

03072

C.C.H.

¹⁰
zeje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PIROGLUTAMATO
AMINOPEPTIDASA II PROVOCADOS POR EL ESTIMULO ELECTRICO EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

T E S I S
Que para obtener el grado de
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA.

P r e s e n t a

PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO

México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPTO. DE BIOQUIMICA DEL INSTITU-
TO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM Y
EN EL INSTITUTO MEXICANO DE PSI-
QUIATRIA BAJO LA DIRECCION DE LOS
DRES. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRA-
VO Y AUGUSTO FERNANDEZ GUARDIOLA.
EL PROYECTO FUE FINANCIADO POR
DGAPA IN 204791.

INDICE GENERAL

	Página
Indice de Tablas.....	III
Indice de Gráficas.....	IV
Resumen.....	VI
1.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- Antecedentes.....	1
1.2.- La actividad de la PGA II como mecanismo responsable de la inactivación del TRH después de su liberación.....	8
1.3.- El kindling amigdalino como modelo experimental.....	12
1.3.1.- Principales fenómenos del kindling amigdalino.....	16
1.3.2.- Cambios moleculares y morfológicos en el cerebro de rata inducidos por las convulsiones.....	19
1.4.- TRH asociado al kindling.....	23
1.4.1.- Mecanismos bioquímicos involucrados.....	28
2.- OBJETIVOS.....	31
2.1.- OBJETIVO GENERAL.....	31
2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	31
3.- METODOLOGIA.....	32
3.1.- Diagrama de bloques.....	32
3.2.- Estrategia experimental.....	33
3.2.1.- Cuantificación de TRH.....	36
3.2.2.- Radioinmunoensayo de TRH.....	37
3.2.3.- Determinación de proteínas.....	37
3.2.4.- Actividad de la enzima PGA II.....	38

3.3.- Análisis estadístico de resultados.....	39
3.3.1.- Análisis sobre el contenido de TRH en las diferentes regiones del cerebro.....	39
3.3.2.- Análisis sobre la actividad específica de la enzima en las diferentes regiones del cerebro...	40
3.3.3.- Análisis sobre contenido de TRH y actividad de la enzima dos semanas después del establecimiento de la etapa 5.....	42
3.3.4.- Análisis sobre las características de las postdescargas.....	43
4.- RESULTADOS.....	44
4.1.- Características del grupo de ratas analizado después del kindling.....	44
4.2.- Contenido de TRH durante el progreso del kindling.....	48
4.3.- Actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling.....	55
4.4.- Actividad de la enzima PGA II y concentración de TRH dos semanas después del establecimiento de las crisis convulsivas.....	62
4.5.- Análisis de las correlaciones entre los cambios de TRH y las variables electrofisiológicas....	67
5.- DISCUSION.....	90
6.- CONCLUSIONES.....	101
7.- BIBLIOGRAFIA.....	102
Abreviaturas.....	108

INDICE DE TABLAS

Página

TABLA I Número de estimulaciones requeridas para cada etapa.....	41
TABLA II Duración de las postdescargas.....	43
TABLA III Frecuencia de las postdescargas.....	43
TABLA IV Contenido de TRH (pg) con diferente número de estimulaciones eléctricas en tejidos del lado izquierdo (ipsilateralmente al sitio de la implantación del electrodo).....	45
TABLA V Contenido de TRH (pg) con diferente número de estimulaciones eléctricas en tejido del lado derecho (contralateralmente al sitio de la implantación del electrodo).....	46
TABLA VI Cambios en la actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling, en tejidos ipsilaterales.....	56
TABLA VII Cambios en la actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling, en tejidos contralaterales.....	57
TABLA VIII Concentración de TRH y Actividad específica de la PGA II dos semanas después de la crisis de la etapa 5.....	62
TABLA IX Correlaciones realizadas con la duración y la frecuencia de la postdescarga.....	68
TABLA X Correlaciones de la línea con pendiente positiva de contenido de TRH contra la duración de la postdescarga.....	81
TABLA XI Correlaciones de la línea con pendiente negativa de contenido de TRH contra la duración de la postdescarga.....	82
TABLA XII Correlaciones de la línea con pendiente positiva del contenido de TRH contra la frecuencia de la postdescarga.....	83
TABLA XIII Correlaciones de la línea con pendiente negativa del contenido de TRH contra la frecuencia de la postdescarga.....	84

INDICE DE GRAFICAS

	Página
GRAFICA I Contenido de TRH contra número de estimu- laciones en el N. accumbens ipsi y contralateral...	51
GRAFICA II Contenido de TRH contra número de esti- mulaciones en la Corteza frontal ipsilateral e hi- pocampo contralateral.....	52
GRAFICA III Contenido de TRH contra número de esti- mulaciones en la Amígdala ipsi y contralateral.....	53
GRAFICA IV Actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling en el Núcleo Accumbens (ipsi y contralateral).....	58
GRAFICA V Actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling en la amígdala (ipsi y contralateral).....	59
GRAFICA VI Actividad específica de la enzima PGA II durante el desarrollo del kindling en el hipo- campo (ipsi y contralateral).....	60
GRAFICA VII Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en el Núcleo Accumbens, durante el progreso del kin- dling.....	64
GRAFICA VIII Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en la Amígdala, durante el progreso del kindling...	65
GRAFICA IX Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en el Hipocampo, durante el progreso del kin- dling.....	66
GRAFICA X Contenido de TRH en el Hipotálamo (ipsi y contralateral) contra el aumento en la du- ración de la postdescarga acumulada.....	70
GRAFICA XI Contenido de TRH en el Núcleo Accumbens (ipsi y contralateral) contra el aumento en la du- ración de la postdescarga acumulada.....	71
GRAFICA XII Contenido de TRH en el Hipocampo (ipsi y contralateral) contra el aumento en la duración de la postdescarga acumulada.....	72

GRAFICA XIII Contenido de TRH en la Corteza Frontal (ipsi y contralateral) contra el aumento en la duración de la postdescarga acumulada.....	73
GRAFICA XIV Contenido de TRH en la Amígdala (ipsi y contralateral) contra el aumento en la duración de la postdescarga acumulada.....	74
GRAFICA XV Contenido de TRH en el Núcleo Accumbens (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.....	76
GRAFICA XVI Contenido de TRH en el Hipocampo (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.....	77
GRAFICA XVII Contenido de TRH en la Corteza Frontal (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.....	78
GRAFICA XVIII Contenido de TRH en la Amígdala (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.....	79
GRAFICA XIX Pendientes de los tejidos con correlaciones > 0.65 entre contenido de TRH y duración de la postdescarga.....	88

RESUMEN

El principal mecanismo de inactivación de los neuropéptidos es la degradación por ectopeptidasas. El TRH (hormona liberadora de la tirotropina) controla la síntesis y liberación de tirotropina y de prolactina al ser liberado de las neuronas hipotalámicas; en otras zonas del sistema nervioso central (SNC) funciona como neuromodulador. La enzima responsable de su degradación es la piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II) que en la hipófisis es regulada por hormonas tiroideas y el mismo TRH. En un intento de definir si la PGA II presente en otras regiones del SNC es susceptible de regulación, se estudiaron los cambios en su actividad y en el contenido de TRH en animales sometidos a estimulación eléctrica crónica (kindling). Los animales se implantaron con un electrodo en la amígdala del lóbulo temporal izquierdo, se estimularon y sacrificaron en distintas etapas del desarrollo del kindling (definidos por parámetros conductuales y electrofisiológicos).

El contenido de TRH se incrementó en el hipocampo, la amígdala y en la corteza frontal en la etapa 5; en la región del núcleo accumbens se observó un fuerte decremento en la etapa 2 y los niveles se recuperaron en las etapas 4 y 5. La PGA II en todas las regiones aumentó en la etapa 2, disminuyendo hasta igualar los valores de los animales controles ("sham") en la etapa 5. En regiones como el hipocampo, la PGA II se encontró disminuida en un 40% con respecto a los animales "sham" tal como se ha reportado que sucede para los receptores de TRH. Estos datos apoyan que la degradación del TRH puede ser regulable en el SNC, en condiciones en las que se estimula la transmisión TRHérgica.

I.- INTRODUCCION

1.1.- Antecedentes.

La Hormona liberadora de la tirotropina o TRH es un tripéptido que tiene una estructura poco usual bloqueada en los residuos terminales N- y C-, L-piroglutamil-1-histidil-1-prolinamida. Fué aislado de hipotálamo de ovino o porcino por los grupos de R. Guillemin y A.V. Schally en 1969 (5) y una vez que pudo sintetizarse, se realizaron diferentes estudios que contribuyeron a discriminar algunas de sus funciones.

El TRH es liberado de la eminencia media y sintetizado por un grupo de neuronas localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Regula la función del eje tiroideo, ya que participa como hormona estimulando la síntesis y la liberación de la tirotropina (TSH) por los tirotropos y de la prolactina por los lactotropos de la adenohipófisis. La TSH, a su vez, regula la liberación de las hormonas triyodotironina y tiroxina (T3 y T4) de la tiroides.

El TRH se encuentra ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC). De hecho, cerca del 70% del total del TRH está localizado en tejidos extrahipotálamicos (32). Su presencia ha sido detectada por radioinmunoensayo (RIA) (6) y por estudios

de inmunocitoquímica (18). Algunas de las regiones en las que se ha detectado es la amígdala, el bulbo olfatorio, el núcleo accumbens, el bulbo raquídeo, la corteza frontal y el hipocampo (25).

La identificación de la anatomía de los sistemas neuronales del TRH en el cerebro se han facilitado por la caracterización de la estructura de la prohormona del TRH (25). El proTRH tiene un peso molecular aproximadamente de 26,000 y contiene cinco secuencias progenitoras para TRH Gln-His-Pro-Gli, cada una flanqueada por sitios de digestión potencial. La glicina es necesaria para la amidación carboxilo terminal del residuo de prolina que aparece en el TRH maduro. Existen modificaciones postraduccionales en el TRH que ocurren al convertir el residuo glutaminil amino terminal en piroglutamil por la enzima glutaminil ciclasa. Además de la secuencia que codifica para TRH, la prohormona contiene cinco péptidos que separan a los péptidos de TRH flanqueado por los extremos amino y carboxilo. Ya que el péptido amino terminal también contiene un sitio de digestión potencial en adición al TRH, siete péptidos que no son TRH, podrían ser generados por digestión enzimática en los pares de los residuos básicos por una endopeptidasa parecida a la carboxipeptidasa B (25).

La demostración de que el TRH deriva de una proteína precursora más grande, favorece a la teoría de que los péptidos que se derivan del proTRH más que el TRH mismo, podrían

ejerger funciones biológicas independientes. La extensiva distribución ayuda a explicar las acciones tan amplias del TRH en los sistemas autonómicos, motor, sensorial y límbico en el umbral de las convulsiones, la termorregulación, el despertar, la regulación del apetito y la función gastrointestinal (25).

El desarrollo de anticuerpos específicos contra proTRH, contra formas extendidas de TRH y un número de secuencias que no son TRH, pero que se derivan del proTRH, han permitido investigar la organización de los sistemas neuronales del TRH en el cerebro y el procesamiento de su prohormona. Estas observaciones indican que el proTRH es muy raramente transportado en axones y el procesamiento inicial de la prohormona ocurre rápidamente en la perikaria neuronal más que durante el transporte axonal tal como ha sido descrito para propresofisina, el precursor de la vasopresina (25).

En respuesta a un estímulo externo o interno, la secreción de TRH, en conjuntos neuronales particulares, puede ser modificada. Se ha mostrado que el estado tiroideo, por ejemplo, regula la concentración del ARNm del TRH que se encuentra incrementado en hipotiroidismo, en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Los reportes del efecto del estado tiroideo en la concentración de TRH en regiones hipotalámicas han sido contradictorios, lo cual puede deberse a una disección imprecisa,

o bien a que los niveles del péptido son resultantes de diferentes eventos de biosíntesis, procesamiento, liberación y degradación.

Se ha obtenido evidencia, que sugiere que el TRH se encuentra en el tejido nervioso en dos diferentes pozas: una poza de fácil liberación y otra de reserva. De la primera poza, el TRH se libera, como otros neurotransmisores, dependiendo de la concentración de calcio (38). Una vez que el TRH es liberado por la estimulación de las neuronas peptidérgicas, y ejerce su acción sobre la neurona postsináptica, su efecto debe terminar. El mecanismo por el cual esto sucede es la degradación por la enzima PGA II en la terminal sináptica.

Cerca del 90% de la degradación que sufre el TRH en el cerebro es llevada a cabo por enzimas solubles, que son la PGA I y la prolilendopeptidasa II, sin embargo éstas no tienen efecto en la concentración del TRH que se libera. Aunque es posible que el TRH se acumule en las células, la $V_{máx}$ es muy baja para ser el mecanismo principal de la inactivación (11,38).

En cambio, en membranas sinaptosomales se ha detectado una actividad enzimática capaz de degradar al TRH, que se debe a la Piroglutamato aminopeptidasa II. La degradación del tripéptido

por esta enzima se ha postulado como el mecanismo, posiblemente postsináptico, de la inactivación del TRH liberado.

El receptor de TRH (TRHr) ha sido identificado en el cerebro y en la médula espinal de diferentes especies animales utilizando la técnica de unión de ^3H -TRH (o su análogo más potente, ^3Me -His-TRH) y autorradiografía; se observó una concentración elevada de TRHr en el bulbo olfatorio, el complejo amigdaloides, el giro dentado del hipocampo y la corteza entorrinal; se encontró una concentración moderada en el hipotálamo y en los núcleos motores del tallo cerebral.

Los estudios previos indican que las señales transmembranales del TRH actúan a través del sistema del inositol fosfato-calcio-proteína kinasa C (8).

Los intentos de purificación del receptor de TRH por los métodos bioquímicos clásicos, no han tenido éxito. Recientemente, se ha identificado el ADN que codifica para el receptor de TRH. Calzá, (8), ha construido un oligonucleótido complementario a la secuencia de ADN, y ha descrito la distribución del ARNm del receptor de TRH en el cerebro de la rata, utilizando técnicas de hibridización "in situ".

Se le ha propuesto al tripéptido como un neurotransmisor o neuromodulador por su distribución en el SNC; por encontrarse enriquecido en las terminales nerviosas de ciertas regiones del cerebro; porque es liberado por despolarización de la membrana sináptica de una manera dependiente de calcio; y por existir receptores específicos a TRH de alta afinidad en diferentes regiones del SNC (31).

El TRH tiene acción potencial en el sistema motor a diferentes niveles anatómicos. La inyección de TRH en el núcleo accumbens induce un aumento de la actividad locomotora y comportamientos como masticación, lamido, olfateo. La administración de TRH intratecal, induce movimientos de tipo "wet-dog shake", posiblemente como resultado de una acción a nivel de la médula espinal o el tallo cerebral. La inyección de TRH en el cuarto ventrículo incrementa la tasa de respiración sugiriendo una acción del tripéptido en los centros medulares de la respiración. A nivel de la médula espinal, el TRH incrementa la excitabilidad de las motoneuronas espinales (42).

Los efectos del TRH en la médula espinal se han explicado tanto por su acción directa en las motoneuronas espinales como por la facilitación de la liberación presináptica de transmisores excitadores que provoca (42).

Como otros transmisores neuropeptidérgicos, se cree que el TRH tiene una función que depende de su interacción con otros sistemas de transmisores (42).

También se ha implicado al TRH en desórdenes neuropsiquiátricos como la degeneración espinocerebelosa, la esquizofrenia, la pérdida de la consciencia, y la depresión (45). El papel del TRH en el SNC es muy amplio, y puesto que incrementa la liberación y/o el recambio de monoaminas y acetilcolina, su función en los diferentes desórdenes ya mencionados se está analizando (45).

Otro papel fisiológico potencial del TRH, en este caso a nivel del hipocampo, puede ser la facilitación de la memoria, posiblemente activando las neuronas colinérgicas (25).

Un análogo del TRH, el DN-1417 (citrate de gamma-butirolactona-gamma-carbonil-L-histidil-L-prolinamida), tiene actividad en el SNC más profunda que el TRH. El TRH y el DN-1417 administrados intravenosamente, tienen un efecto anticonvulsivo de corto plazo en gatos estimulados eléctricamente con kindling amigdalino (45). Además, la actividad de las convulsiones inducidas química o eléctricamente, causan un incremento importante en el contenido de TRH en ciertas regiones

del cerebro como la amígdala y la corteza piriforme, la corteza cingulada y la corteza frontal (32). Así que el TRH ha sido propuesto como una sustancia antiepiléptica (45).

1.2.- La actividad de la enzima piroglutamato aminopeptidasa II como mecanismo responsable de la inactivación del TRH después de su liberación.

En membranas totales de cerebro y en sinaptosomas se demostró la existencia de una enzima membranal que tiene actividad de piroglutamil aminopeptidasa a la cual se le denominó PGA II (E.C.3.4.19). Los estudios realizados con la enzima purificada demostraron que es una metaloproteasa, con un peso molecular de 230,000 daltones y pH óptimo de 7.4. A diferencia de muchas otras proteasas, la PGA II muestra una alta especificidad para TRH así como para algunos péptidos sintéticos como son pGlu-His-Trp y pGlu-His-Gli (36, 47). Péptidos naturales de estructura pGlu-X (X=péptido superior a tres aminoácidos) no son degradados por la PGA II. La Km de la enzima es de 40 uM para el TRH.

Se propone a la actividad de la enzima PGA II como el mecanismo responsable de la inactivación del TRH liberado por su localización, ya que se le ha demostrado que la enzima está localizada en la cara exterior de la membrana plasmática de sinaptosomas, es decir es una ectoenzima, posiblemente postsináptica, con su sitio activo orientado hacia el espacio extracelular (9). Es esencialmente neuronal (14). Además al inducir la liberación de TRH en rebanadas de hipotálamo por despolarización en presencia de un inhibidor específico de la PGA II, los niveles recuperables de TRH aumentaron, lo que sugiere que la enzima está localizada cerca del sitio de liberación del TRH, y que controla los niveles del péptido en el espacio sináptico (10). Esta recuperación es más grande en regiones como el bulbo olfatorio en donde se ha detectado mayor cantidad de enzima.

Recientemente se ha reportado que la degeneración de neuronas TRHérgicas en la médula espinal de la rata, donde el TRH coexiste con serotonina, disminuye los niveles de TRH pero no la actividad de la enzima, indicando que la enzima es postsináptica. (20).

Por otro lado, la distribución de los receptores de TRH tienen una correlación con los sitios donde se ha encontrado actividad de la enzima PGA II, y al mismo tiempo concuerdan con los sitios de liberación del TRH.

Estas evidencias apoyan la hipótesis de que el mecanismo de inactivación del TRH liberado es la degradación por la enzima PGA II (16).

La enzima PGA II de la adenohipófisis se encuentra controlada positivamente por hormonas tiroideas, de acuerdo a estudios realizados "in vivo" (2, 39), y negativamente por estrógenos (3). El hipotiroidismo provoca además un incremento "in vivo" en los niveles del receptor hipofisiario de TRH, y una disminución de la actividad de la enzima PGA II que pudiera contribuir a aumentar la eficiencia del TRH (15). En cultivos de células adenohipofisiarias el TRH es capaz de regular la actividad de la enzima PGA II (51) causando una disminución paulatina de la actividad de la PGA II que alcanza un máximo (45% de inhibición) a las 16 horas. Este evento es consecuencia de la activación del receptor de TRH. El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), que se sabe activa a la proteínacinasa C (PKC), reproduce el efecto del TRH sobre la PGA II. Esto sugiere que la PGA II en adenohipófisis, tiene un papel regulatorio de la acción neurohormonal del TRH.

La enzima degradativa del TRH, que se encuentra presente en el suero, la tiroliberinasa, presenta características bioquímicas muy similares a la PGA II. Es una metaloproteasa, también

muestra una alta especificidad por el sustrato y es regulada por las hormonas tiroideas.

A nivel del SNC no se han encontrado estudios que reporten la regulación de la actividad de la enzima PGA II. Sin embargo hay evidencias que sugieren su existencia. Una de ellas es que el desarrollo de la actividad de la PGA II en el cerebro está asociado al proceso de diferenciación celular (50). Otra, es que al degenerar la vía presináptica, la actividad de la PGA II aumenta a tiempos largos en la zona lumbar de la médula, de la misma manera que los receptores, lo cual sugiere una regulación similar (20).

Que sea regulable o no la degradación del TRH en el SNC, implica que existen estímulos capaces de inactivar la transmisión que produce la hormona a nivel del SNC, lo cual significaría que los procesos de transmisión peptidérgica no sólo son regulables a través de la liberación del péptido y de la eficiencia del receptor y de la transducción de la señal a nivel postsináptico, sino también del tiempo de permanencia del péptido en la sinapsis.

Con objeto de definir si la enzima PGA II sufre regulación a nivel de su actividad cuando existe algún estímulo que provoca el aumento de la concentración intracelular del TRH, se eligió el

modelo del Kindling amigdalino, que como se mencionó anteriormente causa un aumento en la concentración de TRH en ciertas regiones del cerebro. Este es un modelo experimental de epilepsia causado por estimulación eléctrica y periódica de baja intensidad, en la región de la amígdala del lóbulo temporal, provocando un desarrollo progresivo de convulsiones y de cambios característicos en el comportamiento del individuo (32).

1.3.- El kindling amigdalino como modelo experimental.

Fué Graham Goddard, (17) quien observó las convulsiones provocadas por el kindling durante los estudios que realizó en el efecto del aprendizaje, de la estimulación farmacológica y eléctrica en la amígdala, e inicialmente se dio cuenta de la importancia del fenómeno como un modelo de epilepsia y también como un modelo general de plasticidad en el cerebro.

La investigación que llevó al descubrimiento del kindling, y los primeros esfuerzos para su estudio sistemático, se concentró

en la amígdala (17), y permanece siendo la estructura más frecuentemente estudiada.

El trabajo original de Goddard (17) definió los métodos estándar para provocar las convulsiones del kindling, los más comunes son la aplicación de un estímulo breve (1 o 2 segundos) de pulsos eléctricos a 60 Hz una vez al día, a través de un electrodo delgado de metal implantado crónicamente. Menos común pero también efectivo es la aplicación de pequeñas cantidades de agentes farmacológicos (ej, carbacol, pentilene-tetrazol, péptidos opioides) una vez cada 24 horas o 48 horas. La ruta de la administración puede ser periférica si el agente pasa rápidamente hacia el cerebro, o central si no lo hace.

La principal característica del kindling es que un estímulo invariable que inicialmente no provoca una convulsión, llega a provocarla si se repite lo suficiente. Este fue el criterio para el kindling en el trabajo inicial de Goddard porque él no grabó rutinariamente la actividad electrográfica durante el procedimiento. Sin embargo, el trabajo de Racine (40) mostró que cuando el electroencefalograma (EEG) se registró en la estructura estimulada, la postdescarga (PD) epileptiforme invariablemente acompañaba el procedimiento del kindling. Aún más, Racine (40) mostró que la ocurrencia de las postdescargas, es esencial para la progresión del kindling, y que la estimulación que no provoca

PD fue completamente inefectiva no importando cuántas veces fuera aplicada.

El registro de las PD en la estructura estimulada es un procedimiento rutinario hoy en día, y la medida de la eficiencia del kindling es el número, la duración y la frecuencia de las postdescargas requeridas para el desarrollo de una convulsión generalizada (1)

En la interpretación de su estudio original Goddard (17) concluye que en la región límbica olfatoria, las estructuras parece que "kindlean" a tasas que varían directamente con el grado de interconexión con la amígdala. Trabajos subsecuentes han mostrado que las estructuras que tienen conexiones directas con la amígdala, "kindlean" más rápidamente, con frecuencia a tasas que son más rápidas que las de la propia amígdala. Entre estas, se encuentran las fibras del estriado terminal, el bulbo olfatorio, la corteza piriforme y la corteza prepiriforme profunda, los cuales se ha reportado que "kindlean" con 7 y 9.5 estimulaciones (1).

Los primeros estudios sobre lesiones (40) mostraron que la amígdala "kindleada" originalmente, no era necesaria para la

transferencia rápida del kindling de la amígdala contralateral, y que ambas ratas, "kindleada" e intacta, exhibieron una transferencia comparable hacia la amígdala contralateral. Esto demostró que la propagación no depende de la activación del sitio "kindleado" originalmente, y que en un animal previamente "kindleado", una amígdala intacta es suficiente para la expresión completa y total de la propagación del kindling.

Racine (1988) (1) determinó la importancia del flujo de la amígdala estimulada para el kindling, realizando cortes con bisturí anteriores, posteriores y mediales a la amígdala. Los únicos cortes que retardaron el kindling amigdalino, fueron los anteriores, que interrumpieron las fibras que viajan hacia la parte anterior y que conectan con la corteza piriforme y con estructuras mediales, señalando la importancia de la contribución de la corteza piriforme al kindling amigdalino. Un sitio específico en la corteza anterior prepiriforme profunda de la amígdala se ha definido como crucial para la epileptogénesis límbica. La inyección unilateral directa de cantidades pequeñas de bicuculina (que es un antagonista de GABA), ácido kaínico (agonista de aminoácidos excitadores), o carbacol (agonista de acetilcolina) en este sitio, inducen convulsiones clónicas bilaterales en la primera estimulación.

La inyección de un agonista de GABA en el mismo sitio previene

las convulsiones inducidas por la administración periférica de un convulsivo (1). En conjunto, estos datos indican que, aunque la corteza piriforme profunda kindlea rápidamente, no lo hace más rápido que la otra amígdala y que los sitios de la corteza piriforme probados, y que las lesiones del sitio o la inyección de agonistas de GABA o antagonistas de ácido N-metil D-aspartico no afectan al kindling amigdalino (1).

El último punto relaciona el papel del hipocampo en el kindling límbico. En humanos el hipocampo está identificado como el sitio del foco epiléptico con mayor frecuencia que la amígdala. Los datos del kindling en animales presentan una característica diferente. En ratas y gatos, el hipocampo es una de las estructuras del kindling más lentas en el cerebro completo, y las lesiones del hipocampo típicamente no afectan el kindling en otros sitios límbicos (1).

El orden de sensibilidad al desarrollo de la epileptogénesis eléctrica crónica es: corteza piriforme, amígdala, corteza entorhinal y el hipocampo ventral (1).

1.3.1.- Principales fenómenos del kindling amigdalino.

El kindling involucra por lo menos dos fenómenos plásticos que ocurren progresivamente. El primero es la reducción del umbral de la corriente requerida para evocar las postdescargas. Este es un fenómeno local que ocurre si la PD es evocada o no. Así, la estimulación que está por encima o por debajo del umbral de la postdescarga (UPD) inicial disminuirá gradualmente en sesiones subsecuentes, pero no disminuirá las PD en otras estructuras no estimuladas (40). En la amígdala de la rata el umbral de la postdescarga está típicamente en el rango de 40-100 uA dependiendo de los detalles del experimento (tipo y duración de la estimulación, diseño del electrodo, etc), y se encuentra entre los más bajos en el cerebro. La amígdala sufre una reducción del umbral de la postdescarga muy fuerte después de una estimulación repetida más que en el hipocampo (40).

El segundo fenómeno es el crecimiento progresivo y la propagación de la PD a través de una gran parte del cerebro, culminando en convulsiones, y es por eso que típicamente se le llama kindling. En la amígdala de rata, la PD inicial es típicamente de 6 segundos de duración, es confinada a la amígdala estimulada, y provoca cambios pequeños de comportamiento que involucran automatismos de la musculatura facial, movimientos clónicos de las extremidades, movimientos de la cabeza, levantamiento de las dos extremidades anteriores, y pérdida del control de la postura. Esto lleva a una convulsión generalizada. Durante las sesiones de intervención el animal mostrará

reincidencia de este comportamiento progresivo en el orden dado y estos estados sucesivos en la expresión de las convulsiones se han identificado como etapas de la 1 a la 5 (40).

El kindling parece estar involucrado con cambios permanentes en el cerebro como respuesta a la estimulación. Así, persiste después de intervalos de 3 a 12 meses (1). Estudios más recientes han mostrado una retención casi completa del kindling amigdalino por periodos que pueden durar en primates hasta 868 días (1), que es el periodo de tiempo más largo que se ha probado. El kindling persiste por periodos de tiempo que tienen relación al tiempo de vida de las especies que han sido estudiadas, y es más persistente que la potenciación a largo plazo (LTP), el cual es otro modelo de neuroplasticidad (1).

Existe una correlación inversa entre la amplitud de la respuesta y el tiempo de duración del LTP que una vía presenta y la facilidad con la cual "kindlea". El tracto olfatorio, por ejemplo, kindlea muy rápido, pero no presenta LTP. En cambio el hipocampo kindlea muy despacio y presenta LTP con facilidad. El kindling no necesariamente lleva a un LTP y en ocasiones reduce la amplitud de la respuesta (41).

Dos formas principales de eventos epilépticos espontáneos siguen al kindling amigdalino: descargas interictales (DII) y las

convulsiones espontáneas. En ratas, la región de la amígdala-corteza piriforme parece que genera la mayor parte de las DII aún cuando los animales son estimulados en otros sitios. Las convulsiones espontáneas han sido observadas en todas las especies de mamíferos que se han "kindleado" en la región de la amígdala, en donde se han realizado esfuerzos para registrarlas adecuadamente (12), aunque la estimulación adicional más allá del desarrollo de la etapa 5 parece ser necesaria para que aparezcan las convulsiones espontáneas de la rata (1).

1.3.2.- Cambios moleculares y morfológicos en el cerebro de rata inducidos por las convulsiones.

Las convulsiones activan una cascada compleja de cambios moleculares y genómicos, incluyendo la modificación de la expresión de receptores (21). Estos cambios pueden contribuir al incremento anormal de la excitabilidad neuronal y son responsables del desarrollo de las lesiones neuronales inducidas por las convulsiones. Aún más, las convulsiones pueden inducir una reacción glial y una remodelación sináptica que genera redes neuronales excitadoras recurrentes que pueden incrementar la actividad neuronal y contribuir a mantener la epilepsia (43).

Los cambios inducidos por las convulsiones pueden ser rápidos y transitorios (ej. expresión aumentada de factores de transcripción, factores tróficos, receptores de neurotransmisores), o bien, pueden ser lentos y de larga duración (ej. las lesiones neuronales, la reacción glial y la neosinaptogenesis), de modo que pueden ser separados en dos fases principales: una fase de inducción y una fase de mantenimiento. (24) (43).

Durante la fase de inducción, la expresión de algunos genes ocurre rápidamente y con frecuencia transitoriamente. Se asume que los efectos de estas alteraciones son reversibles, cuando las estimulaciones son mantenidas en un rango cercano al normal. Con estimulaciones repetidas o más fuertes de un circuito neuronal, se activa una cascada de eventos moleculares que provocan modificaciones irreversibles y eventualmente deletéreas de las neuronas.

La fase de mantenimiento está caracterizada por la consolidación del proceso epiléptico y la recurrencia de las convulsiones.

Diferentes procedimientos o sustancias químicas, generan disparos sincronizados en el hipocampo. Estos incluyen estímulos en tren o estimulación eléctrica repetitiva (kindling), o bien la aplicación de varios agentes convulsivos que incluyen una solución de alta concentración de K^+ , reducidas concentraciones de Mg^{2+} , y bloqueadores del canal de receptores de GABA-A. Estos disparos están dados por potenciales postsinápticos excitadores, lo cual está demostrado en rebanadas hipocámpicas mantenidas "in vitro". Estos, son bloqueados por antagonistas de los receptores del glutamato del tipo AMPA que median la neurotransmisión sináptica (7) (43).

En las células CA3, un episodio epileptiforme breve produce un aumento duradero de respuestas sinápticas que tienen un cierto parecido con la potenciación a largo plazo. Así, después de una corta aplicación de un convulsivante (ej. 3 a 5 min de ácido kaínico) una subsiguiente estimulación del hipocampo genera, en lugar de un potencial postsináptico excitatorio sencillo (EPSP), seguido de un inhibitorio, un EPSP seguido por un disparo. Esto evoca una respuesta que persiste por varias horas después de la remoción de la droga. Aún más, en este proceso, como en el LTP, no existe un cambio permanente en las propiedades celulares intrínsecas o en la inhibición GABAérgica. También, como en el LTP, el cambio duradero inducido por convulsivantes, involucra la activación de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA. Así, la aplicación de los antagonistas de los receptores NMDA

con un convulsivo, produce disparos sincronizados espontáneos pero previene el cambio duradero. Los receptores NMDA están caracterizados por provocar un aumento en el tiempo necesario para que se lleve a cabo la transmisión sináptica, por un bloqueo por Mg^{2+} y alta permeabilidad al Ca^{2+} . Puesto que los canales llevan Ca^{2+} , los receptores de NMDA pueden estar involucrados en la activación mediada por calcio de las cascadas moleculares, incluyendo expresión genética incrementada (42) (43).

Para resumir, las fases iniciales de las convulsiones probablemente proceden de una acumulación de glutamato en el espacio extracelular de neuronas. La liberación aumentada y/o la recaptura reducida de glutamato lleva a una activación incrementada de receptores glutamatérgicos. Mientras que la inducción de este proceso requiere de la activación de los receptores a NMDA, se encuentra mediado por un incremento de las respuestas de los receptores AMPA postsinápticos. Esta observación puede también sugerir que las modificaciones cuantitativas y/o cualitativas de los receptores del glutamato pueden contribuir al incremento de la excitabilidad neuronal (43).

Las catecolaminas inhiben la progresión del kindling mientras que GABA suprime las convulsiones más que las catecolaminas (45). GABA retarda el desarrollo del kindling

amigdalino, como puede observarse por el hecho de que agentes como la picrotoxina bloquea el ionóforo de cloro y rápidamente provoca convulsiones cuando es administrado sistémicamente o directamente en la amígdala, por abolir los disparos que normalmente GABA mantiene. Aún más, los antagonistas de GABA, generalmente facilitan, mientras que los agonistas retardan el kindling eléctrico de la amígdala (1).

1.4.- TRH asociado al kindling

Los primeros estudios que involucran al TRH en la modulación de las convulsiones provocadas por el kindling, se deben a Sato (1986) quien utiliza un análogo de TRH, el DN-1417, inyectándolo ICV, y encuentra que el número de estimulaciones requeridas para que la rata convulsione en la etapa 5 es significativamente menor que en los animales del grupo control. Asimismo, al inyectar DN 1417, se retardó el progreso de la etapa 0 a la etapa 2 en el animal "kindleado".

Utilizando de 40 a 80 ug de DN-1417, se encontró un claro efecto anticonvulsivo dependiente de la dosis en animales estimulados por kindling. El efecto en la duración de la

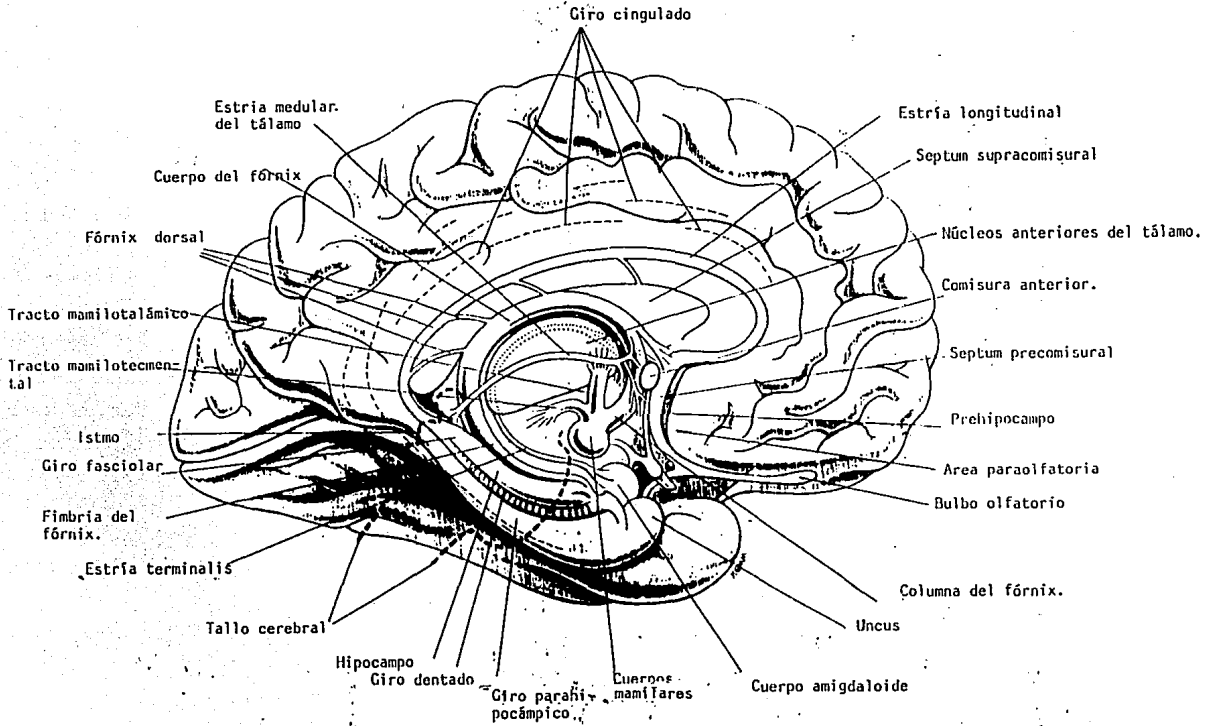
postdescarga aparece 10 minutos después de la administración del análogo de TRH y alcanza el máximo 30 a 60 minutos después (45).

Para explicar el efecto del kindling se han analizado los cambios que sufren las monoaminas, la acetilcolina y el GABA durante el proceso de estimulación.

Utilizando el análogo de TRH como anticonvulsivo, se ha observado que la concentración de las catecolaminas no cambia en las ratas estimuladas, excepto por un incremento en los niveles de norepinefrina en el Núcleo accumbens y una disminución de dopamina en la amígdala (45). Este resultado es consistente con los reportes previos que indican que el TRH y su análogo el DN-1417 acelera la liberación de catecolaminas presinápticas en el estriado y en el núcleo accumbens, produciendo un comportamiento estereotípico en el animal (45). FIGURA I

En las ratas estimuladas eléctricamente con kindling amigdalino se incrementa la concentración de TRH-LI en el hipocampo y en la amígdala, después de 48 horas de la aparición de la crisis convulsiva en el animal (45).

FIGURA I PRINCIPALES ESTRUCTURAS DEL SISTEMA LIMBICO



Kubek (23), presenta evidencias de que las convulsiones generalizadas producidas por electrochoque (ECS) y por kindling eléctrico, alteraban las concentraciones de TRH en ciertas regiones del cerebro de la rata. Dos días después de la aparición de las convulsiones características de la etapa 5, se presentan incrementos importantes de las concentraciones de TRH en la corteza piriforme, la amígdala, el hipocampo y la corteza completa. En un estudio subsecuente en el que se compararon las concentraciones entre la etapa 2-3 y la etapa 5 en el kindling eléctrico, se observa un aumento significativo en la concentración de TRH en la corteza piriforme ipsi y contralateral así como elevaciones importantes en la corteza piriforme y la amígdala y en la corteza cingulada en la etapa 5. No se observaron cambios importantes en el bulbo olfatorio, en el estriado, en el septum en ninguna de las etapas analizadas (32).

Para extender estos estudios se observó el efecto del kindling químico sobre la concentración de TRH. Seis meses después de una inyección mensual de PTZ (pentilenetetrazol) a ratas "kindleadas", el TRH se encontró significativamente incrementado dos días después de que el animal presentó un crisis de etapa 5 en la corteza piriforme, la amígdala, el hipocampo y la corteza. No hubo cambios importantes en el TRH del hipotálamo total, en el septum, y en el estriado (22).

En el caso de los péptidos opioides, que también afectan la severidad de las convulsiones provocadas por el kindling y la duración de la depresión postictal, los niveles de la met-enkefalina y de la proencefalina, se encuentran incrementados después del kindling amigdalino, lo cual es concomitante con un aumento en el contenido del ARNm de la proencefalina en varias regiones del cerebro, sugiriéndose una síntesis incrementada de los péptidos de la proencefalina (35, 53).

El kindling amigdalino incrementa los niveles de los péptidos derivados de la proencefalina, pero decrece la concentración de los péptidos de la dinorfina y provoca un incremento en los niveles del mRNA en el hipocampo de rata. Más aún, un marcado incremento en los niveles del mRNA de la prodinorfina y un incremento en los niveles del mRNA de la proencefalina en las células granulosas, fué observado un día después de la breve aplicación de estimulación eléctrica de alta frecuencia en el giro dentado del hipocampo (33).

En el caso del hipocampo, el ARNm del preproTRH es detectado por técnicas de hibridización "in situ" en su punto máximo a las 6 horas después de la aparición de la crisis convulsiva característica de la etapa 5. En la corteza frontal, la corteza piriforme, la amígdala y el giro dentado los niveles del ARN

mensajero disminuyeron a cifras basales 24 horas después de la crisis convulsiva (21).

Esto hace suponer que los aumentos detectados en la concentración del TRH es debido a un incremento en su síntesis.

1.4.1.- Mecanismos bioquímicos involucrados

Los primeros intentos para estudiar los mecanismos bioquímicos posibles del kindling que involucraran la síntesis de constituyentes neuronales, utilizaron inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la anisomicina. La conclusión general ha sido que el kindling amigdalino es significativamente retardado o prevenido con estos agentes, lo cual sugiere que la síntesis de proteínas es necesaria para el kindling normal (1).

Los niveles de Ca^{2+} intracelulares incrementados generados por la activación de los receptores glutamatérgicos y los canales de calcio dependientes de voltaje, estimulan mecanismos de transducción que involucran cascadas de segundos mensajeros, incluyendo fosforilación, y llevan a la activación de factores de

transcripción presentes pero no expresados. Esto produce un incremento masivo rápido en la expresión de genes que codifican para otros factores de transcripción con c-fos, c-jun, jun B, zif/268. Algunos de estos factores pueden interactuar sobre un número de complejos de transcripción que determinarán una regulación positiva o negativa de secuencias de promotores de numerosos genes efectores (43).

Rosen (44) ha demostrado que existe un incremento en la expresión del ARNm del TRH en los mismos tejidos en donde se encuentra aumentada la expresión de c-fos inducida por el kindling. Ambos ARNm se encuentran en niveles cercanos a los basales en el giro dentado del hipocampo, la corteza piriforme, entorhinal y perirhinal. Después de la aparición de las convulsiones provocadas por el kindling, se presentan incrementos dramáticos de c-fos y del ARNm del TRH en estas áreas.

Los receptores a TRH en el estriado, se incrementaron 48 horas después de la convulsión. En otras regiones como la amígdala y en la corteza, se observa una tendencia a disminuir pero no es significativo en este estudio (45).

Otros datos indican que las regiones en las que el TRH se encuentra incrementado después de las crisis convulsivas

provocadas por el kindling amigdalino, (amígdala, hipocampo, corteza piriforme y corteza), se correlacionan con la localización anatómica de los receptores de TRH en la rata y en el humano (21).

Esto puede apoyar la hipótesis de que el TRH afecta los mensajeros intracelulares modificando la homeostasis del calcio.

Las evidencias muestran que las vías TRHérgicas se encuentran estimuladas durante el progreso del kindling. Esto es claro por el aumento en la concentración de TRH, el aumento en el ARNm de TRH, y por el efecto en los receptores del TRH que resulta después de la estimulación eléctrica. Por lo tanto el kindling se utiliza en este trabajo como modelo experimental para determinar si existe regulación de la actividad de la enzima PGA II en el Sistema Nervioso Central.

2.-OBJETIVOS

2.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar si la actividad de la enzima piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II) es regulable en el sistema nervioso central utilizando como estímulo el kindling amigdalino.

2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el efecto del kindling amigdalino en el contenido de TRH en diferentes regiones del cerebro.

Determinar el efecto del kindling amigdalino en la actividad de la enzima PGA II.

3.- METODOLOGIA

3.1.- Diagrama de bloques.

Estandarización de las técnicas de disección (50) (49), de extracción de TRH (10) de cuantificación de TRH por radioinmunoensayo (19) de determinación de proteínas por Lowry (27) y de determinación de la actividad de la enzima PGA II (52).

Implantación de 24 ratas con un electrodo en la región de la amígdala, después de establecer el umbral. Estimulación eléctrica por un segundo, diariamente hasta alcanzar la etapa conductual requerida. Los cerebros de estas ratas, se utilizaron para cuantificar TRH en diferentes regiones, y en diferentes etapas del kindling.

Implantación de 48 ratas con un electrodo en la región de la amígdala. Estimulación eléctrica, por un segundo, diariamente hasta alcanzar la etapa conductual requerida. Los cerebros de estas ratas, se utilizaron para medir la actividad de la PGA II.

Implantación de 8 ratas para estimularlas hasta alcanzar la etapa conductual clasificada como 5, sacrificándolas dos semanas después de presentar la crisis convulsiva

Análisis estadístico de resultados.

3.2.- Estrategia experimental

Cuatro grupos de ratas Wistar macho que inicialmente pesaron entre 300 y 350g, se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (6 a.m. a 6 p.m. de luz), bajo condiciones constantes de temperatura y humedad, y tuvieron libre acceso al alimento y al agua. Se anestesiaron con pentobarbital, se colocaron en un aparato esterotáxico y se implantaron con un electrodo bipolar de acero inoxidable cubierto de esmalte, de 0.2 mm de diámetro, en la región basolateral izquierda de la amígdala del lóbulo temporal y la corteza frontal. El electrodo se fija con resina acrílica. Las coordenadas son: Bregma -2.8 mm, línea media 5 mm, ventral 8.5 mm (37).

Después de un período de recuperación de 7 días, se estimuló diariamente en la región de la amígdala izquierda con un tren de un segundo de pulsos eléctricos monofásicos de 60 Hz y 1 msec de duración. La severidad de las convulsiones se midió de dos maneras: a) registrando la actividad electroencefalográfica (EEG), que permite medir la duración y la frecuencia de las postdescargas, y b) clasificando la severidad de las convulsiones de acuerdo a los criterios de comportamiento del animal, después del estímulo subconvulsivo: En la etapa 1 el animal presenta movimientos clónicos de los músculos de la cara; en la etapa 2, movimiento rítmico de la cabeza; en la etapa 3,

movimientos clónicos de una extremidad; en la etapa 4, movimientos clónicos de ambas extremidades y en la etapa 5, movimientos clónicos de las dos extremidades, adquisición de una postura erguida y caída hacia atrás con pérdida de reflejos (40). La estimulación se realizó diariamente, con excepción de los domingos, y siempre entre las 10 y las 11 horas. Se registró la duración y la frecuencia de la postdescarga diariamente, de cada rata.

Las ratas se decapitaron 72 horas después de alcanzar la etapa 2, 4 y 5, de acuerdo con los parámetros ya mencionados, y nunca después de las 12 horas del día, dado que los ciclos circadianos afectan la síntesis de TRH, aumentando de manera importante después de esta hora (13).

Las ratas control o sham, se implantaron con el electodo en la región de la amígdala izquierda, pero no se estimularon eléctricamente, y se sacrificaron el mismo día que las ratas estimuladas alcanzaron la etapa conductual deseada.

Los cerebros se removieron y colocaron en hielo a $-80\pm C$.

Las regiones disecadas fueron el hipotálamo, el núcleo accumbens, la corteza frontal, la amígdala-corteza piriforme, el hipocampo y el bulbo olfatorio. Las regiones se seleccionaron por su alto contenido en TRH (más de 700 pg de TRH por tejido) (30), por ser regiones en donde se han reportado cambios bioquímicos y electrofisiológicos después de realizar estimulaciones en la región de la amígdala; es decir, por responder a la estimulación eléctrica (1) y por ser regiones en donde se ha encontrado aumento en la concentración de TRH, del ARNm del preproTRH, y cambios en los receptores de TRH (32, 21). También se disecaron las regiones del cerebelo y el bulbo raquídeo. El cerebelo se eligió porque presenta actividad de la enzima PGA II pero no se detectan niveles importantes de TRH por lo que se esperaba que la actividad de la enzima no cambiara, y el bulbo raquídeo en donde tampoco se esperan cambios.

Las regiones mencionadas se disecaron siguiendo el Atlas de Palkovits (37). Del cerebro congelado en posición dorsal se obtienen los bulbos olfatorios y se disecta a 3.3 mm desde la parte frontal, para extraer la corteza frontal. Posteriormente se realiza otro corte de 2.4 mm de grosor para extraer los núcleos accumbens. La siguiente rebanada de 1.5 mm se desecha. Para extraer la amígdala y el hipotálamo se obtiene otra rebanada de 3.3 mm. El hipocampo se encuentra en la porción restante del cerebro. El bulbo raquídeo se separa de la porción más distal del

cerebro. Todas las regiones se dividieron en la porción izquierda y derecha, con objeto de analizar el efecto del kindling ipsi y contralateralmente al sitio de implantación del electrodo.

3.2.1.- Cuantificación de TRH

El método que se utilizó para la extracción de TRH fue desarrollado por nuestro grupo (10). Los tejidos ipsi y contralaterales al sitio de la estimulación, se homogenizaron en 500 μ l de ácido acético al 20%. Del homogenado se tomaron 50 μ l para medir la concentración de proteínas. Posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 4°C a 12,000g. Un volumen constante del sobrenadante, se evaporó y se mantuvo a -20°C toda la noche. El residuo se extrajo con 1 ml de metanol al 90%, se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos, y se evaporó en el Savant. Se cuantificó el TRH con la técnica del radioinmunoensayo. (19)

3.2.2.- Radioinmunoensayo de TRH.

El anticuerpo R2 utilizado para el radioinmunoensayo (RIA) se ha caracterizado previamente (19). El TRH yodado (I125) es preparado y purificado tal como se describe en Joseph-Bravo (19). La mezcla de incubación consistió de 100 ul del anticuerpo R2 (1:35,000 como dilución final) en solución amortiguadora para radioinmunoensayo, 100 ul de TRH yodado radioactivamente y 100 ul de cada residuo de extracto de tejido resuspendido en diferentes volúmenes de solución de RIA (500 ul para el hipotálamo y 250 ul para los demás tejidos), de modo que se llegara a una concentración entre 500 y 1000 pg de TRH en los 100 ul. Después de 48 horas de incubación a 4°C el anticuerpo de TRH se precipitó con etanol absoluto. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg (90% B/B₀). Se realizaron estándares internos, de tejido hipotalámico y una curva estándar para poder realizar correcciones por las variaciones dentro del ensayo.

3.2.3.- Determinación de proteínas.

El tejido homogenizado en medio acidificado (ácido acético al 20%), se hidrolizó por 24 horas a temperatura ambiente con un volumen igual de 4.5 N de NaOH. El método utilizado para cuantificar proteínas fue el de Lowry (27).

3.2.4.- Actividad de la enzima PGA II.

El ensayo se realizó como se describe previamente (16). Las membranas se obtienen homogenizando cada tejido en un sonicador durante 5 seg en 10% P/V de una solución de fosfatos 0.05 M. Se preincubaron por 5 min a 37°C en 25 ul de solución de fosfatos 0.05 M, a pH 7.5, conteniendo 2.5 mM de bacitracina y 2.5 mM de N. etilenmaleimida. En el tiempo cero, 100,000 cpm de TRH (3H-Pro) (1 uM de concentración final) (6 ul) se agregaron y también se incubaron. Para asegurar la linealidad y la mejor aproximación a la velocidad inicial, se utilizaron tres diferentes concentraciones enzimáticas. En el tiempo cero, y en tiempos subsecuentes, de 5 y 10 minutos, alícuotas de 5 ul se colocaron en papel de celulosa de fosfatos. Se desarrolló la cromatografía ascendente utilizando como solvente el ácido acético 1 M. Después de secar el papel, el metabolito His-(3H)-Pro-NH₂ se eluyó del primer centímetro del punto de origen del papel y se cuantificaron las radiaciones beta por centelleo líquido. Los valores del tiempo cero se sustrajeron de los valores de los otros tiempos y cada determinación se realizó por duplicado.

3.3.- Análisis estadístico de resultados.

3.3.1.- Análisis sobre el contenido de TRH en las diferentes regiones del cerebro.

Antes de definir el análisis estadístico adecuado, se determinó si los datos tenían una distribución normal, aplicando la prueba de Kolgomorof Smirnof. Con una distribución normal puede utilizarse el análisis de varianza.

El grupo de animales experimentales que se trataron para analizar su contenido de TRH, (4 animales por cada etapa:2,4,5) tuvo un grupo de animales control o "sham" (4 animales por cada etapa:2,4,5). Con los datos del contenido de TRH, expresado en pg por tejido, del grupo de animales "sham" se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) en una sólo dirección a fin de definir si existieron diferencias significativas en los animales, dependiendo del tiempo de permanencia del electrodo en su cerebro. No existió diferencia significativa en los datos de contenido de TRH de los animales "sham" de las etapas mencionadas, por lo que se obtuvo la media de cada grupo y fue este el dato que se utilizó para comparar los valores de TRH de los animales experimentales.

El contenido de TRH, expresado en pg por tejido, de los animales estimulados eléctricamente (4 por cada etapa) junto con los valores de la media de los animales "sham", se compararon entre las etapas, realizando un análisis de varianza. Se utilizaron los valores naturales y posteriormente, en donde se encontraron diferencias significativas, $p < 0.05$ (entre las etapas) se realizaron contrastes ortogonales para definir las etapas que presentaran diferencias significativas. Este análisis contribuyó para definir los cambios en el contenido de TRH dependiendo del número de estimulaciones que se aplicaron al animal, dependiendo de la etapa conductual, y para determinar la respuesta al estímulo eléctrico de las diferentes regiones analizadas.

3.3.2.- Análisis sobre la actividad específica de la enzima en las diferentes regiones del cerebro.

Se determinó si los datos tenían una distribución normal, aplicando la prueba de Kolgomorof Smirnof, para utilizarse el análisis de varianza.

En las 24 ratas que conformaron los grupos de animales que se utilizaron para medir la actividad de la enzima PGA II, se realizó inicialmente un análisis de varianza entre los grupos de ratas control o "sham" de las diferentes etapas, con objeto de

definir si el tiempo de permanencia del electrodo afecta la actividad de la enzima PGA II. Se analizaron los valores naturales, expresados como pmol/min/mg de proteína. No existió diferencia significativa entre los valores de las 3 etapas de las ratas "sham", por tanto se utilizó la media para comparar los valores de los animales experimentales.

Se compararon los valores de actividad específica de la enzima de los diferentes tejidos, de las 3 etapas, entre ellas y contra el valor de las ratas control. También se utilizó análisis de varianza en una sólo dirección y en los casos en los que se encontraron diferencias significativas $p < 0.05$ se realizaron contrastes ortogonales con objeto de definir entre qué etapas existió la diferencia importante.

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existieron diferencias entre los valores de los tejidos ipsi y contralaterales al sitio de implantación del electrodo. Esto se hizo tanto para el grupo en el que se analizó el contenido de TRH como para los grupos de animales en los que se determinó la actividad específica de la enzima.

Este experimento se repitió con otras 24 ratas y en consecuencia los datos que aparecen en las tablas de resultados expresan la media +/- el error estándar de la media.

Para expresar los resultados en las Tablas, se tomó como 100% el valor de la media del contenido de TRH o de la actividad específica de la enzima de los animales "sham" y se obtuvo la diferencia en porcentaje de la media del contenido de TRH o de la actividad específica de la enzima de los animales experimentales, en los diferentes tejidos y en las diferentes etapas.

3.3.3.- Análisis sobre contenido de TRH y actividad de la enzima dos semanas después del establecimiento de la etapa 5.

En el grupo de animales que se estimularon para analizar la duración o permanencia de los cambios bioquímicos después de dos semanas del establecimiento de las crisis convulsivas características de la etapa 5 del kindling, se comparó el contenido de TRH ipsilateral contra el contenido de TRH de las ratas "sham" de la etapa 5, y el valor de la actividad específica de los tejidos contralaterales contra el dato de las ratas "sham" de la etapa 5.

Los resultados se expresan como porcentaje de diferencia contra los valores correspondientes de las ratas "sham" de pg de TRH o de actividad de la enzima.

3.3.4.- Análisis sobre las características de las postdescargas.

Para analizar la relación entre la frecuencia y la duración de las postdescargas con el número de estimulaciones, con la etapa conductual del kindling y con el contenido de TRH, se realizaron correlaciones entre las diferentes variables, utilizando tanto los datos al natural, como semilogaritmos de los valores.

Se realizaron correlaciones tanto con la frecuencia y duración acumulada durante la progresión del kindling, como con el dato de la última frecuencia o la última duración de la postdescarga que se registró de los animales después de la crisis convulsiva característica de cada etapa conductual.

4.- RESULTADOS.

4.1.- CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE RATAS ANALIZADO DESPUES DEL KINDLING

Los animales utilizados en el primer experimento para medir el contenido de TRH en diferentes regiones del cerebro, (GRUPO I) mostraron diferencias en el número de estimulaciones necesarias para alcanzar la etapa deseada, tal como se muestra en la TABLA I.

TABLA I

NUMERO DE ESTIMULACIONES REQUERIDAS PARA CADA ETAPA.

Etapa conductual	Promedio del número de estimulaciones. p d.e.
2	5.7 p 0.6
2	11 p 0.0
4	9.3 p 0.6
5	13.7 p 0.6

p +/- d.e.=desviación estándar.

Como puede observarse se obtuvieron dos subgrupos de animales que llegaron a la etapa 2, el A) con una media de número de estimulaciones de 5.6, el B) con 11. En la etapa 4 se necesitaron menor número de estimulaciones con respecto al grupo de la etapa 2 y la media fue de 9, y en la última etapa se necesitaron 14 estimulaciones en promedio.

La producción de una postdescarga (PD) es una característica crítica de la eficiencia del kindling por lo que se midió la duración y la frecuencia de las postdescargas, y éstas se expresan a continuación de dos maneras en la TABLA II: como el promedio de la integral de la duración de las postdescargas a lo largo del tratamiento hasta que los animales alcanzaron la etapa deseada, y como el promedio de la duración de la postdescarga producida después de la última estimulación. De la misma manera se expresan los valores de la frecuencia en la TABLA III.

TABLA II

DURACION DE LAS POSTDESCARGAS

Número de estimula- ciones.	Etapa conductual	Promedio de la suma de la duración de la postdescarga (seg)	Duración de la postdescarga des- pués de la última estimulación (seg)
6	2	31.2 p 11.3	4.6 p 1.53
11	2	81.5 p 5.96	10 p 1.83
9	4	320.2 p 44.12	38.6 p 11.06
14	5	445.5 p 403.6	33.3 p 20.79

Valores expresados como media +/- d.e.

TABLA III

FRECUENCIA DE LAS POSTDESCARGAS

Número de estimula- ciones.	Etapa conductual	Promedio de la suma de la frecuencia de la postdescarga (Hz)	Frecuencia de la postdescarga des- pués de la última estimulación (Hz)
6	2	11.8 p 5.25	2.17 p 0.76
11	2	30 p 4.97	3.03 p 0.73
9	4	28.5 p 6.53	3.97 p 0.98
14	5	45 p 1.00	4.1 p 0.26

Valores expresados como media +/- d.e.

La progresión a las diferentes etapas del kindling se observa al prolongarse la duración de las postdescargas con respecto al aumento en el número de estimulaciones proporcionadas al animal ($r = 0.92$ $P < 0.001$) (28).

Los animales experimentales necesitaron menor número de estimulaciones con respecto a lo reportado, ya que en otros trabajos (32) se requirieron un promedio de 9.7 ± 1.7 estimulaciones para que el animal presentara tres convulsiones de la etapa 2, y 21.6 ± 3.6 estimulaciones para presentar tres convulsiones características de la etapa 5. Por lo anterior, los resultados del contenido de TRH se expresan para el caso de la etapa 2, separados por número de estimulaciones y no sólo por etapa (TABLAS IV y V).

4.2.- CONTENIDO DE TRH DURANTE EL PROGRESO DEL KINDLING.

TABLA IV

Contenido de TRH (pg) con diferente número de estimulaciones eléctricas en tejidos del lado izquierdo (ipsilateralmente al sitio de la implantación del electrodo).

	Num. de estimulaciones					
		ETAPA 2		ETAPA 4	ETAPA 5	
	Sham	6	11	9	14	
Hipot.	a 2867p252	a 1410p202	b 3314p1075	b 2162p227	a 4945p2621	
N. accu.	a 1152p304	b 214p14	b 315p35	c 769p31	a 964p35	*
C.Frontal	a 120p8	a 148p71	a 226p64	a 187p28	b 369p60	*
Amígdala	a 375p109	c 431p72	c 507p59	d 751p122	b 1089p312	*
Hipocampo	a 273p48	a 388p49	b 439p198	b 421p62	c 686p185	
Bulbo raq.	a 584p71	a 611p77	a 746p95	a 680p127	a 677p185	

Los resultados están expresados como la media p la d.e.
* indica diferencias significativas al realizar el ANOVA.

Las literales iguales que se encuentran arriba de los datos indican que no existe diferencia significativa entre el número de estimulaciones: * $P < 0.05$

TABLA V

Contenido de TRH (pg) con diferente número de estimulaciones eléctricas en tejido del lado derecho (contralateralmente al sitio de la implantación del electrodo).

	Num. de estimulaciones					
		ETAPA 2	ETAPA 4	ETAPA 5		
	SHAM	6	11	9	14	
Hipot.	a 2571p475	b 915p51	b 1857p534	a 2611p249	a 3128p1036	
N.acc.	a 1222p89	b 232p101	b 411p65	c 930p40	a 1158p200	*
C.frontal	a 186p29	a 162p71	a 335p94	a 244p22	a 255p28	
Amígdala	a 419p93	a 260p74	501p56	706p84	b 765p102	*
Hipocampo	200p32	a 108p10	b 352p63	523p101	b 359p18	*
Bulbo raq.	a 807p160	a 616p12	a 516p62	a 556p75	a 1001p405	

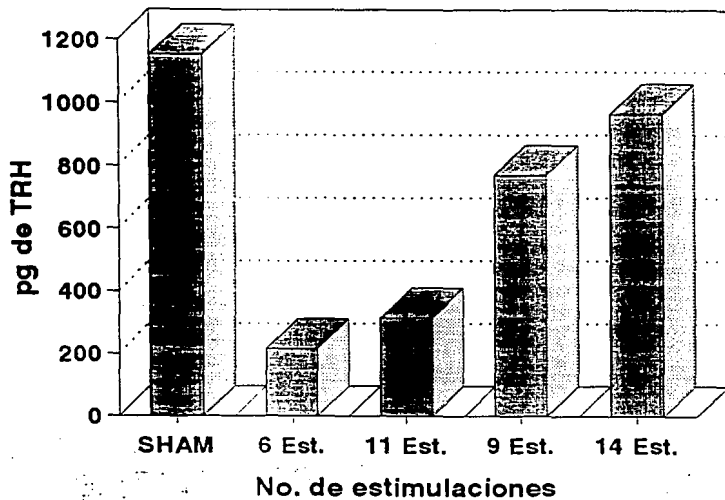
Los valores están expresados como la media \pm la d.e.
 * Existe diferencia significativa al realizar el ANOVA.
 Las literales diferentes indican $p < 0.05$ al realizar contrastes entre número de estimulaciones.

El comportamiento del contenido de TRH en las diferentes etapas de los tejidos que muestran diferencias estadísticamente significativas, se encuentran representados en las GRAFICAS I a III. Existe un aumento de TRH en la etapa 5 tanto en la amígdala como en el hipocampo, lo que concuerda con lo reportado (32). Esto se observa en ambas regiones (ipsi y contralaterales). También se observa un incremento en la corteza frontal (270%) pero es significativo sólo en el lado de la estimulación. De acuerdo a la literatura, no se observan en esta etapa, diferencias entre los valores de las ratas sham y las estimuladas en regiones como el hipotálamo o el núcleo accumbens.

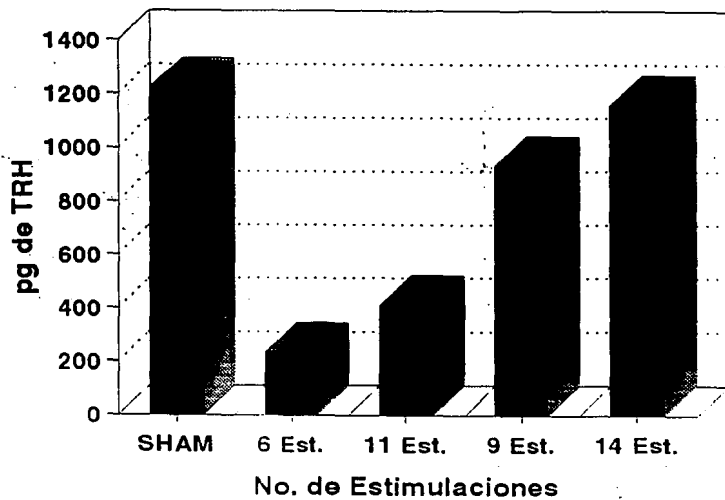
Al hacer un análisis cuidadoso de los cambios en TRH durante el desarrollo del kindling se detecta una disminución del contenido de TRH con respecto a los valores sham al aplicar 6 estimulaciones eléctricas en el hipotálamo y en el núcleo accumbens de ambos lados, y en el hipocampo contralateral. La corteza frontal y la amígdala contralaterales presentan la misma tendencia pero la diferencia no es significativa. En algunas de estas regiones los valores de TRH todavía se encuentran disminuidos significativamente con respecto a los sham después de 11 estimulaciones; los valores de TRH se recuperan progresivamente hasta la etapa 5 para el núcleo accumbens y el hipotálamo, es decir en esta etapa se encuentran valores similares a los de los animales sham.

**GRAFICA I Contenido de TRH contra número de estimu-
laciones en el N. accumbens ipsi y contralateral.**

pg de TRH en Núcleo Accumbens
del lado izquierdo

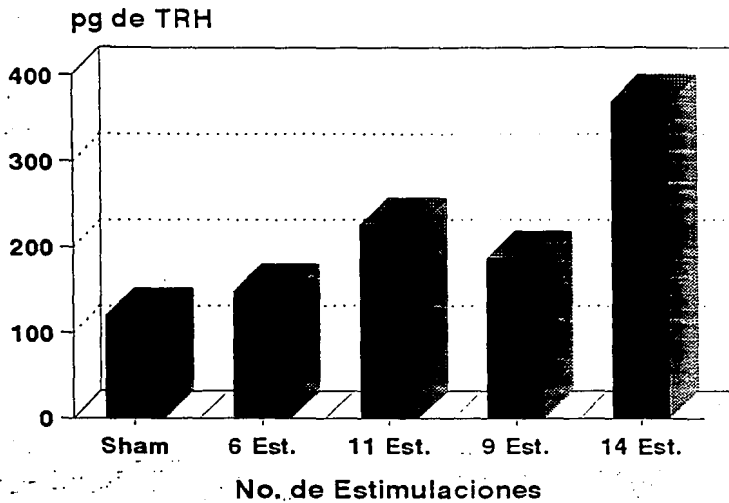


pg TRH en Núcleo Accumbens
del lado derecho

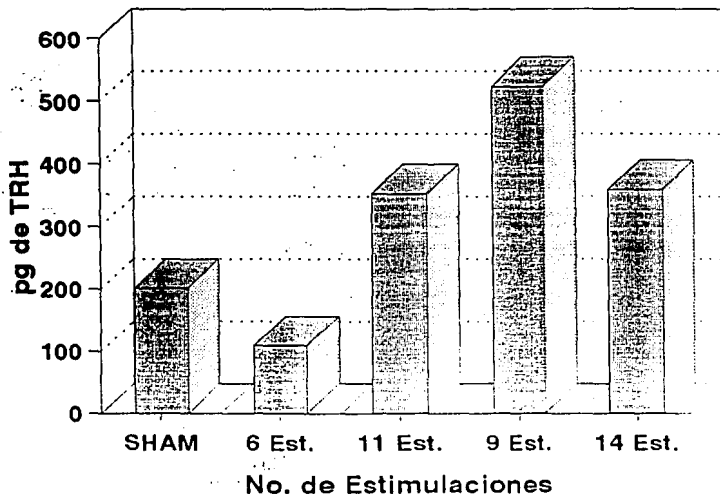


GRAFICA II Contenido de TRH contra número de estimulaciones en la Corteza frontal ipsilateral e hipocampo contralateral.

pg de TRH en Corteza Frontal
del lado izquierdo.

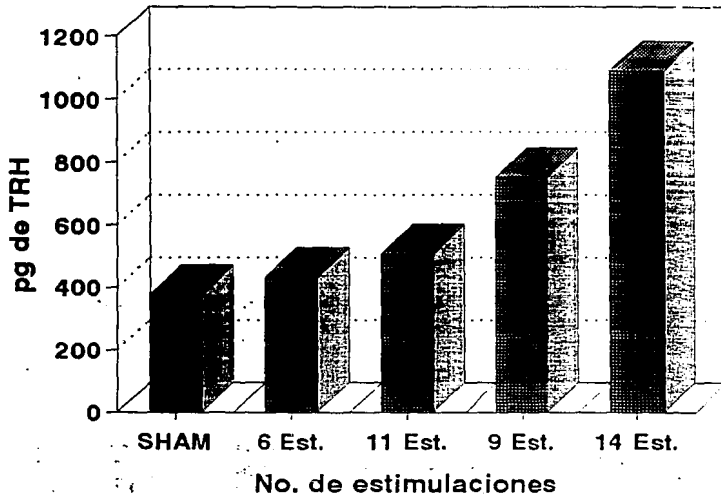


pg de TRH en Hipocampo
del lado derecho

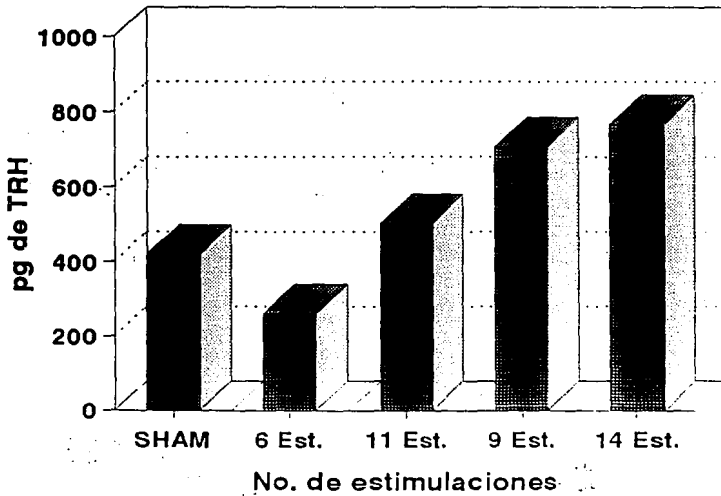


GRAFICA III Contenido de TRH contra número de estimulaciones en la Amígdala ipsi y contralateral.

pg de TR en la Amígdala
del lado izquierdo



pg de TRH en la Amígdala
del lado derecho



En la amígdala ipsilateral se observa un incremento en el contenido de TRH a partir de las 6 estimulaciones hasta llegar a un valor máximo en la etapa 5 que representa el 290% con respecto al valor de las ratas sham. Contralateralmente, el aumento aparece más lentamente, ya que se necesitan 11 estimulaciones para provocar un aumento significativo con respecto a los valores de los animales sham, y en la etapa 5 se encuentra un 182% de incremento. El hipocampo muestra una tendencia similar, el lado ipsilateral muestra sólo elevación en el contenido de TRH después de la etapa 5 con un aumento del 252% con respecto a los valores de los animales sham. En la región contralateral sin embargo, se presenta el decremento (54%) encontrado en otros tejidos al aplicar 6 estimulaciones y a partir de 11 estimulaciones se encuentra una recuperación del TRH hasta presentar después de la etapa 5 un aumento del 219% con respecto de los valores de las ratas sham.

Debido a que se observó un decremento muy marcado del contenido de TRH en algunas regiones del cerebro en la etapa 2 (con 6 estimulaciones), en contraste con lo reportado, se conformó un segundo grupo de 8 ratas que se estimularon hasta alcanzar la etapa 2 del kindling, con objeto de corroborar los resultados obtenidos con el grupo anterior. Este grupo de animales requirió 9 estimulaciones para alcanzar la etapa. Tanto el núcleo accumbens como la corteza frontal y el hipotálamo ipsilateral tuvieron un decremento en la concentración de TRH.

4.3.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA PGA II DURANTE EL DESARROLLO DEL KINDLING.

La actividad específica de la PGA II fué cuantificada en las regiones antes mencionadas incluyendo además el cerebelo y el bulbo olfatorio. El cerebelo tiene entre 3 y 4.6 pmol/min/mg de proteína de actividad de la enzima PGA II, pero concentraciones de TRH no detectables. El bulbo olfatorio responde electrofisiológicamente durante el establecimiento del kindling amigdalino y tiene alto contenido de TRH y de actividad de la enzima PGA II.

Los resultados de ambos grupos se muestran en la TABLA VI, y VII, ya que se analizaron por separado las regiones ipsi y contralaterales al sitio de la estimulación. También puede verse el efecto del kindling en las GRAFICAS IV, V, VI que corresponden al núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo.

Los cambios detectados en la actividad enzimática de la PGA II fueron opuestos y complementarios a los encontrados en el contenido de TRH. Es decir, en la etapa 2 del desarrollo del kindling, la actividad de la enzima aumenta dramáticamente (hasta un 359% en el caso del hipotálamo ipsilateral), al compararla con los valores de las ratas sham, y posteriormente ocurre una disminución gradual de la actividad de la PGA II que es máxima en el establecimiento del kindling en la etapa 5.

TABLA VI

Actividad específica de la enzima PGA II durante el progreso del kindling. Regiones ipsilaterales al sitio de la estimulación. (pmol/min/mg de proteína)

	Sham	Etapa 2	Etapa 4	Etapa 5	
Hipotálamo	2.6p1.3	a 6p2.8	b 3p2	b 2p0.2	*
N. accumbens	3p1.2	a 4p0.08	b 3p2	b 2p0.28	*
Corteza fr.	4p1.3	7p0.4	3p1.7	4p0.9	
Amígdala	2.8p0.55	a 5p1.3	a 5.2p1.5	b 2p0.24	*
Cerebelo	2p0.76	4p1.4	1.6p1.3	1.5p0.2	
Hipocampo	3p1.1	a 6p2	b 5p1.5	b 2.5p0.36	*
B. raquídeo	0.8p0.2	1.2p0.6	1.2p0.75	0.7p0.23	
B. olfatorio	4.5p2	9p0.6	4p0.6	4.7p1.4	

* Existe diferencia significativa >0.05 entre las etapas al realizar el ANOVA.

Las literales diferentes arriba de los valores de las etapas indican diferencias >0.05 entre ellas.

Los valores están expresados como la media p la d.e.

TABLA VII

Actividad específica de la enzima PGA II durante el progreso del kindling. Regiones contralaterales al sitio de la estimulación. (pmol/min/mg de proteína)

	Sham	Etapa 2	Etapa 4	Etapa 5	
Hipotálamo	2.6p0.7	8.5p1.3	2.6p0.9	2p0.8	
N. accumbens	2.5p0.6	3.6p0.2	2p0.4	1.7p0.17	
Corteza fr.	4p1.1	7.8p.78	6.5p2.8	4.7p1.3	*
Amígdala.	4p0.13	5.7p0.3	6.6p2	2.4p1.4	*
Cerebelo	2p0.9	2.5p1	2p0.5	1.4p0.3	
Hipocampo	4p1.1	7.6p1.2	4.5p0.9	3.4p0.6	
B. raquídeo	0.6p0.3	1.3p0.4	1.2p0.7	0.8p0.13	
B. olfatorio	4.5p2	9.4p2	5.4p1.9	5p2	*

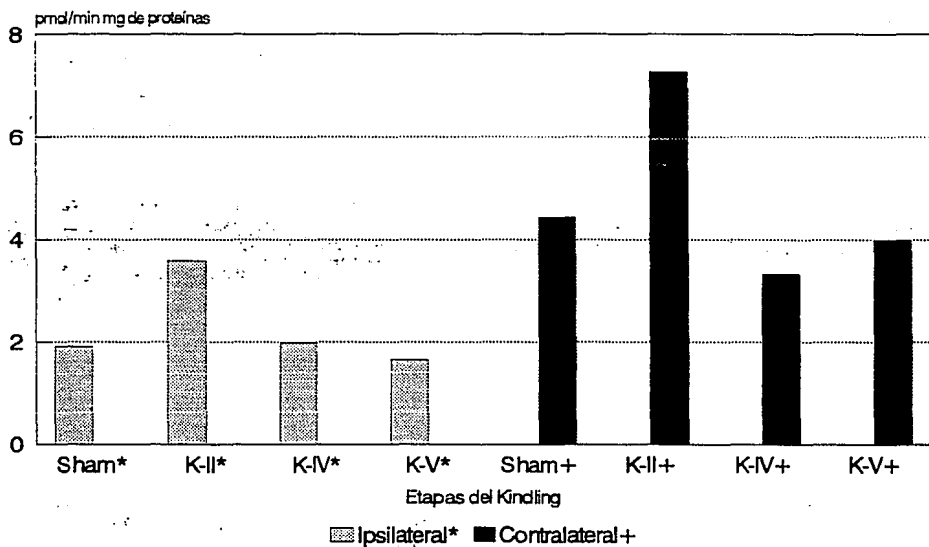
* Existe diferencia significativa >0.05 entre las etapas al realizar el ANOVA.

Las literales diferentes arriba de los valores de las etapas indican diferencias >0.05 entre ellas.

Los valores están expresados como la media p la d.e.

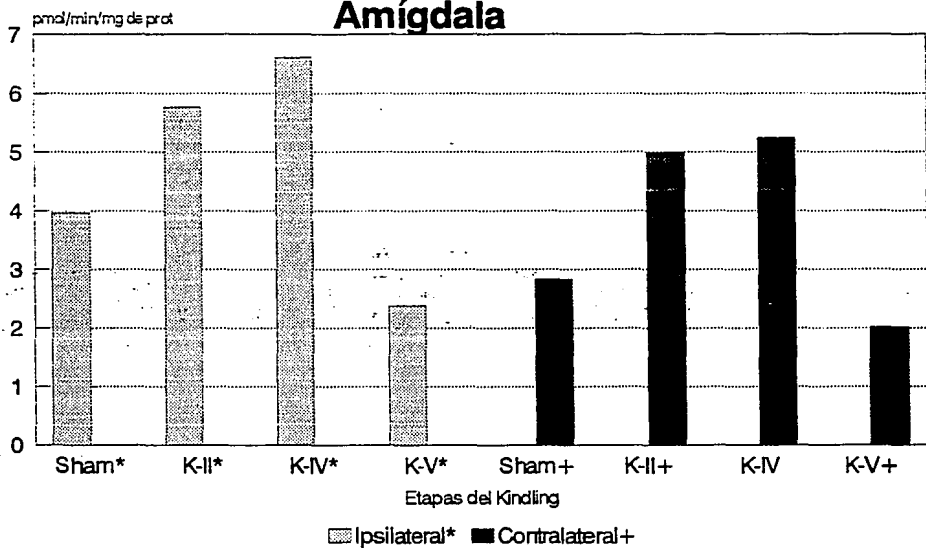
GRAFICA IV Actividad específica de la enzima PGA
II durante el desarrollo del kindling en el Núcleo
Accumbens (ipsi y contralateral).

Actividad específica de PGA II en Núcleo Accumbens



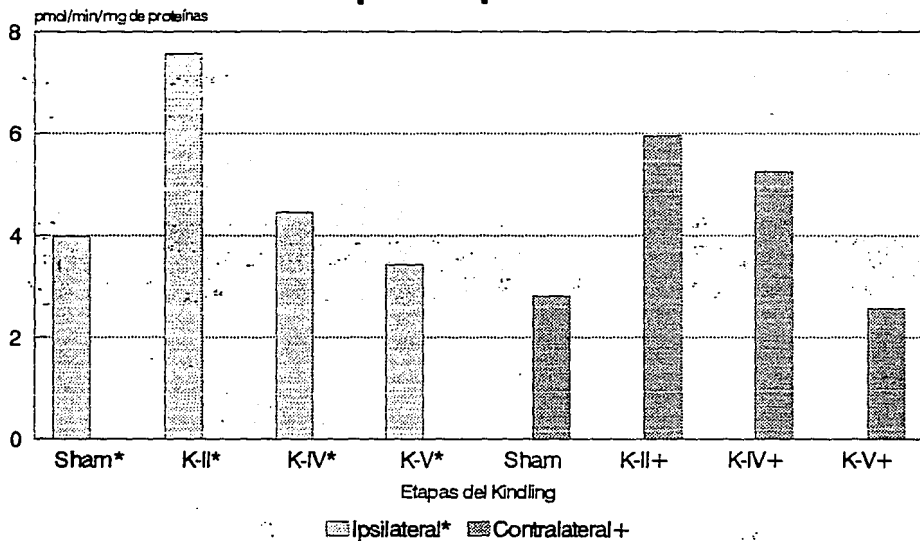
GRAFICA V Actividad específica de la enzima PGA
II durante el desarrollo del kindling en la amígdala
(ipsi y contralateral).

Actividad específica de PGA II en Amígdala



GRAFICA VI Actividad específica de la enzima PGA
II durante el desarrollo del kindling en el hipocampo (ipsi y contralateral).

Actividad específica de PGA II en Hipocampo



Los cambios en actividad específica de la enzima PGA II encontrados, son significativos en el hipotálamo, en el núcleo accumbens, en la corteza frontal, la amígdala y el hipocampo ipsilaterales; y para la amígdala, el núcleo accumbens, la corteza frontal, el hipocampo y el bulbo raquídeo contralaterales al sitio de la implantación del electrodo. No existe diferencia significativa en la región del cerebelo.

En la etapa 4 la actividad específica de la enzima permanece elevada en la corteza frontal, en el bulbo raquídeo, y en la amígdala del lado derecho. Del lado izquierdo sólo en el hipotálamo se encuentra elevada la actividad en esta etapa, mientras que en los demás tejidos la actividad es comparable a la de los animales sham.

En la etapa 5 existe un decremento de la actividad de la enzima en el núcleo accumbens, el cerebelo y la amígdala ipsilateral, presentándose la mayor disminución en el caso de la amígdala, con una diferencia del 60% +/- 35 con respecto a las ratas sham.

Los cambios son más importantes en la parte ipsilateral que en la contralateral de todos los tejidos, al igual que en el caso del contenido de TRH.

El comportamiento del contenido de TRH opuesto al de la actividad de la enzima PGA II en las diferentes etapas del progreso del kindling del N. accumbens, la amígdala y el hipocampo se muestran en las GRAFICAS VII, VIII, IX.

4.4.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PGA II Y CONCENTRACION DE TRH DOS SEMANAS DESPUES DEL ESTABLECIMIENTO DE LAS CRISIS CONVULSIVAS.

Se ha reportado que los cambios que ocurren en diferentes tejidos del cerebro durante el desarrollo del kindling, se pueden revertir cuatro semanas después del establecimiento de las crisis convulsivas. Por ello, con objeto de definir qué tan permanentes son los cambios bioquímicos que hemos observado, se realizó un experimento en el que se analizó la actividad de la enzima y la concentración de TRH dos semanas después de que los animales llegaron clínica y electrofisiológicamente a la etapa 5.

No se encontró diferencia significativa ni en la concentración de TRH ni en la actividad enzimática de la PGA II en los tejidos analizados dos semanas después de la etapa 5, al compararlos con los datos de los animales sham (TABLA VIII), lo que indica que los cambios bioquímicos provocados por el desarrollo del kindling, no son permanentes.

TABLA VIII

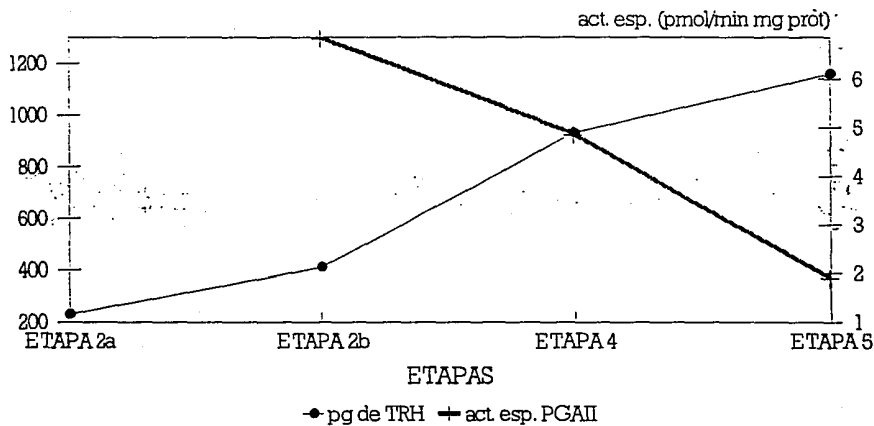
**Concentración de TRH y Actividad específica de la enzima
PGA II, dos semanas después de la crisis de la etapa 5.**

	TRH Tejido contralateral % de diferencia		PGA II Tejido ipsilateral % de diferencia	
	Sham	Etapa 5	Sham	Etapa 5
Hipotálamo	100p33	116p66	100p60	56p40
N. accumbens	100p54	81p55	100p25	89p11
Corteza frontal	100p41	138p9	100p29	80p5
Cerebelo	100p58	75p25	100p23	114p23
Hipocampo	100p59	114p42	100p21	76p23
Bulbo raquídeo	100p50	95p49	100p78	73p22
Bulbo olfatorio	100p81	88p51	100p39	52p16

Los resultados se expresan como porcentaje de diferencia con respecto al valor de los animales sham d.e..

GRAFICA VII Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en el Núcleo Accumbens, durante el progreso del kindling.

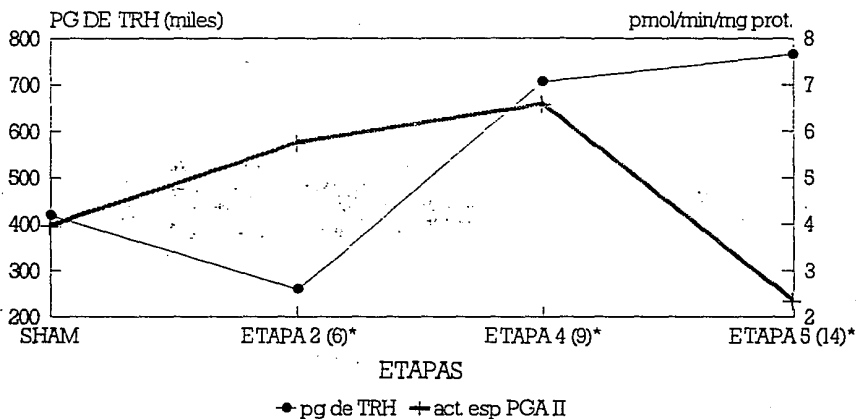
**COMPARACION ENTRE CONCENTRACION DE TRH
Y ACTIVIDAD ESP. DE PGII EN EL NUCLEO
ACCUMBENS DERECHO**



ETAPA 2a = 6 ESTIMULACIONES
 ETAPA 2b = 11 ESTIMULACIONES
 ETAPA 4 = 9 ESTIMULACIONES
 ETAPA 5 = 14 ESTIMULACIONES

GRAFICA VIII Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en la Amígdala, durante el progreso del kindling.

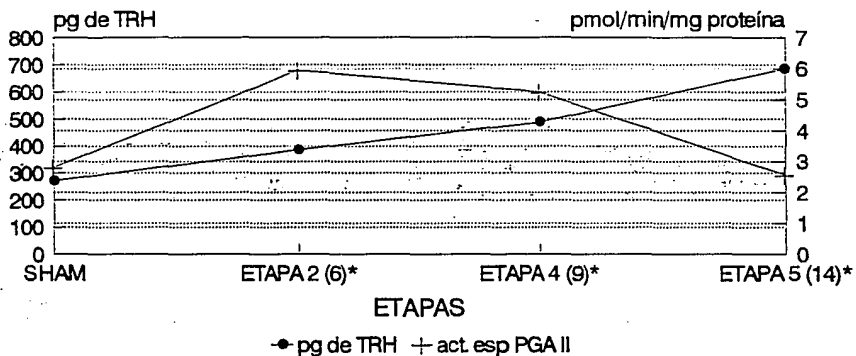
COMPARACION ENTRE CONCENTRACION DE TRH Y ACTIVIDAD ESP. DE PGII EN LA AMIGDALA DERECHA.



ETAPA 2 = 6 EST.
 ETAPA 4 = 9 ESTIMULACIONES
 ETAPA 5 = 14 ESTIMULACIONES

GRAFICA IX Cambios opuestos y complementarios en el contenido de TRH y la Actividad de la enzima PGA II en el Hipocampo, durante el progreso del kindling.

COMPARACION ENTRE CONCENTRACION DE TRH Y ACTIVIDAD ESP DE PGAI EN EL HIPOCAMPO IZQUIERDO



ETAPA 2=6 ESTIMULACIONES
 ETAPA 4=9 ESTIMULACIONES
 ETAPA 5=14 ESTIMULACIONES

4.5.- ANALISIS DE LAS CORRELACIONES ENTRE LOS CAMBIOS DE TRH Y LAS VARIABLES ELECTROFISIOLÓGICAS.

Los animales experimentales de nuestro estudio mostraron diferentes valores promedio del número de estimulaciones aún cuando el animal se clasificara dentro de una misma etapa conductual. Con objeto de determinar si las variaciones en el contenido de TRH dependían de las estimulaciones recibidas por el animal o bien, de la etapa alcanzada en el kindling, se realizaron análisis estadísticos para correlacionar la duración y frecuencia (acumulada y puntual) de las postdescargas con el número de estimulaciones, con la etapa, y con el contenido de TRH que determina el grado de respuesta bioquímica de la neurona excitada (TABLA IX).

No se observó correlación entre el número de estimulaciones y la duración de la postdescarga a diferencia de lo reportado (28). Sin embargo al correlacionar la etapa con la duración de la postdescarga, se encontró que el 76.8% del comportamiento de la duración de la PD está explicado por la etapa que alcanzan los animales. La correlación entre la frecuencia y el número de estimulaciones o la etapa del kindling fué también altamente significativa.

TABLA IX

Correlaciones realizadas con la duración y la frecuencia de las postdescargas.

	r	n	p
Duración de PD vs No. de est.	<0.6		
Duración de PD vs Etapa	0.78	2	0.002
Frecuencia de PD vs No. de est.	0.903	3.84	0.000
Frecuencia de PD vs Etapa	0.71	6.66	0.006
No. de est. vs pg de TRH en el N. accumbens contralateral.	0.75	289	0.003
No. de est. vs pg de TRH en el N. accumbens ipsilateral. (correlación semilogarítmica)	0.608	0.088	0.027

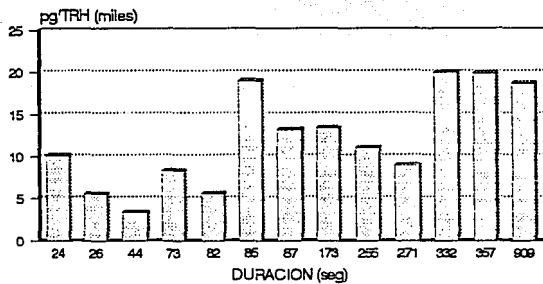
Se analizó estadísticamente la correlación entre el comportamiento de las diferentes estructuras, en cuanto al aumento en el contenido de TRH contra el aumento en la duración y contra el aumento en la frecuencia, y el resultado ($r=0.9$) indica que el comportamiento con respecto a frecuencia y duración es similar en el 90% de los casos analizados.

Al correlacionar el número de estimulaciones contra pg de TRH de todos los tejidos estudiados, se encontró un valor significativo sólo para el caso del núcleo accumbens derecho. Con una correlación de 0.750; ($p=0.003$). Sin embargo, una correlación semilogarítmica de las mismas variables, fue significativa para el núcleo accumbens izquierdo.

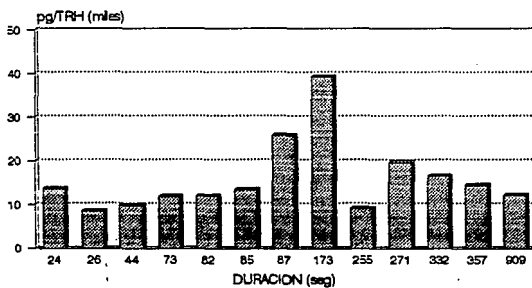
Analizando la correlación entre el contenido de TRH y la duración de la postdescarga resulta significativa únicamente si es semilogarítmica y sólo para el núcleo accumbens izquierdo, con un valor de 0.67. Al hacer la misma correlación pero logarítmica, se encontró un valor significativo para el hipotálamo derecho, con una correlación de 0.674; para el núcleo izquierdo de 0.674; y para el núcleo accumbens derecho de 0.689.

En las Gráficas X a XIV aparecen los datos del contenido de TRH en las estructuras con correlación significativa, (ipsi y contralateral), del cerebro de cada rata contra el aumento de la duración de la postdescarga acumulada. En las Gráficas de la XV a

**GRAFICA X Contenido de TRH en el Hipotálamo
(ipsi y contralateral) contra el aumento en la du-
ración de la postdescarga acumulada.**

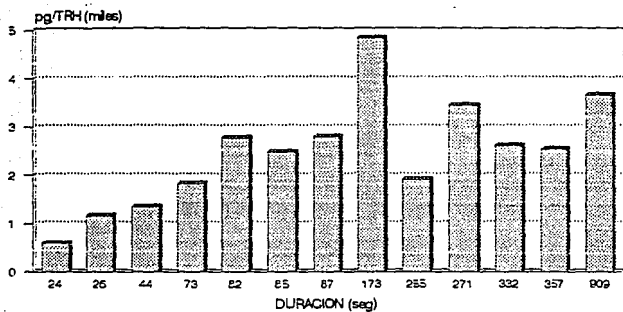


HIPOTALAMO DERECHO

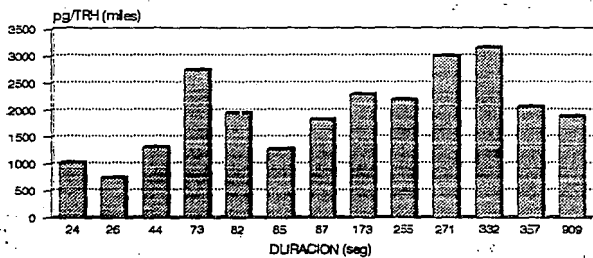


HIPOTALAMO IZQUIERDO

GRAFICA XI Contenido de TRH en el Núcleo Accumbens
(ipsi y contralateral) contra el aumento en la du-
ración de la postdescarga acumulada.

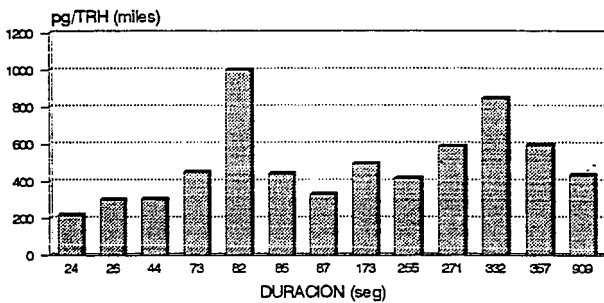


ACCUMBENS DERECHO

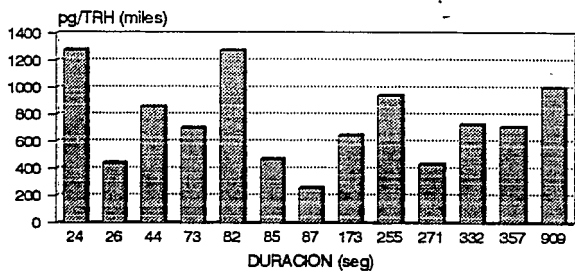


ACCUMBENS IZQUIERDO

GRAFICA XII Contenido de TRH en el Hipocampo (ipsi
y contralateral) contra el aumento en la duración
de la postdescarga acumulada.

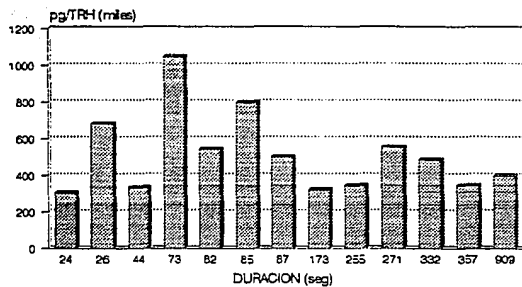


HIPOCAMPO DERECHO

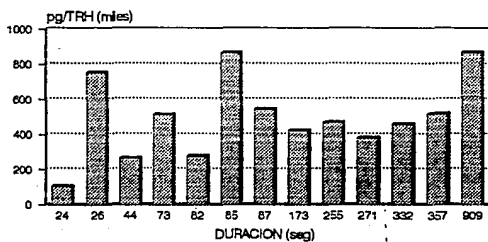


HIPOCAMPO IZQUIERDO

GRAFICA XIII Contenido de TRH en la Corteza Frontal
(ipsi y contralateral) contra el aumento en la du-
ración de la postdescarga acumulada.....

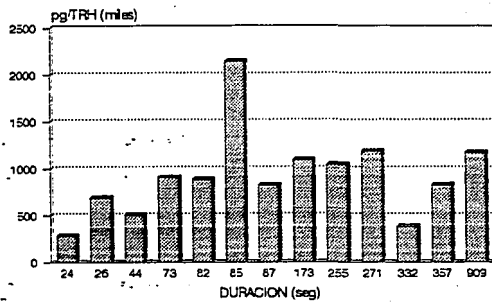


CORTEZA DERECHA

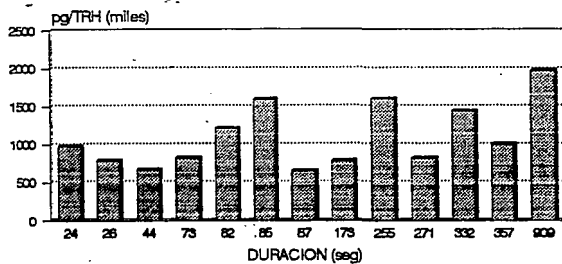


CORTEZA IZQUIERDA

GRAFICA XIV Contenido de TRH en la Amígdala (ipsi
y contralateral) contra el aumento en la duración
de la postdescarga acumulada.



AMIGDALA DERECHA



AMIGDALA IZQUIERDA

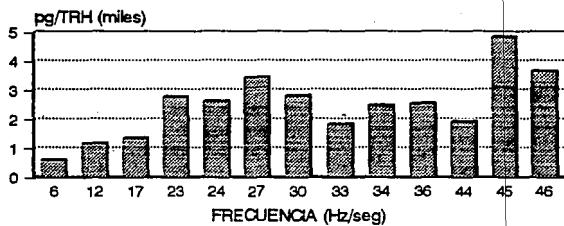
la XVIII se encuentra la respuesta de los tejidos con una correlación significativa, al aumento en la frecuencia de la postdescarga.

Los resultados anteriores son explicables debido a que en la mayoría de los casos, el comportamiento de la concentración de TRH respecto a la frecuencia y a la duración de la PD fue el de una campana. El comportamiento tanto en las gráficas de duración como de frecuencia de la PD, sigue el de una curva normal en el 83% de los casos (excepto en la amígdala izquierda), con un punto máximo de producción de TRH, y posteriormente un declive en la respuesta del tejido al aumento de duración y frecuencia de la PD.

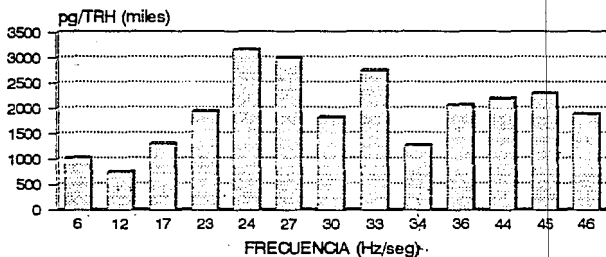
Tanto con la duración como con la frecuencia, la amígdala izquierda muestra un aumento progresivo en el contenido de TRH, de modo que el punto máximo se encuentra con la mayor duración y la mayor frecuencia, que corresponde a la etapa 5 a la que se llegó con 14 estimulaciones. Las correlaciones son bajas. Esto se debe a que el incremento en la concentración de TRH respecto a la frecuencia no sigue un patrón lineal.

En las demás estructuras analizadas, el comportamiento del contenido de TRH con respecto a la duración y la frecuencia de la PD es el de una curva normal. Presentaron una zona ascendente y una descendente, por lo que se realizó una correlación tomando

GRAFICA XV Contenido de TRH en el Núcleo Accumbens
(ipsi y contralateral) contra el aumento en la
frecuencia de la postdescarga acumulada.

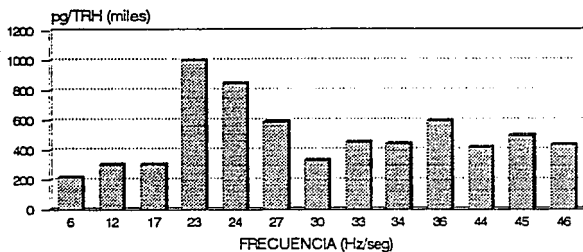


ACCUMBENS DERECHO

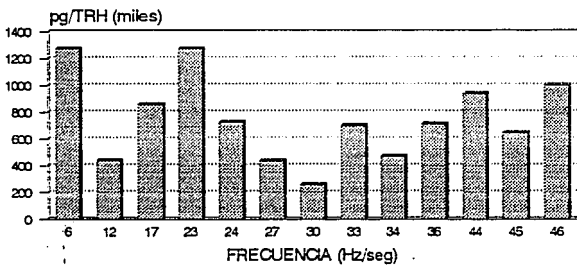


ACCUMBENS IZQUIERDO

GRAFICA XVI Contenido de TRH en el Hipocampo (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.

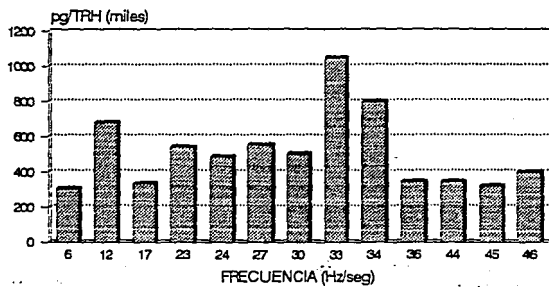


HIPOCAMPO DERECHO

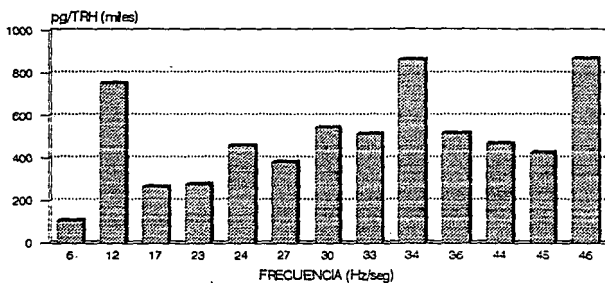


HIPOCAMPO IZQUIERDO

GRAFICA XVII Contenido de TRH en la Corteza Frontal (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.

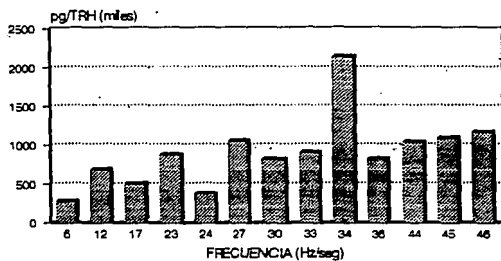


CORTEZA DERECHA

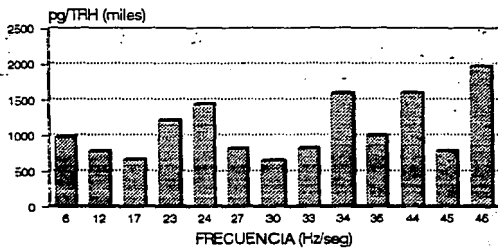


CORTEZA IZQUIERDA

GRAFICA XVIII Contenido de TRH en la Amígdala (ipsi y contralateral) contra el aumento en la frecuencia de la postdescarga acumulada.



AMIGDALA DERECHA



AMIGDALA IZQUIERDA

el primer punto de la línea, es decir, la duración o la frecuencia más baja y como último punto la duración o la frecuencia con la que se produce el mayor contenido de TRH (que varía dependiendo del tejido analizado) y posteriormente se realizó una correlación del punto máximo de la curva al último punto. Si la correlación resultara alta, implicaría que el comportamiento de TRH tiene una tendencia lineal con respecto a la duración o a la frecuencia de la PD.

En la TABLA X aparecen los datos de la correlación de la línea con pendiente positiva (ascendente), la pendiente, la duración que produce el mayor contenido de TRH, y el número de estimulaciones que corresponden a esa duración. En la TABLA XI aparecen los datos de la línea con pendiente negativa (descendente).

Las TABLAS XII y XIII muestran los datos de la línea con pendiente positiva o negativa del contenido de TRH contra la frecuencia de la PD.

TABLA X

CORRELACIONES DE LA LINEA CON PENDIENTE POSITIVA DE CONTENIDO DE TRH CONTRA DURACION DE LA POSTDESCARGA.

	Máximo contenido de TRH (pg)	r	m	Valor máximo de duración. (seg)	Número estimulación.
1)Hipotálamo	39420	*0.868	191.8	173	14(K-5)
2)Hipotálamo	19996	0.505	24.9	332	9 (K-4)
1)N. accumbens	3162	0.806	6.0	332	9 (K-4)
2)N. accumbens	4842	*0.982	27.2	173	14(K-5)
1)Hipocampo	1275	0.229	3.1	82	11(K-2)
2)Hipocampo	999	*0.834	9.8	82	11(K-2)
1)Corteza	546	0.308	3.3	86	11(K-2)
2)Corteza	1047	*0.731	11.2	73	11(K-2)
1)Amígdala	1979	*0.674	1.2	909	14(K-5)
2)Amígdala	823	*0.733	17.2	86	11(K-2)
1)Bulbo raq.	1287	0.609	2.3	255	14(K-5)
2)Bulbo raq.	850	-0.095	-0.06	24	6 (K-2)

* r = estadísticamente significativa > de 0.65

1) ipsilateral; 2) contralateral

TABLA XI

CORRELACIONES DE LA LINEA CON PENDIENTE NEGATIVA DE CONTENIDO DE TRH CONTRA DURACION DE LA POSTDESCARGA.

	Máximo contenido de TRH. (pg)	r	m	Valor máximo de duración. (seg)	Número estimulación.
1)Hipotálamo	39420	-0.448	-18.2	173	14(K-5)
2)Hipotálamo	19996	*-1.0	-2.17	332	9 (K-4)
1)N. accumbens	3162	-0.637	-1.34	332	9 (K-4)
2)N. accumbens	4842	+0.06	0.235	173	14(K-5)
1)Hipocampo	1275	0.324	0.397	82	11(K-2)
2)Hipocampo	999	-0.159	-0.13	82	11(K-2)
1)Corteza	546	0.412	0.3	86	11(K-2)
2)Corteza	1047	-0.440	-0.4	73	11(K-2)
1)Amígdala	1979				
2)Amígdala	823	-0.171	-0.328	86	11(K-2)
1)Bulbo raq.	1287	-0.573	-0.856	266	11(K-2)
2)Bulbo raq.	850				

* correlación estadísticamente significativa $r > -0.65$

1)ipsilateral; 2)contralateral

La amígdala ipsilateral y el bulbo raquídeo contralateral no presentaron comportamiento como curva normal.

TABLA XIII

CORRELACIONES DE LA LINEA CON PENDIENTE POSITIVA DEL CONTENIDO DE TRH CONTRA LA FRECUENCIA DE LA POSTDESCARGA.

	Máximo contenido de TRH. (pg)	r	m	Valor máximo de frecuencia (Hz)	Número estimulación.
1)Hipotálamo	39420	0.446	325.7	45	14(K-5)
2)Hipotálamo	19996	0.303	266.3	24	9 (K-4)
1)N. accumbens	3162	*0.815	266.3	24	9 (K-4)
2)N. accumbens	4842	*0.679	63.7	45	14(K-5)
1)Hipocampo	1275	0.119	6.5	23	11(K-2)
2)Hipocampo	999	*0.84	42.2	23	11(K-2)
1)Corteza fr.	866	0.503	12.65	34	11(K-2)
2)Corteza fr.	1047	0.58	14.63	33	11(K-2)
1)Amígdala	1979	0.455	15.39	46	14(K-5)
2)Amígdala	2147	*0.68	39.61	34	11(K-2)
1)Bulbo raq.	1287	0.393	10.44	44	14(K-5)
2)Bulbo raq.	850	-0.426	-5.826	6	6 (K-2)

*correlación estadísticamente significativa > 0.65

1)ipsilateral; 2)contralateral

TABLA . XIII

CORRELACIONES DE LA LINEA CON PENDIENTE NEGATIVA DEL CONTENIDO DE TRH CONTRA LA FRECUENCIA DE LA POSTDESCARGA.

	Máximo contenido de TRH. (pg)	r	m	Valor máximo de frecuencia (Hz)	Número estimulación.
1)Hipotálamo	39420				
2)Hipotálamo	19996	0.024	14.2	24	9 (K-4)
1)N.accumbens	3162	-0.468	-35.4	24	9 (K-4)
2)N.accumbens	4842				
1)Hipocampo	1275	0.079	2.75	23	11(K-2)
2)Hipocampo	999	*0.65	-15.9	23	11(K-2)
1)Corteza fr.	866	-0.245	-9.66	34	11(K-2)
2)Corteza fr.	1047	*0.772	-39.6	33	11(K-2)
1)Amígdala	1979				
2)Amígdala	2147	*0.755	0.048	34	11(K-2)
1)Bulbo raq.	1287	*-0.815	-455.5	44	14(K-5)
2)Bulbo raq.	850				

* correlación estadísticamente significativa $r > 0.65$
 1)ipsilateral; 2)contralateral

Este análisis permitió encontrar que algunos tejidos representan el máximo valor de TRH con la misma duración de la PD, es decir, existe una alta correlación entre el comportamiento del hipotálamo izquierdo con el N. accumbens derecho; el hipotálamo derecho con el N. accumbens izquierdo; la amígdala derecha con la corteza izquierda; el hipocampo en ambas porciones, ipsi y contralaterales tienen un valor máximo de contenido de TRH con la misma duración (82 seg).

Puede observarse que la curva está más desplazada hacia a la izquierda comenzando con la corteza derecha; hipocampo ipsi y contralateral; amígdala contralateral y corteza ipsilateral; hipotálamo izquierdo y n. accumbens derecho; bulbo raquídeo izquierdo; hipotálamo derecho y n. accumbens izquierdo; amígdala izquierda. Esto quiere decir, que en ese orden responden las diferentes estructuras con respecto al aumento en la duración de la PD.

La pendiente nos indica qué tan gradual es el aumento en el contenido de TRH con respecto a la duración. Mientras más positiva es la pendiente podemos decir que con un ligero aumento en la duración de la PD, se provoca un mayor aumento en el contenido de TRH. En ese sentido responde con mayores cambios, por cada aumento en la duración de la PD: el hipotálamo ipsilateral > el N. accumbens contralateral > el hipotálamo contralateral > la amígdala contralateral > la corteza

contralateral> el hipocampo contralateral> el n. accumbens ipsilateral> la corteza ipsilateral> el hipocampo ipsilateral> el bulbo raquídeo ipsilateral> la amígdala ipsilateral.

De las estructuras con una correlación mayor de 0.65 (estadísticamente significativa), las que responden aumentando el contenido de TRH con menor número de estimulaciones, son en orden decreciente de su pendiente, la amígdala contralateral (Gráfica XIV), después la corteza contralateral (Gráfica XIII), y el hipocampo contralateral (Gráfica XII).

Estas tres estructuras aumentan su contenido de TRH con 11 estimulaciones, que corresponden a la etapa 2, la pendiente no es muy positiva (comparando con el hipotálamo izquierdo) lo que indica que el aumento es muy gradual y progresivo. A partir de ese punto, a pesar de que aumenta la duración de la PD no hay mayor respuesta (de producción de TRH) en las etapas siguientes.

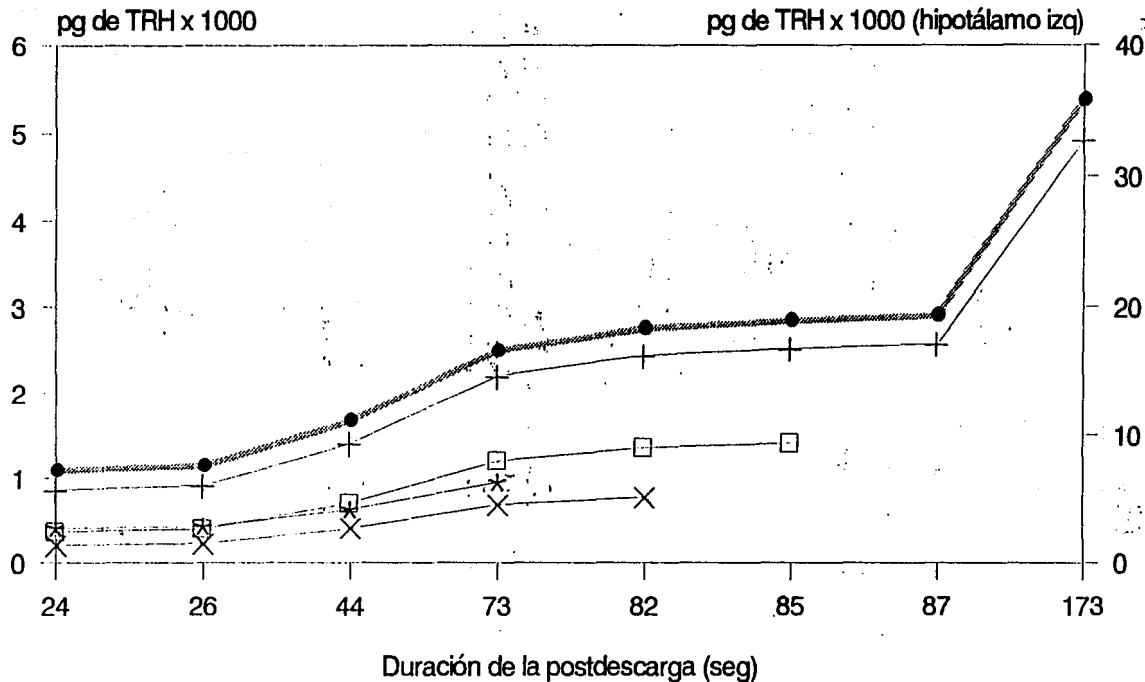
La pendiente del declive de estas mismas estructuras no es muy negativa, se mantiene por abajo de los niveles máximos hasta llegar a la etapa 5. Las estructuras con una correlación mayor de 0.65, que responden con el máximo contenido de TRH hasta llegar a 14 estimulaciones son, en orden decreciente de su pendiente, el hipotálamo ipsilateral (Gráfica X) el n. accumbens contralateral y el n. accumbens ipsilateral (Gráfica XI). En estas estructuras la correlación entre la duración de la PD y el número de

estimulaciones se mantiene elevada ($r=0.9527$), lo cual parece tener relación con que el aumento máximo de TRH aparezca hasta la etapa 5.

En la GRAFICA XIX aparecen las pendientes de estructuras representativas; puede apreciarse que la corteza alcanza el máximo de producción de TRH a un valor de 73 seg de duración de la PD, mientras que el hipotálamo y el n. accumbens, hasta el valor máximo de PD. En el caso del n. accumbens ipsilateral la correlación entre la duración de la PD y el contenido de TRH es negativa y alta (-0.637) en la región del declive de la curva. Las neuronas de estas regiones no pierden la capacidad de respuesta al número de estimulaciones, a diferencia de las regiones eminentemente epilépticas.

Puesto que la correlación entre la frecuencia y la duración de la PD es de 0.9, el comportamiento del contenido de TRH con respecto a la frecuencia es similar al de la duración. De modo que el punto máximo de producción de TRH con respecto a la frecuencia de la PD, se encuentra en la misma etapa y con el mismo número de estimulaciones en el 83% de los casos. En consecuencia el comportamiento del contenido de TRH contra el aumento de la frecuencia de la PD también muestra una curva normal en el 83% de los casos, a excepción de la amígdala ipsilateral (Gráficas XVIII). Las regiones que presentan una correlación estadísticamente significativa ($r > 0.65$) variaron.

GRAFICA XIX Pendientes de los tejidos con correlaciones > 0.65 entre contenido de TRH y duración de la postdescarga.



● hipotálamo izq. + n.accumbens der. * corteza der.
 □ amígdala der. × hipocampo der.

**Incremento en la concentración de TRH
 respecto a la duración de la post-
 descarga**

Estas son el n. accumbens ipsilateral, el n. accumbens contralateral (Gráfica XV), el hipocampo ipsilateral (Gráfica XVI) y la amígdala ipsilateral (Gráfica XVIII).

El n. accumbens ipsi y contralateral tienen una pendiente muy positiva, lo que indica cambios grandes de contenido de TRH con cambios pequeños en el aumento de la frecuencia de la PD. El punto máximo de contenido de TRH se obtiene en la etapa 4 para el n. accumbens ipsilateral y en la etapa 5 para el contralateral. Coincide con el comportamiento con respecto a la duración. La pendiente de la línea del declive no es muy grande para la porción ipsilateral, a diferencia de lo que ocurre cuando se grafica contra la duración de la PD en la misma región.

El hipocampo y la amígdala contralateral se comportan aumentando su contenido de TRH en la etapa 2 con cambios graduales con respecto al aumento en la frecuencia. A diferencia de lo que ocurre en la duración, la pendiente de la línea del declive es estadísticamente significativa en el hipocampo, corteza frontal y amígdala contralateral, como si después del aumento de TRH las neuronas de estas regiones se "fatigaran" y no respondieran a los aumentos en frecuencia.

5.- DISCUSION

Loscher (26) demuestra una marcada diferencia en el valor del umbral de la postdescarga (UPD) entre los animales sham que tienen diferente período de tiempo de implantación. En cambio al comparar la duración de la PD registrada en dos grupos de animales con diferentes tiempos de implantación, uno de ellos estimulado (kindling) y el otro no (sham) se pueden observar que los valores promedio fueron de 8.1 ± 1.2 seg en las ratas (kindling) con una semana de intervalo entre la implantación y el registro, contra 6.1 ± 0.96 seg en las ratas (sham) con 4 semanas de intervalo. Ambos grupos tuvieron similar duración y severidad de las convulsiones (11.3 ± 1.7 contra 10.4 ± 5.2 seg) cuando se midió el umbral de la postdescarga antes del kindling (26). Por esta razón nuestros animales control son ratas que son implantadas en el mismo período de tiempo que las ratas experimentales, y son sacrificadas el mismo día en que las últimas alcanzan la etapa deseada. No existió sin embargo, diferencia significativa entre los distintos grupos sham, ni en el contenido de TRH ni en la actividad de la PGA II por lo que los cambios encontrados son consecuencia de la estimulación eléctrica.

Se ha reportado que la magnitud de la respuesta de las neuronas al kindling, es decir, el área de los potenciales negativos de las postdescargas, muestran una correlación positiva

con el número de estimulaciones (28). Así mismo la duración de las PD muestra una correlación lineal con el número de estimulaciones (28); nuestros datos no mostraron esta correlación pero sí con la etapa, lo que pudiera implicar una diferencia en la cepa de animales utilizados que requieren menor número de estimulaciones, o las diferencias en tamaño, ya que el peso de los animales varía entre 300 y 350 g. Otro factor importante que puede afectar la variación en el número de estimulaciones es el sitio de implantación del electrodo. No es posible en este tipo de estudio tener un control histológico del núcleo de la amígdala en donde queda colocado el electrodo, puesto que una vez que el animal alcanza la etapa del kindling requerida, es sacrificado y el cerebro disecado. Si el electrodo se encuentra en el núcleo central se necesitan menor número de estimulaciones que cuando se encuentra en el núcleo medial, con una diferencia +/- de 8 estimulaciones (25a). Los animales de este estudio tienen una diferencia de similar magnitud en la etapa 2.

Las neuronas TRHérgicas de regiones epileptogénicas como son la amígdala, la corteza y el hipocampo muestran un aumento en los niveles de TRH durante el desarrollo del kindling, alcanzando incrementos significativos de hasta 200% en la etapa 5, de acuerdo a lo reportado (32). El decremento observado en el contenido de TRH en algunas de las estructuras sugiere que durante las primeras estimulaciones eléctricas se produce un

aumento dramático de la liberación de TRH. Esto es más evidente al comparar la respuesta de la región contralateral vs. la ipsilateral.

Otros grupos no han visto la disminución en el contenido de TRH en etapas tempranas del kindling, lo cual puede deberse a que el número de estimulaciones que, por ejemplo, el grupo de Kubek (32) utiliza para alcanzar la etapa 2-3 es de 9.7, esto significa que no observan los cambios con 6 estimulaciones, y no analizan todos los tejidos que nosotros analizamos. Este mismo grupo no encuentra los cambios en TRH durante la etapa 2 que describimos nosotros. Esto puede ser explicado por la diferencia en la duración de la PD después de la última estimulación en la etapa 5, que fue de 60 ± 12.2 seg y en la etapa 2-3 fue de 30.2 ± 8.6 seg. Nuestros animales en cambio, presentaron una duración en promedio de la etapa 2 de 7.71 ± 3.25 seg, y de 33 ± 20.7 seg en la etapa 5 (similar a la encontrada por Meyerhoff (32) en la etapa 2). Nuestro análisis estadístico sugiere que existe una correlación lineal entre la duración de las PD y la respuesta bioquímica de las neuronas; por tanto, las diferencias que puedan encontrarse en cuanto al contenido de TRH con respecto a lo reportado (32) pueden deberse a que se necesitaron menor número de estimulaciones para declarar a un animal en la etapa deseada, ya que la duración de la PD también fue menor.

La recuperación progresiva y subsecuente es debida probablemente a un aumento en la transcripción del gene de TRH. Kubek (21) reporta un aumento en los niveles de ARNm de TRH sólo en ciertas regiones del cerebro utilizando hibridización "in situ". Aunque esta técnica es esencialmente cualitativa es probable que la síntesis de TRH aumente en todas las regiones estimuladas. La detección del ARNm de preproTRH ha sido observada tres horas después de una convulsión de la etapa 5 en la corteza piriforme, la amígdala, y el hipocampo, y la hibridización más fuerte se mostró a las 6 horas postictales. 24 horas más tarde, la concentración del ARNm del TRH regresó a los niveles basales en todas las estructuras mencionadas. No se detectó hibridización en las secciones de los animales sham previamente tratados con RNasa (21). Nuestro grupo ha reportado cambios rápidos y pasajeros en los niveles de ARNm posterior a un estímulo como la exposición al frío o la succión en diversos núcleos del hipotálamo (48). En células hipotalámicas en cultivo, el aumento de los niveles de segundos mensajeros (AMPC o ésteres de forbol) incrementan los niveles de ARNm de TRH. Es muy probable que en consecuencia al estímulo liberador, la neurona TRHérgica responda también aumentando la síntesis del neuropéptido. Debido sin embargo, a lo pasajero del cambio, resulta técnicamente difícil la cuantificación del ARNm de TRH en cada una de las regiones durante el desarrollo del kindling.

Por otro lado, en ciertas regiones como en el hipotálamo y en el núcleo accumbens, en las cuáles después de la etapa 2 en la que se observa una dramática depleción del TRH, la recuperación de los niveles encontrados en las ratas sham, en la etapa 5 no es del 100% para el núcleo accumbens y apenas del 108 y 121% en el hipotálamo. Esto contrasta con las otras regiones que si mostraron cambios. En la etapa 5 se encuentra un aumento hasta del 300% para el caso de la corteza frontal y la amígdala ipsilaterales. En el núcleo accumbens, en donde no se encuentran cuerpos celulares, no se sabe de donde provenga el TRH que ahí está presente para liberarse, pero los datos encontrados indican que toma más tiempo para este tejido mantener los niveles de TRH.

Sin embargo, si parecen apoyar un evento de liberación importante del TRH. Se ha propuesto además, que el TRH se acumula en el hipocampo después de que el animal presenta convulsiones, y que éste puede ser liberado por estimulación con alto potasio dependiente de calcio, en mayor proporción que en los animales sham y la cantidad que se libera está relacionada a la concentración que tiene el tejido (21). Esto sugiere que el TRH recién sintetizado se almacena en el hipocampo y probablemente en otros sitios epileptogénicos, en una poza de fácil liberación, o que los procesos intracelulares involucrados en el evento de excitosis están afectados en los animales "kindleados".

Este TRH liberado podría provocar una serie de cambios en los receptores de TRH y en la enzima PGA II que lo degrada fisiológicamente. En la etapa 2 el TRH disminuye dramáticamente mientras que la actividad de la enzima es máxima; aparentemente está ocurriendo una liberación del TRH junto con otros aminácidos neurotransmisores (46) que de alguna manera provocan un aumento en la actividad de la enzima degradando al TRH que acaba de ser liberado por las primeras estimulaciones eléctricas.

Estudios recientes (20), que involucran la degeneración de las neuronas presinápticas TRHérgicas, parecen indicar que la enzima está localizada en la membrana de la célula postsináptica, o por lo menos que no se encuentra en la región presináptica. Esto, al correlacionarlo con el hecho de que se ha demostrado que los receptores de TRH (también postsinápticos) se encuentran disminuidos mas o menos en la misma proporción que la enzima, en la etapa 5 del desarrollo del kindling, en algunas de las regiones analizadas, hace suponer que ambas proteínas pudieran tener una regulación similar a través de mecanismos intracelulares que probablemente implican un aumento en la transcripción de los genes tempranos inmediatos como c-fós y c-jun (24) o bien, afectando fosforilaciones específicas.

El ARN mensajero de c-fos se encuentra aumentado durante el establecimiento del kindling en regiones del cerebro que se sabe que responden a este estímulo, como el hipocampo (22).

La disminución en el porcentaje de unión de los receptores de TRH por su ligando está demostrada en la amígdala y en el hipocampo, siendo más importantes los cambios en la región ipsilateral (21), lo cual concuerda con el comportamiento de la enzima en la etapa 5 de las regiones analizadas en nuestro estudio. Como se mencionó en la introducción, en células hipofisarias se ha observado un efecto inhibitorio del TRH en la actividad de la PGA II. La inhibición de la enzima al avanzar el kindling puede ser consecuencia del aumento de liberación del TRH. La estimulación observada en la etapa 2 debe ser, sin embargo causada por otros factores.

Fue clara la respuesta bimodal en el incremento de TRH en respuesta al aumento de la PD. Como si al inicio, la neurona TRHérgica respondiera directamente a la estimulación. Sin embargo en las zonas epileptogénicas, donde se reportan cambios permanentes en el kindling, a una duración más temprana (@ 80 seg) se presenta el máximo de incremento, sin cambios posteriores. El TRH pareciera responder a este "aprendizaje" en el sistema límbico. Esto no ocurrió en el hipotálamo o el núcleo accumbens; zonas en las cuales el TRH tiene una función definida (como neurohormona controlando la función hipofisaria y cuya liberación es susceptible al estrés (48) o involucrado en la función motora, respectivamente.

Existen evidencias de que el TRH tiene un efecto anticonvulsivo, lo cual está relacionado con la reducción de la eficiencia de la transmisión de las señales en el evento conocido como potenciación a largo plazo (LTP) (34). Esta reducción es dosis dependiente y está mediada por los receptores a NMDA (29,46). Además, las benzodiazepinas anticonvulsivas como el diazepam y el flurazepam compiten por el receptor de TRH (22). Existe controversia sobre el efecto del TRH en los receptores a NMDA, dependiendo de la región del cerebro que se estudie (potencia su respuesta a N-metil-D-aspartato de una manera dependiente de voltaje en motoneuronas espinales (42), y tiene un efecto bloqueador en amígdala (34)); pero es evidente que interactúa con ellos en eventos como el LTP o el kindling.

Aunque existen estudios que involucran los receptores NMDA, AMPA postsinápticos, la inhibición de GABA, el aumento en catecolaminas y acetilcolina, sólo es clara la relación del TRH con algunos de ellos (catecolaminas, NMDA, acetilcolina, glutamato). De modo que la función o el efecto que el TRH tiene durante el progreso o el establecimiento del kindling queda por dilucidarse.

Los efectos observados en las características de las PD sugieren que el TRH participe como un anticonvulsivo en regiones del cerebro "específicamente" epileptogénicas. Queda por realizar

una correlación entre estos resultados y la conducta de animales ya epilépticos ante la presencia del TRH, o bien de un antagonista del neuropéptido.

El papel del TRH, al ser liberado junto con aminoácidos excitadores como el aspartato y el glutamato, catecolaminas, podría permanecer elevado en la etapa 5 del kindling, en la terminal sináptica y podría modular eventos postsinápticos como los que se han demostrado. Esto puede apoyar que existe una relación entre el aumento del contenido de TRH, la liberación del péptido, y la disminución de los receptores de TRH y de la actividad de la enzima.

Las regiones que muestran disminución de la actividad de la enzima, muestran también aumento en el contenido de TRH, lo cual pudiera significar especificidad del evento.

La disminución en los receptores de TRH así como en la actividad específica de la enzima podría estar asociada con la inhibición específica y dependiente de la dosis de ciertas poblaciones celulares estimuladas por glutamato. Esta respuesta puede atenuar la sobreexcitabilidad en vías específicas de retroalimentación, tal como la observada en el hipocampo.

Por otro lado, el TRH podría proveer protección contra el daño celular, tal como se ha observado para el TRH en las motoneuronas espinales. O bien, el TRH puede contribuir a la plasticidad

provocada por las convulsiones a través de los efectos tróficos que se sabe que provoca en motoneuronas espinales. O bien, el TRH podría afectar los mensajeros intracelulares, posiblemente modificando la homeostasis del calcio (21). Dependiendo de la región del cerebro previene la excitación neuronal evocada por aminoácidos como el glutamato bloqueando los receptores a NMDA en la corteza cerebral de rata, así que es factible que el tiempo de permanencia del péptido, debido a la disminución de la degradación, pueda prevenir la activación excesiva de las neuronas, sobre todo en excitación anormal como LTP o kindling.

Los efectos específicos provocados por el kindling que se evidencian en este estudio son un aumento en el contenido de TRH después de la aparición de la crisis generalizada; una disminución de la actividad de la enzima degradativa del TRH, de manera simultánea a la disminución que ocurre en los receptores de TRH bajo el mismo estímulo; cambios en el contenido de TRH y de la actividad de la enzima en etapas previas a la aparición de las crisis.

Algunos aspectos que pueden desprenderse de los hechos anteriores, son que el TRH parece ser el responsable del cambio en la actividad de la enzima, puesto que en la región del cerebelo en donde hay presencia de enzima pero no de TRH, no se detectaron cambios en la actividad de la enzima. Además, el TRH puede provocar cambios moleculares como aumentar la expresión de C-fos que pudiera modificar la expresión de la enzima, lo cual se

apoya por el hecho de que c-fos se encuentra en las mismas regiones donde disminuye el receptor durante el kindling. Aparentemente el TRH en la etapa 2 del kindling, se libera y luego aumenta la transcripción del gene de TRH para recuperar los niveles de TRH. Puesto que es liberado con otros neurotransmisores como catecolaminas, glutamato, es posible que estos tengan un efecto en la propagación de las convulsiones.

6.- CONCLUSIONES

1) Los cambios de concentración del TRH son opuestos a los niveles de actividad específica de la enzima.

2) La actividad de la enzima PGA II es regulable en el sistema nervioso central en condiciones de estimulación eléctrica.

3) Puede proponerse una liberación del TRH con las primeras estimulaciones que provocan una modificación de la actividad de la enzima.

4) El comportamiento del TRH en el desarrollo del kindling, que en etapas iniciales es proporcional a la estimulación y no después, puede representar un mecanismo compensatorio u homeostático.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aggleton, J.P. The Amygdala.Wiley-Liss. New York, 1993
- 2.-Bauer,K.Adenohypophyseal degradation of thyrotropin - releasing hormone regulated by thyroid hormones. Nature 330:375-377, 1987.
- 3.- Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. Biochimie 70:69-74, 1988.
- 4.- Bliss, TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:331-356, 1973.
- 5.- Boler, J., Enzymann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y., Schally, A.V. The identity of chemical and hormonal properties of the TRH and pyroglutamylhistidylprolinamide. Biochem. Biophys, Res. Commun. 37: 705,1969.
- 6.- Brownstein, M.J., Palkovits, M., Saavedra, J.M., Bassiri, R.M., and Utiger, R.D. Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. Science, 185, 267, 1974.
- 7.- Burnham, W.M., Cottrell, G., The GABA hypothesis of kindling. Kindling 4. Edited by J.A. Wada. Plenum Press, New York, 1990, pp 127-139
- 8.- Calzá, L., Giardino, L., Ceccatelli, S., Zanni, M., Elde, R., Hokfelt, T., Distribution of Thyrotropin-Releasing-Hormone receptor messenger RNA in the rat brain: An "in situ" hybridization study. Neuroscience 51:891-909, 1992.
- 9.- Charli, J.L., Cruz, C., Vargas, M.A., and Joseph-Bravo P. The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. Neurochem. Int. 13:237-242, 1988.

10.- Charli, J.L., Méndez, M., Vargas, M.A., Cisneros, M., Assai, M. Joseph-Bravo, P and Wilk, S. Pyroglutamyl Peptidase II Inhibition Specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. Neuropeptides, 14:191-196, 1989.

11.- Charli, J.L., Ponce, G., McKelvy J.F. and Joseph-Bravo P. Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. J. Neurochem. 42:981-986, 1984.

12.- Corcoran M.E., Studies of some neurochemicals and kindling. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, New York, 1986, pp 333-347.

13.- Covarrubias L., Uribe, R.M. Méndez, M., Charli, J.L. and Joseph-Bravo. Neuronal TRH synthesis developmental and circadian TRH mRNA levels. Bichem. Biophys. Res. Com. 151:615-622, 1988.

14.- Cruz, C., Charli, J.L., Vargas, M.A., and Joseph-Bravo, P. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. J. Neurochem. 56: 1594-1601, 1991.

15.- DeLéan A., Ferland D., Drouin J., Kelly P.A. and Labrie F. Modulation of pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. Endocrinology 100:1496-1504, 1977.

16.- Friedman, T.C., and Wilk, S. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. J. Neurochem. 46: 1231-1238, 1986.

17.- Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. Nature 214: 1020-1021, 1967.

18.- Hokfelt, T., Fuxe, K., Johansson, O., Jeffcoate, S., and White, N. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed by immunocytochemistry. Eur. J. Pharmacol. 34:389, 1975.

19.- Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, M., Kordon, C. Effect of neurotransmitters on the "in vitro" release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from a rat mediobasal hypothalamus. Endocrinology 104:801-806, 1979.

20.- Joseph-Bravo, P., Fresán, M.E., Cisneros, M., Vargas, M.A., and Charli, J.L. Synaptic localization of pyroglutamate aminopeptidase II in spinal cord. En preparación. 1994.

21.- Kubek, M.J., Knoblach, B.S., Sharif, N.A., Burt, D.R., Buterbaugh, G.G., Fuson, K.S. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. Ann. Neurol. 33:70-75, 1993.

22.- Kubek, M.J., Low, W.C., Sattin, A., Morzorati, S.L. Meyerhoff, J.L., and Larsen, S.H. Role of TRH in seizure modulation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 553:286, 1989.

23.- Kubek, M.J. and Sattin, A., Effect of electroconvulsive shock on the content of thyrotropin-releasing hormone in rat brain. Life Sci., 34:1149, 1984.

24.- Labiner, D., Butler, L., Cao, Z., Hosford, D., Shin, C., McNamara, J. Induction of c-fos mRNA by kindled seizures: complex relationship with neuronal burst firing. Journal Neurosci. 13:744-751, 1993.

25.- Lechan, R.M., Toni, R., Thyrotropin-Releasing Hormone Neuronal Systems in the Central Nervous System. Neuroendocrinology. C.V. Demeroff. C.R.C. Press. Boca Raton, 1992. pp 279-330.

25a.- Le Gal La Salle, G., Amygdaloid Kindling in the Rat: Regional Differences and General Properties. Kindling 2, edited by J:A: Wada. Raven Press, N.Y., 1981. pp 31-47

26.- Loscher, W., Horstermann, D., Honack, D., Rundfelt, C., Wahnschaffe, U. Transmitter amino acid levels in rat brain regions after amygdala-kindling of chronic electrode implantation without kindling: Evidence for a pro-kindling effect of prolonged electrode implantation. Neurochem. Res. 7:775-781, 1993.

27.- Lowry, O.H., Rosebough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193:265-275, 1951.

28.- Matsuura, S., Hirayama, K., and Murata, R. Enhancement of synaptic facilitation during the progression of kindling epilepsy by amygdala stimulations. J. Neurophysiol. 2:602-609, 1993.

29.- McNamara, J.O., Bonhaus, D., Crain, B., Gellman, R., Shin, Ch. An approach to elucidating the network of brain structures underlying kindling. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, New York, 1986, pp 125-137

30.- Méndez, M., Joseph-Bravo P., Cisneros, M., Vargas M.A., Charli, J.L. Regional distribution of "in vitro" release of TRH in the rat brain. Peptides. 8:291-298, 1987.

31.- Metcalf, G., Jackson, I.M.D. Thyrotropin releasing hormone: biomedical significance. Ann. N.Y. Acad. Sci. 553: 1-631, 1989.

32.- Meyerhoff, J.L., Bates, V.E., Kubek, M.J. Elevated TRH levels in pyriform cortex after partial and fully generalized kindled seizures. Brain Res. 525:144-148, 1990.

33.- Moneta, M.E., and Höllt. Perforant path kindling induces differential alterations in the mRNA levels coding for prodynorphin and proenkephalin in the rat hippocampus. Neurosci. Lett. 110:273-278, 1990.

34.- Mori, N., Fukatsu, T., Anticonvulsant effect of DN-1417, a derivative of thyrotropin-releasing hormone, and liposome-entrapped DN-1417, on amygdaloid-kindled rats. Epilepsia, 33(6):994-1000, 1992.

35.- Morris, B.J., Moneta, M.E., ten Bruggencate, G., and Höllt, V. Levels of prodynorphin mRNA in rat dentate gyrus are decreased during hippocampal kindling. Neurosci. Lett. 80:298-302, 1987.

36.- O'Connor B. and O'Cuinn G. Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. Eur. J. Biochem. 144: 271-278, 1984.

37.- Palkovits, M., Brownstein, M., Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier, Inc. N.Y. 1988.

38.-Parker, C.R., Neaves, W.B., Barnea A. and Porter J.C. Studies on the uptake of 3H-Thyrotropin Releasing Hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. Endocrinology 101: 66-75, 1977.

39.- Ponce G., Charli J.L., Pasten J.A., Aceves, C., Joseph-Bravo, P. Tissue specificity regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. Neuroendocrinology 48:211-213, 1988.

40.- Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32: 281-294, 1972.

41.- Racine, R.J., Burnham, W.M., Gilbert, M., Kairiss, E.W. Kindling Mechanisms: I. Electrophysiological Studies. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, New York, 1986 pp 263-282.

42.-Rekling, J., Interactions between thyrotropin-releasing hormone (TRH) and NMDA receptor mediated responses in hypoglossal motoneurons. Brain Research. 578:289-296, 1992.

43.- Represa, A., Niquet, J., Pollard, H., Moreau, J., Khrestchatisky, M., Ben-Ari, Y. Seizures induce molecular and morphological changes in rat brain. INSERM U29,123 Bd. Port Royal 75014 Paris (France).En preparación, 1993.

44.- Rosen, J. B., Abramowitz, J., Post, R., Colocalization of TRH mRNA and Fos-like immunoreactivity in limbic structures following amygdala kindling. Molecular and Cellular Neurosciences, 4:335-342, 1993.

45.- Sato, M., Kajita, S., Ogawa, N., Okamoto, M. W. Amygdaloid kindling and Thyrotropin-Releasing Hormone. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, New York, 1986, pp 319-332

46.- Sato, M., Morimoto, K., Akiyama, K., Okamoto, M. Kindling and excitatory amino acids. Kindling 4. Edited by J.A. Wada. Plenum Press, New York, 1990, pp 241-251

47.- Torres, H., Charli, J.L., González-Noriega, A., Vargas, M.A., and Joseph-Bravo P. Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. Neurochem. Int. 9:103-110,1986.

48.- Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Mendez, M., Covarrubias, L., Charli, J.L. Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats. Neuroendocrinology, 54:493-498, 1991.

49.- Vargas, M.A., Cisneros, M., Herrera, J., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. Regional Distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs. Peptides 13:255-260, 1992.

50.- Vargas, M.A., Herrera, J., Uribe, R.M., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. Devel. Brain Res. 66:251:256, 1992.

51.- Vargas M.A., Joseph-Bravo P., and Charli J.L. Thyrotropin-releasing hormone down regulates pyroglutamyl aminopeptidase II activity in adenohypophyseal cells. Enviado a Neuroendocrinology. 1994.

52.- Vargas, M., Méndez, M., Cisneros, M. Joseph-Bravo, P., Charli, J.L. Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading TRH in rat brain. Neurosci. Lett., 79:1476-1492, 1987.

53.- Vindrola, O., Briones, R., Asai, M and Fernández-Guardiola, A., Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. Neurosci. Lett., 21:39-43, 1981.

ABREVIATURAS

Ach acetilcolina.

DN-1417 Citrato de gamma-butirolactona-gamma-carbonil
L-histidil-L-prolinamida.

DII Descargas interictales.

ECS Choque electroconvulsivo.

EEG Electroencefalograma.

EPSP Potencial postsináptico excitatorio sencillo.

GABA Acido gamma amino butírico.

I.C.V. Intracerebroventricular.

LTP Potenciación a largo plazo.

NMDA N-metil-D-aspartato.

NPV Núcleo paraventricular.

PD Postdescarga.

PGA Piroglutamato aminopeptidasa.

PKC Proteínkinasa C

proTRH Péptido precursor del TRH biológicamente activo.

PTZ Pentilenetetrazol.

RIA Radioinmunoensayo.

SNC Sistema nervioso central.

UPD Umbral de la postdescarga.

T4 Tiroxina.

T3 Triyodotironina.

TRH Hormona liberadora de la tirotropina.

TRHr Receptor de TRH

TSH Tirotropina.

T3 Triyodotironina.

TRH Hormona liberadora de la tiotropina.

TRHr Receptor de TRH

TSH Tiotropina.