1988) 329-345.
- 69.- Piredda, S., Yonekaw, D., Whittinham, P. and Kupferberg, G., Enhance bursting activity in the CA3 region of the mouse hippocampal slice without long-term potentiation in the dentate gyrus after systemic pentylentetrazol Kindling, *Exp Neurol*, 94 (1986) 659-669.
- 70.- Piredda, S., Yonekawa, W., Whittinham, P. and Kupferberg, F., Enhance bursting activity in the CA3 region of the mouse hippocampal slice without long-term potentiation in the dentate gyrus after systemic pentylenetetrazole Kindling, *Exp. Neurol*, 94 (1986) 659-669.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 71.- Pohl M. Rhythmic metrazol activity and cortical spreading depression. *Physiol B.* 1986; 35(2): 140-150
- 72.- Racine, M., Kindling: The first decade, *Neurosurgery*, 3 (1978) 234-252.
- 73.- Racine, R. and Zaide, J., Further investigation in to the mechanisms underlying the Kindling phenomenon. In Living-stonK. E and Hornykiewics O (eds.), *The continuing evolution of the limbic system concept*, Plenum Press, NewYork, 1978, p. 61-650.
- 74.- Ramanjaneyulu-R, Ticku M.K, Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur. J. Pharmacol* 1984, 98(3-4): 337-45
- 75.- Reyes, A. and Chávez, J.L. *Cong Nal de Ciencias fisiológicas (Puebla)*, 15 (1984) 1232.
- 76.- Richards J.G. Moheler H. *Benzodiazepine Receptors Neuropharmacology*, 1984, 23(2B): 233-42.
- 77.- Rubin, R.P., The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones, *Pharmacol Reviews*, 22 (1970) 389-428.
- 78.- Sandoval, M.E., Studies on the relationship between Ca^{++} efflux from mitochondria and the release of aminoacid neurotransmitter, *Brain Research*, 175 (1980) 250-255.
- 79.- Sangdee, P., Turkanis, S. and Karler, R., Kindling like effect induced by repeated cornal electro-shock. *Epilepsia*, 23 (1984) 471 -479.
- 80.- Sangdee, P., Turkanis, S.A. and Karler, R., Kindling like effect induced by repeated corneal electroshock in mice, *Epilepsia*, 23 (1982) 471-479.
- 81.- Scatchard, M., The atractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 (1949) 660-672.

- 82.- Solis Ortiz, H. and Aranz-Contreras, J., Modelos Experimentales de Epilepsia. In Feria Velasco A and Martinez de Muñoz D (eds). Epilepsia un Enfoque Multidisciplinario, Trillas, D.F., 1986, pp. 74-97.
- 83.- Snyder S.H. Drug and neurotransmitter receptors in the brain. Science 1984 April 6, 224 (4644).
- 84.- Squires, R.F. and Bastrub, C., Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system, Nature, 198(1977) 849-851.
- 85.- Stephenson, A., Understanding the GABA_A receptor: A chemically gated ion channel, Biochem J., 249 (1988) 21-32.
- 86.- Strange, P., The structure and mechanism of neurotransmitter receptors (implications for the structure and function of the central nervous system), Biochem J., 249 (1987) 309.
- 87.- Study RE, BaKer JL, Diazepam and (-)pentobarbital: Fluctuation analysis reveals different mechanism for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured spinal cord neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 78 (1981) 7180-7184.
- 88.- Swindyer, E.A., Sofia, R.D. and Kufferberg.F., Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of felbamate and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats, Epilepsia, 34 (1983) 25-34.
- 89.- Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P. and Gallager, D.W., Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines, Sciences, 207 (1980) 274.
- 90.- Tallman, M.K. and Olsen, R.W., Interaction of barbiturates with dihydropicrotoxinin binding sites possibly related to gamma-aminobutyric acid receptor-ionophores, Life Sciences, 22 (1978) 1643 - 1646.

- 91.- Goddard.GV, Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity, *Nature*, 214 (1967) 1020-1021.
- 92.- Velasco, F., Velasco, M. and Estrada-Villanueva, M., Specific and nonspecific multiple unit activities during the onset of pentylenetetrazole seizures in intact animals, *Epilepsia* 16 (1975) 615-621.
- 93.- Vindrola, O., Assai, M., Zubieta, M., Talavera, E., Rodriguez, E. and Linares, E., Pentylenetetrazole Kindling procedures a long-lasting elevation of IR-Met-Enkephalina but not IR-Leu-Enkephalina in rat brain, *Brain Research*, 297 (1984) 121-125.
- 94.- Zivin, J.A. and Waud, R., How to analyse binding, Enzyme and Uptake, The simple case, a single phase, *Life Science*,30(1982) 1407-1422.