

11261

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

MODIFICACION DE LA INHIBICION RECURRENTE
POR LA ESTIMULACION ELECTRICA ITERATIVA
O POR LA ADMINISTRACION DE FARMACOS
CONVULSIONANTES.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS DE POSGRADO QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (AREA FISILOGIA) PRESENTA

Dr. Jorge Bravo Martínez

Asesor: Dr. Hugo Solís Ortíz



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA DE CONTENIDO

SINODALES iii

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTOS iv

TABLA DE CONTENIDO v

RESUMEN vii

1 INTRODUCCION 1

 1.1 EPILEPSIA 1

 1.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA 4

 1.2.1 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD POR ADMINISTRACION DE SUBSTANCIAS CONVULSIONANTES 4

 1.2.1.1 ESTRICNINA 5

 1.2.1.2 BICUCULINA 8

 1.2.1.3 PICROTOXINA 9

 1.2.1.4 PENICILINA 10

 1.2.2 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD MEDIANTE LA ESTIMULACION ELECTRICA 11

 1.2.2.1 KINDLING 11

 1.2.2.1.1 El Kindling Como Modelo de Epilepsia Humana 11

 1.2.2.1.2 Kindling y Neurotransmisores 19

 1.2.2.2 POTENCIACION A LARGO PLAZO (LTP) 28

 1.2.2.2.1 Definición 28

 1.2.2.2.2 Inducción de la LTP 31

 1.2.2.2.3 Mantenimiento de la LTP 37

 1.2.2.2.4 Activación de proto-oncogenes 39

 1.2.2.2.5 Citotoxicidad del calcio intracelular 41

 1.2.2.3 SIMILITUD ENTRE LA LTP Y EL KINDLING 42

 1.3 DESINHIBICION 44

 1.3.1 EQUILIBRIO ENTRE EXCITACION E INHIBICION 45

 1.3.2 LA DESINHIBICION COMO MECANISMO DE MODULACION NEURONAL 45

 1.3.3 CONSECUENCIAS DEL DESEQUILIBRIO ENTRE LA INHIBICION Y EXCITACION 47

 1.4 HIPOCAMPO 49

 1.4.1 CORTEZA ENTORRINAL Y LA VIA PERFORANTE 51

 1.4.2 GIRO DENTADO Y LAS FIBRAS MUSGOSAS 52

 1.4.3 CONEXIONES DE CA3 53

 1.4.4 OTRAS CONEXIONES INTRINSECAS 55

 1.5 HIPOTESIS 58

 1.6 OBJETIVOS 59

2	METODO	60
	2.1 KINDLING DE CORTEZA ENTORRINAL	60
	2.1.1 PREPARACION	60
	2.1.2 ESTIMULACION Y REGISTRO	62
	2.1.3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS	64
	2.2 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD POR SUBSTANCIAS ANTAGONISTAS AL GABA Y GLICINA	69
	2.2.1 PREPARACION	69
	2.2.2 ESTIMULACION Y REGISTRO	70
	2.2.3 ANALISIS	71
	2.3 VALORACION DE LOS CAMBIOS EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL MEDIANTE LA TECNICA DE MICROIONTOFORESIS	72
	2.3.1 PREPARACION	72
	2.3.2 REGISTRO E IONTOFORESIS	72
	2.3.3 ANALISIS	74
	2.4 CONTROL HISTOLOGICO	75
3	RESULTADOS	76
	3.1 KINDLING DE CORTEZA ENTORRINAL	76
	3.2 INDUCCION DE LA DESINHIBICION POR SUBSTANCIAS ANTAGONISTAS AL GABA Y GLICINA	84
	3.2.1 PENICILINA	86
	3.2.2 PICROTOXINA	91
	3.2.3 ESTRICNINA	91
	3.2.4 BICUCULINA	97
	3.3 VALORACION DE LOS CAMBIOS EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL MEDIANTE LA TECNICA DE MICROIONTOFORESIS	97
4	DISCUSION	105
5	CONCLUSIONES	113
	REFERENCIAS	116

1 INTRODUCCION

1.1 EPILEPSIA

Desde el punto de vista etimológico, la palabra epilepsia, deriva de una preposición y del verbo irregular griego, "epilambanein" que significa "ser sobrecogido bruscamente". Desde que el hombre se dió cuenta de este padecimiento, y más aún desde que empezó a estudiarlo a fondo, han surgido muchas definiciones de la epilepsia, muchas de ellas ambiguas que han provocado polémicas entre los diversos grupos de estudiosos. Dicha situación de ambigüedad provocó confusión no sólo en la comunidad científica sino, lo que es peor, en la población en general. Por esta razón, en 1973, la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud publicaron un diccionario de epilepsia ^{1,2} en el que se define a ésta como una **afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas.** Desde aquel momento, el criterio para identificar las crisis epilépticas se facilitó a nivel mundial y mejoró la comunicación entre los clínicos e investigadores.

La característica clínica más importante de la epilepsia es que se manifiesta de forma muy variada dependiendo del sitio primario que descarga. También es importante lo impredecible de su presentación y de su reaparición, así como la existencia de periodos asintomáticos que pueden durar minutos, días, meses o años. Hasta la fecha, a pesar de los adelantos tecnológicos, el análisis clínico de los pacientes y la descripción de las manifestaciones críticas e intercríticas de la epilepsia, siguen siendo los aspectos fundamentales en los que se basa el diagnóstico y tratamiento de las crisis epilépticas.

Desde el punto de vista epidemiológico, la magnitud del problema epiléptico se mide por su distribución y frecuencia de aparición, así como por las variaciones de éstas a lo largo del tiempo en diferentes condiciones geográficas y en diversos tipos de personas. El propósito de esta tesis no es hacer un estudio epidemiológico, sin embargo, conviene resaltar la magnitud del problema en México dando algunos datos. La incidencia, es decir los casos nuevos en la población general, es de 48 por cada 100 mil habitantes. La incidencia es mayor en los hombres que en las mujeres. Por grupo de edad es la siguiente: 76.8% antes de la adolescencia, 16.3% en adultos jóvenes, 5.2% en adultos, y 1.7% en ancianos. La prevalencia, es decir los casos ya existentes en la población general, es de 5.16 por cada mil habitantes y es mayor en los hombres que en las mujeres. Debido a los avances de la ciencia médica, la esperanza de vida es mayor y por lo mismo la prevalencia

de la epilepsia es mayor en la tercera y cuarta décadas de la vida con una ligera disminución en los ancianos. En cuanto a la posible etiología, el mayor porcentaje es dado por la neurocisticercosis con el 36%, causas perinatales (sobre todo durante el parto) tiene el 14%, trauma craneal 8%, enfermedad cerebrovascular 5%, tumor cerebral 4%, procesos infecciosos 3%, y el 30% restante por otras causas que no se describirán ^{3,4}.

Mucho es lo que se sabe actualmente sobre la epilepsia, sin embargo todavía falta mucho por conocer. Esta ignorancia no sólo en los médicos y científicos, sino también en la población en general, ha provocado que se acumulen a lo largo de todos estos siglos creencias erróneas, basadas en la superstición y los prejuicios, lo que tiene consecuencias psicológicas y sociales en los pacientes que sufren epilepsia.

Tanto la definición de la epilepsia como la clasificación de ésta son empíricas, y por lo tanto son el resultado de la observación clínica de los pacientes. El considerar a la epilepsia como un síndrome, es decir consecuencia de muchas causas, con mecanismos de acción muy diversos, refleja el desconocimiento de una teoría que explique el por qué todos estos mecanismos de acción inducen en el tejido cerebral normal un primer foco epiléptico. Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis acerca del mecanismo de la epileptogénesis, que propone que ocurre un proceso de desinhibición en el tejido neural, y por otro lado, en forma

independiente pero convergente, el establecimiento del fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP).

1.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

1.2.1 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD POR ADMINISTRACION DE SUBSTANCIAS CONVULSIONANTES

Desde tiempos de Jackson hasta la fecha, el estudio de las crisis convulsivas ha sido una forma de lograr el entendimiento cabal del funcionamiento del cerebro. Las drogas convulsivas han sido una herramienta más para entender cómo el cerebro genera los eventos eléctricos y conductuales de la crisis generalizadas. Se reporta frecuentemente, la posibilidad de modificar la acción de neurotransmisores en forma específica mediante drogas que tienen propiedades convulsivas cuyos efectos son dosis dependientes. Sin embargo, no todas las neuronas de las diferentes regiones del sistema nervioso se alteran de igual manera. La inyección de estas sustancias en forma sistémica, iontoforética, o al medio que rodea a la célula, puede resultar en una diferente acción farmacológica sobre el soma neuronal o sobre su campo dendrítico ⁵. Un gran número de estudios indican que la aplicación de convulsionantes directamente al medio en que se encuentran las neuronas tanto in vivo como in vitro, provoca un patrón de disparo neuronal conocido como despolarización paroxística (DP)^{6,7} (ver figura 1). Esta

respuesta neuronal es de considerable importancia ya que es similar al patrón observado en neuronas de focos epilépticos en el ser humano ^{8,9}.

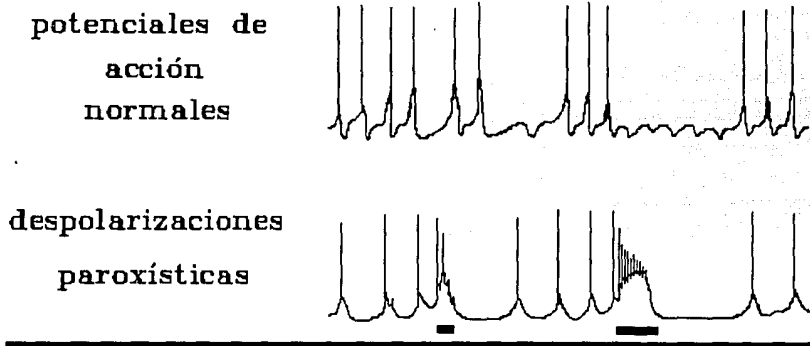


Figura 1. Registros intracelulares, de neuronas localizadas en el ganglio subesofágico de *Helix aspersa* (caracol de jardín). En el registro superior, se muestran potenciales de acción normales. En el inferior, se muestran las despolarizaciones paroxísticas (marcas), después de aplicar pentilentetrazol (.2 ml en una solución de 5 mg/ml) al medio de perfusión. Estos registros fueron obtenidos en nuestro laboratorio.

1.2.1.1 ESTRICNINA

La estricnina es el prototipo de muchos convulsionantes que antagonizan la acción de neurotransmisores inhibitorios. La inyección intravenosa (i.v.) produce inicialmente un estado preconvulsivo que se caracteriza por un patrón

electroencefalográfico compuesto por actividad rápida y de bajo voltaje ¹⁹⁸. Este patrón evoluciona a un estado convulsivo con la consecuente aparición de espigas interictales (espigas estricnínicas) frecuentemente de aparición variable, seguido por una depresión postictal. Durante este estado, la estricnina produce crisis espinales que constan de descargas regulares de 10-12 Hz en la parte baja del tallo cerebral y del cerebelo ¹⁰. Las descargas regulares inducidas por la aplicación i.v. de estricnina a gatos no anestesiados pueden ser bloqueadas por la sección de la médula espinal ¹¹. Esta actividad es precedida por una respuesta sensorial aumentada de las neuronas de la formación reticular mesencefálica (FR) ¹². Junto con el electroencefalograma de gran amplitud se registran ráfagas de potenciales de acción con frecuencia de 10 a 20 Hz. Eccles y colaboradores establecieron claramente que la estricnina ejerce sus efectos sobre la inhibición espinal ¹³. Además la estricnina produce la DP por la aplicación tópica en algunas especies animales ¹⁰. Se ha reportado que es un antagonista relativamente selectivo de la inhibición producida postsinápticamente por la glicina, ya que bloquea los receptores postsinápticos de glicina en algunas estructuras del SNC particularmente en la médula espinal ^{14,15} y en la FR ^{16,17,18,19,20}. También bloquea la inhibición provocada por la aplicación iontoforética de glicina de manera más eficiente que la provocada por la aplicación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) ^{199,200}. Por otra parte, en estudios de autoradiografía se ha

observado que la estricnina radioactiva se distribuye en regiones cerebrales de manera muy parecida a la distribución que tiene la glicina ^{21,22}. En un estudio electrofisiológico Tribbles y col.²³ observaron que la inyección i.v. de estricnina reduce gradualmente la amplitud del potencial inhibitorio postsináptico en un 25% o menos antes de que se produzcan las crisis ²³. Asimismo, Faber y Klee observaron en Aplysia, una disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP) por la aplicación de estricnina, y pensaron que esta disminución se debía al bloqueo de los canales de cloro ²⁰¹. Se ha observado también una disminución en el umbral de la corriente entrante, y una disminución de la corriente de potasio en neuronas de calamar, y Aplysia ^{24,25,26}. Se ha sugerido un modelo de receptor de glicina en el cual el sitio de unión de la estricnina está cerca del sitio activo de la glicina, y se ha postulado una interacción cooperativa entre ellos ²⁷. También se ha reportado que la estricnina en bajas concentraciones aumenta la acción de la acetilcolinesterasa in vitro, pero con altas concentraciones inhibe a esta enzima ²⁸. La estricnina bloquea, además, la acción de norepinefrina, serotonina (5-HT), y GABA ^{202,203}. Los efectos de la estricnina se pueden revertir mediante la aplicación iontoforética de GABA y glicina, así como con benzodiazepinas ²⁹.

1.2.1.2 BICUCULINA

La inyección i.v. de bicuculina produce crisis convulsivas generalizadas con una latencia de unos cuantos segundos. Las crisis se inician súbitamente y son de tipo tónico-clónico generalizado, con un patrón electroencefalográfico similar al inducido por el pentilentetrazol (PTZ) ³⁰. La bicuculina bloquea en forma más selectiva y específica la acción de GABA en los receptores GABA_A ²⁰⁴. Este efecto es mediado por la reducción de la tasa de activación de los canales al cloro. Se ha establecido que la relación del GABA con la bicuculina es competitiva, es decir, ambas sustancias tienen un mismo sitio en el receptor. En estudios más recientes se ha observado que los receptores GABA_B son insensibles a la acción de la bicuculina en dosis usuales ²⁰⁵ (0.4 mg/Kg). Con dosis mayores que la necesaria para bloquear el efecto del GABA, la bicuculina modifica la acción de otros neurotransmisores putativos como son la glicina, acetilcolina y 5-HT. La bicuculina afecta la inactivación de la corriente de potasio ²⁴ por un mecanismo que no involucra al GABA. También se ha reportado que la bicuculina bloquea la conductancia al potasio calcio dependiente.

1.2.1.3 PICROTOXINA

La picrotoxina es un estimulante del sistema nervioso central (SNC) y pertenece al grupo de los analépticos. Es un convulsionante típico y su acción farmacológica es parecida a la del pentilentetrazol. Es un antagonista específico que actúa directamente en el receptor del GABA_A. Produce crisis clónicas y tónico-clónicas generalizadas. Tiene la peculiaridad de tener una latencia mayor para la aparición de la crisis convulsiva que la del resto de los agentes convulsionantes. Se piensa que esta mayor latencia se debe a un proceso de biotransformación en el cual la picrotoxina se convierte en picrotoxinina o también puede deberse a la acción sobre una enzima ³¹. La picrotoxina reduce la tasa de activación de los canales activados por GABA_A y tiene efectos sobre la membrana celular, parecidos a los que producen las sustancias ya mencionadas. También bloquea la acción de la glicina, 5-HT y acetilcolina.

Debe considerarse que la picrotoxina tiene dos características importantes: 1) su potente acción convulsionante, y 2) su mecanismo de acción conocido. Estas características hacen a la picrotoxina bastante útil para realizar estudios en los que se trata de discernir la forma de participación del GABA en los diferentes mecanismos inhibitorios.

1.2.1.4 PENICILINA

La penicilina es un antibiótico ampliamente utilizado como agente epileptogénico. Se emplea frecuentemente en la investigación de la epilepsia por la facilidad con que produce crisis focales o generalizadas, ya sea por su aplicación tópica o sistémica, a diferentes animales de experimentación ²⁰⁶. El llamado foco penicilínico ha permitido analizar la actividad eléctrica neuronal mediante el registro extracelular e intracelular.

La inyección sistémica de penicilina produce crisis generalizadas con patrones conductual y electroencefalográfico diferentes al de las otras sustancias. Las sacudidas mioclónicas y los complejos espiga onda de 3 cps son muy parecidos a los que se observan en las crisis de ausencia del ser humano ²⁰⁶.

La aplicación tópica de penicilina es quizá el modelo que más se emplea para inducir el proceso epiléptico agudo. En 1945, Walker y Johnson fueron los primeros en reportar los efectos convulsionantes de la penicilina. En la corteza cerebral o en el hipocampo provoca la aparición de DPS ³². Las neuronas que presentan estas despolarizaciones, muestran además anormalidades morfológicas del árbol dendrítico ³². Se ha sugerido que la acción farmacológica de la penicilina, implica un bloqueo selectivo de la inhibición postsináptica inducida por el GABA ²⁰⁷. Asimismo, bloquea los cambios de conductancia al cloro en respuesta a la aplicación del GABA, acetilcolina, dopamina, o 5-HT, así como la liberación del

GABA.

1.2.2 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD MEDIANTE LA ESTIMULACION ELECTRICA

1.2.2.1 KINDLING

El término kindling lo introdujo Goddard ³³ para designar el desarrollo progresivo de manifestaciones epilépticas, conductuales y electroencefalográficas, que aparecen en los animales de experimentación, como respuesta a la aplicación de estímulos eléctricos iterativos subconvulsivos o subumbrales.

1.2.2.1.1 El Kindling Como Modelo de Epilepsia Humana

El objetivo principal de estudiar el fenómeno del kindling es obtener evidencias de los aspectos básicos de la epilepsia humana ³⁴. La importancia del kindling como modelo de epilepsia radica en que muestra similitudes muy significativas con la epilepsia humana, lo que indica que muy probablemente algunos mecanismos electrofisiológicos y bioquímicos sean comunes para ambos procesos ^{35,36,37}.

Los aspectos conductuales que se observan en el kindling, muestran similitudes con los observados en las crisis parciales complejas y en las crisis tónico-clónicas secundariamente

generalizadas en el ser humano. El registro electroencefalográfico obtenido durante las diferentes etapas del kindling, muestra una evolución y morfología muy similar al registro electroencefalográfico de pacientes con crisis parciales complejas con posible origen en el lóbulo temporal. Otra similitud es la presencia de espigas interictales en los animales con kindling ya establecido, similares a las espigas interictales que se observan en pacientes epilépticos ^{38,39} (ver tabla 1).

La evolución progresiva de los cambios de la excitabilidad que se observan en el kindling, es una de las características que guarda gran semejanza con la epilepsia humana. En estudios con pacientes epilépticos sin tratamiento anticonvulsivo, se ha descrito un desarrollo progresivo de la severidad de las convulsiones. Por el contrario, en la gran mayoría de los pacientes que reciben tratamiento antiepiléptico en etapas tempranas de la enfermedad, se atenúa la evolución progresiva en la severidad de las convulsiones. Otro hecho que refuerza la utilidad del kindling como modelo de epilepsia, es que muchos de los fármacos anticonvulsionantes utilizados en el tratamiento de la epilepsia, son también capaces de retardar el proceso del kindling y reducir la severidad de las convulsiones ^{40,37,41}.

Posiblemente la transición del estado interictal al estado ictal en pacientes epilépticos se debe a un evento, como puede ser la anoxia, que favorece la aparición de la crisis. En los animales en los cuales la estimulación eléctrica se continúa por periodos de

MODELO EXPERIMENTAL DEL KINDLING

Modelo	Análogo Clínico
Convulsión Generalizada	Crisis tónico-clónicas generalizadas.
Foco Cortical Agudo	Crisis Parciales Simples
Foco Amigdalino Agudo	Crisis Parciales Complejas
Descarga Generalizada de Focal (PD).	Descarga de origen focal, Secundariamente Generalizada.
Foco Epiléptico Crónico	Espigas Interictales en crisis Parciales Complejas.

Tabla 1 En esta tabla, se compara un modelo experimental de epilepsia como lo es el kindling, con la epilepsia humana.

tiempo prolongados, se pueden observar crisis convulsivas en forma espontánea, es decir, existen también en estos animales de experimentación, eventos que favorecen la aparición de las convulsiones ³⁹.

Ribak ⁴² demostró que muchas de las terminales axónicas de neuronas inhibitorias, las cuales forman sinapsis simétricas en el segmento inicial de axones de células piramidales, se pierden en

los focos epilépticos provocados por la crema de alúmina en la corteza cerebral de monos. En focos epilépticos de humanos, extirpados quirúrgicamente, es evidente la pérdida de neuronas y proliferación de células gliales ¹⁹². Se ha sugerido que estas alteraciones estructurales son una posible causa de la epileptogénesis. Esta hipótesis, por otro lado, esta aún en duda ya que no se ha encontrado tejido cicatricial en todos los focos epilépticos extirpados, y no todo tejido cicatricial induce un foco epiléptico ¹⁹².

Debido a estas similitudes, el kindling ha sido empleado para investigar algunos aspectos de la epilepsia. Por ejemplo ha servido para estudiar los mecanismos que inducen el fenómeno ictal, especialmente el proceso que provoca la descarga de neuronas en forma sincronizada ^{184,185}. Otro ejemplo es el estudio de la propagación de la actividad epiléptica a otras áreas del cerebro (transferencia). Ha sido usado también para examinar el curso temporal de los efectos bioquímicos y fisiológicos postictales, así como para dilucidar cambios plásticos a largo plazo que modifiquen el umbral convulsivo.

Los cambios conductuales que aparecen en el desarrollo del kindling amigdalino han sido clasificados por Racine para la rata ⁴³, y por Wada para el gato ⁴⁴ (ver tabla 2).

En esta clasificación, las etapas 1 y 2 son similares a las crisis parciales complejas humanas o crisis límbicas. En las etapas subsecuentes (3,4, y 5 para la rata), es similar a las crisis

**CLASIFICACION CONDUCTUAL EN EL
KINDLING**

Estadio	Gato	Rata
1	Sacudidas faciales ipsilaterales al sitio estimulado.	Movimiento de hocico y de la cara.
2	Sacudidas faciales bilaterales.	movs. oscilatorios de la cabeza (nodding).
3	Cabeceo, salivación y dilatación de la pupila.	Sacudidas clónicas de las patas anteriores.
4	Desviación de la cabeza con ext. tónica de la pata anterior contralateral al sitio de estimulación. El animal corre en círculos.	El animal se yergue y se sostiene con sus patas posteriores (erección).
5	Sacudidas mioclónicas gralizadas. Relajación de esfínteres.	Erección y caída al suelo. Crisis gralizadas. con pérdida del control de la postura.
6	Crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas.	

Tabla 2 En esta tabla se presenta la clasificación conductual del kindling en el gato y en la rata. Nótese que la evolución conductual de la rata está dividida en 5 etapas, mientras que en el gato se divide en 6.

motoras de tipo tónico-clónico generalizadas.

Durante el proceso del kindling las crisis evolucionan desde cambios conductuales imperceptibles hasta crisis tónico-clónicas generalizadas. El registro electroencefalográfico también muestra cambios graduales que se caracterizan por el aumento en la duración de la postdescarga (PD) y la aparición gradual de espigas interictales ⁴⁵ (ver figura 2). De esta forma evoluciona el fenómeno del kindling y alcanza su máximo desarrollo cuando el estímulo eléctrico (al cual no se le ha modificado su intensidad) desencadena una crisis convulsiva tónico-clónica generalizada ⁴⁶. A partir de este momento, cada estimulación provoca una crisis similar, y es cuando se considera que el animal tiene un cambio permanente en la excitabilidad neuronal. Este cambio en la excitabilidad neuronal se observa inclusive hasta meses después de haber dejado de aplicar estímulos eléctricos, ya que al reaplicar un estímulo eléctrico se desencadena una crisis tónico-clónica generalizada (tipo 5 estado conductual según la clasificación de Racine). Estos animales también se caracterizan por tener un bajo umbral a las crisis epilépticas. Este estado refleja una alteración a largo plazo que puede ser permanente e independiente de estimulaciones ulteriores ⁴³.

Las características del estímulo eléctrico son muy importantes para el desarrollo del kindling. El estímulo óptimo se caracteriza por ser un tren de pulsos eléctricos bifásicos cuadrados de un milisegundo cada uno, con duración de un segundo,

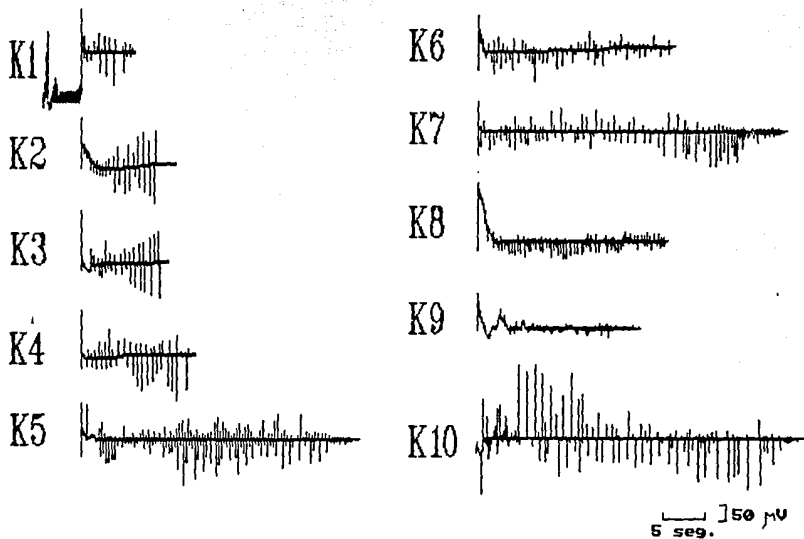


Figura 2 En esta figura se muestran los electrocorticogramas de la región sensoriomotora durante cada estimulación, en ratas sometidas al paradigma del kindling amigdalino el cual consiste en aplicar un tren de estímulos de 60 Hz, con una duración del pulso de 1 mseg. La duración del tren de estimulación fue de un segundo, aplicados cada hora. Nótese la evolución progresiva en la duración del patrón epileptiforme (postdescargas). Datos no publicados de Solís et. al.

y con frecuencia de 60 ciclos/seg. Frecuencias de 25 a 150 ciclos/seg son igualmente eficientes. En otros estudios se ha observado que estímulos con frecuencias menores (ejem. 10 ciclos/seg) no son eficientes. Sin embargo, en estudios más recientes se determinó que estimulaciones por periodos prolongados (60 segs), con alta intensidad y con baja frecuencia (menores de 0.8 ciclos/seg) pueden inducir cambios tipo kindling. El intervalo entre estímulos representa una variable muy importante. Estímulos (de pulsos de 1 mseg. a 60 Hz, durante 1 seg.) aplicados con intervalos de 15 minutos a 7 días pueden inducir el fenómeno. Cuando el intervalo de estimulación es de 15 a 30 minutos, se requiere de un mayor número de estimulaciones para provocar los cambios conductuales y electrofisiológicos del kindling.

Para obtener el cambio de excitabilidad permanente, el estímulo eléctrico debe provocar una postdescarga local. Sin embargo, estímulos subumbrales para la postdescarga disminuyen el umbral convulsivo ¹⁸⁸.

El kindling puede ser provocado en varias estructuras cerebrales. La sensibilidad de cada estructura se puede establecer jerárquicamente con el siguiente orden (de mayor a menor sensibilidad): amígdala, globus pallidus, corteza piriforme, área olfatoria, neocorteza anterior, corteza entorrinal, bulbo olfatorio, área septal, área preóptica, putamen y caudado, e hipocampo ⁴³. El número de estimulaciones requeridas para inducir el kindling, es en parte, dependiente de la estructura anatómica

que se va a estimular. Por ejemplo, en la amígdala se requieren 10 estimulaciones, en tanto que en el hipocampo, se requieren 20 a 30 estimulaciones por ser menos sensible ⁴³.

El kindling se induce en una gran variedad de especies animales tales como: rana, ratón, rata, conejo, gato, perro, mono rhesus y babuino. El cerebro humano no debería ser la excepción y probablemente también posee potencial para el kindling. El desarrollo de éste, es más lento cuando la ubicación de la especie es más alta en la escala filogenética, por lo que el kindling en seres humanos sería el más lento en desarrollarse ¹⁸⁹.

1.2.2.1.2 Kindling y Neurotransmisores

Existe amplia evidencia de la participación de diferentes neurotransmisores en el desarrollo y establecimiento del kindling en diferentes especies animales. A continuación se describen algunos de estos neurotransmisores y su modificación en el kindling.

1.2.2.1.2.1 Acetilcolina

La acetilcolina es un neurotransmisor putativo en el cerebro de mamíferos con un efecto principalmente excitatorio. Existe evidencia experimental que sugiere la participación del sistema

colinérgico en las convulsiones. Por ejemplo, la inyección de agonistas colinérgicos en estructuras del sistema límbico con intervalos de 48 horas, produce un aumento de la intensidad de las convulsiones, en forma similar a la que produce la estimulación eléctrica ^{47,48}. Es probable que este efecto en la excitabilidad neuronal se deba a modificaciones en la sensibilidad del receptor muscarínico. Asimismo, en animales con kindling ya establecido, se observa un aumento de la sensibilidad a la acción excitadora de la acetilcolina a largo plazo. Sin embargo, la permanencia de este aumento en la sensibilidad neuronal no se ha determinado ni se sabe si existe una relación temporal entre el desarrollo del kindling y el desarrollo de la hipersensibilidad ⁴⁹.

Estos estudios sugieren que el sistema colinérgico puede estar involucrado en la propagación de la crisis. Pero parece ser que no tiene un papel esencial en el desarrollo del kindling o en la expresión de las crisis, debido a que la aplicación sistémica de antagonistas muscarínicos tales como la atropina, sólo provoca que se requiera de un número mayor de estimulaciones para inducir el kindling ^{49,50}. La aplicación de paratión, que es un inhibidor de la colinesterasa, no modifica el establecimiento del kindling.

1.2.2.1.2.2 Aminas Biogénicas

Los sistemas catecolaminérgicos e indolaminérgicos, están compuestos de grupos neuronales cuyos axones se ramifican

ampliamente. Estos axones proyectan a un gran número de áreas cerebrales, incluyendo gran parte del sistema límbico. Evidencias electrofisiológicas sugieren que ambos sistemas son inhibitorios para una gran cantidad de estas áreas ^{51,52,53}. Además de esta influencia inhibitoria, las aminas biogénicas pueden modular la respuesta de otros neurotransmisores.

La depleción de la norepinefrina (NE) facilita dramáticamente el desarrollo del kindling amigdalino. La inyección de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), intraventricular o en los núcleos noradrenérgicos, acelera el proceso del kindling ⁵⁴, ya que los animales así tratados alcanzan el estado 5, según la clasificación para la rata, con la mitad de estimulaciones que se requieren en animales no tratados para llegar a las crisis convulsivas generalizadas. Es probable que este cambio en el establecimiento del kindling se deba a que la concentración central de NE disminuye de 10 a 20% con respecto a los valores control.

Independientemente de la vía de aplicación de la 6-OHDA, se requiere que la concentración central de NE disminuya en un 50% para observar facilitación en el desarrollo del kindling ⁵⁰. Si la disminución de la NE central es mayor, mayor será el grado de facilitación ^{55,56}. Asimismo, la depleción de NE facilita el kindling sin importar el sitio en donde se origina la crisis. Las crisis inducidas en animales con depleción de NE, son similares a las que muestran los animales en los cuales se provocó el kindling

únicamente mediante estimulación eléctrica.

La manipulación farmacológica del sistema dopaminérgico, no modifica el desarrollo del kindling. Por ejemplo, la aplicación de 6-OHDA a ratas pretratadas con desmetilimipramina no modifica el establecimiento del kindling ⁵⁵. Por otro lado, el pretratamiento diario con dosis altas de antagonistas de receptores dopaminérgicos, tales como el haloperidol o pimozide (<0.5-10.0 mg/Kg), no alteran el desarrollo del kindling ^{57,58}. La aplicación de agonistas dopaminérgicos tales como la apomorfina o bromocriptina ^{59,60}, no cambia el número de estimulaciones requeridas para provocar crisis generalizadas. Lo anterior indica que en efecto, la disminución de la neurotransmisión dopaminérgica no influye importantemente sobre el desarrollo del kindling.

Con respecto al sistema serotoninérgico, la evidencia experimental hasta ahora obtenida indica que su modificación no altera las características de desarrollo del kindling. La lesión electrolítica del núcleo del rafé medio, ⁶¹ (lo cual reduce el contenido de serotonina (5-HT) en un 25 a 40%); la destrucción neuronal por la inyección intraventricular de la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina ⁶²; o la depleción de 5-HT con el inhibidor de su síntesis (la p-clorofenilalanina (PCPA)), aplicados previamente al inicio del kindling, no modifican el número de estimulaciones requeridas para llegar a una crisis generalizada ⁶³.

1.2.2.1.2.3 Péptidos Opioides

Los péptidos opioides endógenos están presentes en neuronas de muchos núcleos del sistema límbico y de los ganglios basales, como son: núcleo acumbens, caudado, putamen, substancia negra, amígdala, hipocampo, corteza piriforme y corteza entorrinal ⁶⁴. Los niveles de met- y leu-encefalina se incrementan en un 40% en ambos hemisferios cerebrales 28 hrs. después de la última crisis ⁶⁵. La elevación de leu-encefalina durante el proceso del kindling inicia primero en el hemisferio estimulado y después se generaliza. La met-encefalina no se altera hasta que el animal presenta por lo menos cinco crisis generalizadas ⁶⁶. En un estudio reciente se observó un aumento progresivo de la leu-encefalina inmunoreactiva durante el curso del kindling ⁶⁷. En conejos con kindling ya establecido, hay un aumento en la inmunoreactividad de la dinorfina A 1-13 en el hipocampo y un pequeño incremento de la alfa-neoendorfina y leu-encefalina, pero no para la beta endorfina 24 hrs después de la última crisis. En contraste, en el hipocampo de rata, los niveles de dinorfina A1-8 disminuyen 24 hrs después de la última crisis. Como muchas de las estructuras que contienen estos péptidos se han visto involucradas en el kindling surge la pregunta: ¿cómo se afectaría el desarrollo del kindling, por la aplicación de opiáceos endógenos? En muchos experimentos se ha demostrado que estos opioides tienen efectos pro o anticonvulsivos

dependiendo de la dosis usada ⁶⁸.

Existe evidencia de que la inyección sistémica de morfina, modifica la expresión conductual de las crisis en el kindling al disminuir el componente clónico, sin afectar la duración de la postdescarga ⁶⁹. Los posibles cambios en los receptores delta y epsilon no se conocen aún. Por otro lado, hay poca evidencia sobre la participación de los receptores kappa y sigma ⁶⁹.

Al parecer los opioides endógenos, se liberan durante las crisis y son los responsables de los eventos postictales ⁶⁹. La morfina, un agonista μ con poco o nulo efecto en el desarrollo y expresión del kindling, exacerba las espigas interictales espontáneas y la depresión conductual postictal. Estos efectos son revertidos por la naloxona ⁷⁰.

1.2.2.1.2.4 Acido gamma-amino-butirico (GABA)

El GABA es probablemente el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro de mamíferos. Las benzodiazepinas son potentes anticonvulsivos que ejercen sus efectos, por lo menos en parte, a través de la interacción con el receptor GABA_A en el sitio de unión de las benzodiazepinas ^{70,71}. Este sitio de unión está dentro de un complejo macromolecular que también incluye al canal del ion cloro. Este complejo también contiene al receptor de los barbitúricos. Tanto las benzodiazepinas como los barbitúricos, facilitan la apertura del canal a cloro ¹⁹⁶ (ver figura 3). Se ha

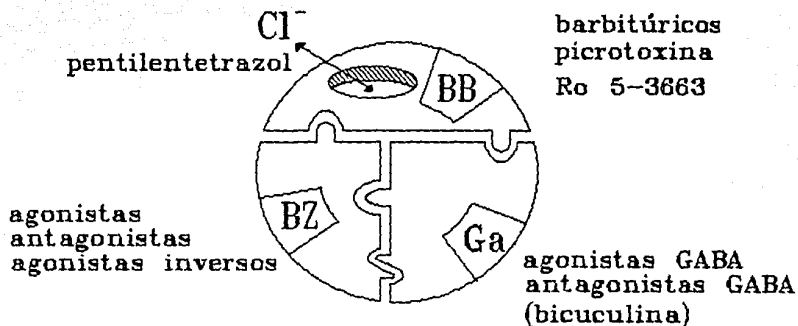


Figura 3 Modelo del complejo receptor GABA-a. Cada proteína tiene un sitio de unión para benzodiazepinas, GABA y barbitúricos, con sus respectivos agonistas y antagonistas. La activación del receptor de GABA resulta en la apertura del canal de cloro. Modificado de Polc ¹⁹⁶.

generado mucho interés por el sistema GABAérgico durante el fenómeno del kindling, debido a que su alteración participa importantemente para que dicho fenómeno se manifieste.

El receptor GABAérgico tipo A puede ser manipulado farmacológicamente de varias maneras. Por ejemplo, la aplicación de benzodiazepinas o barbitúricos modifica la actividad del receptor comportándose como agonistas sinérgicos ⁷². Además, se puede actuar sobre el receptor con agonistas específicos del receptor GABAérgico; o aumentando el GABA disponible por la inhibición de la

enzima que lo degrada, la GABAtransaminasa.

Las benzodiazepinas como el pentobarbital, hacen más lento el desarrollo del kindling ^{73,74,75} de manera reversible por la acción de un antagonista al sitio de benzodiazepinas del receptor GABA_A, como lo es el CGS 8216. Lo anterior indica que la acción de las benzodiazepinas y del pentobarbital es sobre el receptor de benzodiazepinas que como hemos mencionado forma parte del complejo receptor del GABA_A. El uso de una dosis alta de gamma-vinil GABA (GVG), el cual es un supresor de la GABAtransaminasa, retarda el establecimiento del kindling ⁷⁶. También el tratamiento con progabide sistémico, el cual es un agonista del receptor a GABA_A, suprime por completo las crisis inducidas en el kindling.

1.2.2.1.2.5 Aminoácidos excitatorios

Los aminoácidos, principalmente L-glutamato y L-aspartato, son los neurotransmisores excitatorios más abundantes en el SNC de los mamíferos ⁷⁷. La acción de éstos es mediada por cuatro sistemas de receptores: el de NMDA, el de kainato (K) y el de quisqualato (Q), que están definidos por la acción de su agonista selectivo. El cuarto, está definido por la acción de un antagonista, el ácido L-2-aminofosfonobutírico (L-AP4).

El hecho de que los antagonistas de NMDA no sólo bloquean la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), sino que también son potentes anticonvulsivantes ¹⁹⁰, ha reforzado la idea de que la

LTP y el kindling tienen mecanismos muy similares, o posiblemente iguales. El mecanismo de activación de los receptores NMDA sugiere una explicación potencial para dicha idea. En primer lugar, una reducción en la inhibición sináptica asociada con el foco epiléptico, aumenta la contribución de los receptores NMDA a la transmisión sináptica excitatoria ⁷⁸, por lo tanto, se acentúa el desequilibrio entre la excitación y la inhibición. En segundo lugar, la descarga iterativa en la actividad convulsiva provee las condiciones necesarias para la activación de los receptores NMDA en las regiones blanco ⁷⁹, aun en la presencia de inhibición sináptica funcional. De esta manera contribuye a la diseminación de la actividad convulsiva a través del tejido normal. En tercer lugar, la actividad epileptiforme puede por sí misma resultar en LTP, promoviendo de esta forma, la transmisión de la actividad epiléptica. Esta última característica, es el posible mecanismo por el cual las estimulaciones eléctricas a altas frecuencias, aplicadas a intervalos regulares de días o semanas, inducen eventualmente actividad convulsiva (kindling). En este contexto, es interesante el hecho de que se puede prevenir el kindling agudo, aplicando dosis de ácido fosfonoaléxico (APV) que también previene la inducción de la LTP ¹⁹¹. Sin embargo, debe recordarse que aun cuando los receptores NMDA están involucrados en la inducción de la LTP y el kindling, y que contribuyen a la epileptogénesis, no son responsables del mantenimiento de la LTP y posiblemente del

kindling.

Se ha encontrado que el kindling está asociado a un aumento en la transmisión sináptica así como a un aumento en la excitabilidad celular similar a la observada para la LTP ⁸¹. Más aún, algunos autores postulan que la LTP es el mecanismo básico del kindling ⁸⁰. Por lo tanto el investigar los mecanismos subyacentes a la LTP puede darnos información sobre el fenómeno kindling y sobre la epilepsia humana.

1.2.2.2 POTENCIACION A LARGO PLAZO (LTP)

En 1973, Bliss et al ^{82,83} describieron un cambio de larga duración en la transmisión en un circuito monosináptica. A este cambio le llamaron potenciación a largo plazo (long term potentiation, LTP). Estos trabajos realizados en el hipocampo de conejo ^{81,82} fueron de gran interés, ya que demostraron por primera vez una alteración neurofisiológica a largo plazo en el cerebro de mamíferos, y la posibilidad de que en este fenómeno podía subyacer el mecanismo de la memoria.

1.2.2.2.1 Definición

La LTP se define como un aumento estable, rápido y persistente, de la magnitud en la respuesta postsináptica provocada por la estimulación tetánica de una vía aferente. Por rápido,

entendemos que las modificaciones pueden ser inducidas por un estímulo muy breve (décimas de milisegundo) de la aferencia a la estructura. Por persistente, un curso temporal prolongado (hasta meses), en donde el fenómeno se mantiene estable. En otras palabras, la LTP es un aumento en la eficacia sináptica como resultado de la estimulación tetanizante de una fibra aferente a la estructura analizada. Este aumento puede perdurar hasta meses sin que se deteriore la respuesta. En la descripción original de la LTP en conejos intactos, se indica que se puede observar el fenómeno tres días después de la estimulación tetánica y demuestra también, que la duración puede aumentar considerablemente si se repite el estímulo tetanizante.

A la LTP también se le conoce como "long term enhancement" (LTE) y "long-lasting potentiation" (LLP). Otras formas de LTP en la transmisión sináptica previamente descritas son: facilitación, incremento y potenciación post-tetánica. Esta última, es la más persistente, puede durar hasta 10 minutos después de una estimulación.

En estudios neurofisiológicos en los que se llevaron a cabo registros intracelulares, el incremento sináptico se mide por el aumento en la amplitud del potencial postsináptico excitatorio (EPSP), o de la corriente postsináptica excitatoria, que aparece después de estimular con un solo pulso ¹⁰¹. En estudios con registros extracelulares, el cambio se mide por el aumento en la

amplitud de algunos componentes del potencial de campo que se produce al estimular la vía aferente. Los registros extracelulares hasta ahora realizados (potenciales de campo), sugieren que la LTP puede permanecer estable durante semanas y posiblemente meses ¹⁹³.

El estudio de otros circuitos monosinápticos sugiere que la LTP existe en: la proyección de la corteza entorrinal al giro dentado ^{83,84}; en las proyecciones septales (de Schaffer) hacia CA1 ⁸⁵; y en la proyección de la vía perforante hacia CA1 ⁸⁶. Estudios más recientes han demostrado la existencia de LTP en otras estructuras aparte del hipocampo como: subiculum y septum ⁸⁶; en el cuerpo geniculado medial ⁸⁷; en la corteza estriada ⁸⁸; en la corteza somatosensorial ⁸⁹; en la corteza entorrinal después de estimular la amígdala ⁸⁶ y en la corteza piriforme después de estimular el bulbo olfatorio ⁹⁰. También se ha encontrado LTP en el sistema muscarínico de los ganglios del sistema nervioso autónomo, así como en el sistema nicotínico del ganglio cervical superior de la rata ⁹¹.

Todas estas estructuras fueron analizadas en mamíferos como la rata, conejo y gato. La LTP también se ha encontrado en otros grupos de vertebrados, por ejemplo, en la aferencia colinérgica retiniana del pez dorado ⁹² y en la corteza de la lagartija ⁹³. Sin embargo, la LTP no está limitada a los vertebrados, ya que se ha demostrado ⁹⁴ en la Aplysia.

Desde un punto de vista ontogénico la LTP aparece en el hipocampo de ratón, a partir de los días 7 y 10 postnatales, para

el área CA1^{95,96} y entre los días 7 y 28 postnatales para el giro dentado^{97,98}.

Para entender los mecanismos de la LTP debe considerarse por un lado, una fase de inducción, que implica la secuencia inicial de eventos que disparan el proceso. Por otro lado, debe considerarse la fase de mantenimiento, es decir, aquellos factores que gobiernan la expresión de los efectos^{99,100,101}. El estudio de cada uno de estos aspectos y la forma en que interactúan, seguramente proporcionará una mayor comprensión del fenómeno de LTP.

1.2.2.2.2 Inducción de la LTP

La inducción de la LTP se inicia con la estimulación tetánica de las fibras aferentes. Dependiendo de la intensidad, frecuencia y el patrón de activación de las fibras aferentes, se puede establecer en forma gradual o bien en forma de todo o nada. Con estimulaciones de mayor intensidad o mayor frecuencia, la LTP alcanza su máximo con uno o varios estímulos.

La LTP se puede inducir, con un rango amplio de frecuencias de estimulación (desde 0.2 hasta 400 Hz). Usualmente se utilizan de 100 a 200 pulsos por segundo. Con bajas frecuencias de estimulación (menores de 50 Hz), se puede presentar una depresión al terminar el estímulo¹⁹⁴. Esta respuesta puede deberse a que las frecuencias bajas, tienen mayor eficacia en activar las interneuronas

inhibitorias. Por el contrario, con altas frecuencias (entre 100 y 400 Hz), es poco probable que se observe esta respuesta. A menudo se estimula con un tren de pulsos breve (8 a 10) de 400 Hz repetido cada 10 segundos o cada minuto. Con esta manera de estimular se produce de manera eficiente la LTP y se evita la aparición de post-descargas, que en ocasiones se provocan con trenes de estimulación prolongados.

En algunos sistemas sinápticos es importante considerar la intensidad del estímulo eléctrico aplicado, ya que el estímulo con baja intensidad, no es suficiente para inducir la LTP. Existen varias formas de interpretar el efecto que tiene la intensidad del estímulo sobre la LTP. Una de ellas es que la inducción de la LTP depende de la magnitud de la respuesta postsináptica. Es decir que si la intensidad del estímulo provoca una respuesta postsináptica grande, se establecerá la LTP. Por otro lado, el umbral para el establecimiento de la LTP está muy cerca del umbral para inducir la descarga de los somas neuronales ¹⁰², la cual, no es indispensable para que se establezca la LTP. Más bien deben coactivarse un mínimo de fibras aferentes o contactos sinápticos. Una evidencia de esto es lo que se observa en el paradigma de la LTP de tipo asociativo, en donde un estímulo de alta frecuencia (tetanizante) no es suficiente para inducir la LTP, sino que ésta depende de la intensidad de la respuesta postsináptica. La intensidad de la respuesta postsináptica depende del número de aferencias activadas por el estímulo. De acuerdo con esta interpretación, la

CARACTERISTICAS DE LA LTP

- 1) La inducción de las modificaciones es rápida.
- 2) La potenciación en la actividad sináptica es persistente.
- 3) Las modificaciones en una aferencia sináptica, pueden ser controladas condicionalmente, por sumación temporal con la actividad de otra aferencia a la misma región.
- 4) La potenciación asociativa parece ser específica en aquellas sinapsis que están activas en el momento oportuno.

Tabla 3 En esta tabla, se muestran algunas de las características más importantes y representativas de la potenciación a largo plazo (LTP).

estimulación tetanizante de un pequeño número de aferencias, no es eficiente para inducir la LTP debido a que estas aferencias en conjunto producen un respuesta postsináptica pequeña. Por otro lado, la estimulación tetanizante de un número mayor de aferencias sí es efectiva en provocar la LTP, debido a que se produce una respuesta postsináptica intensa ¹⁰⁴.

La LTP asociativa, se refiere a un tipo particular de interacción entre aferencias cuando son estimuladas en forma separada e independiente. Una de estas aferencias ejerce fuerte

influencia sináptica sobre cierta estructura neural, y la otra aferencia ejerce a su vez una débil influencia sináptica sobre la misma estructura. A través de estas aferencias débiles, se puede inducir LTP en menor tiempo si son estimuladas de manera simultánea y por el mismo tiempo las aferencias con fuerte influencia sináptica. Esta coactivación no producirá LTP si la estimulación es en forma separada, o por periodos de tiempo distintos, o bien si se estimula a un solo tipo de aferencia. Se ha demostrado que las sinapsis del hipocampo poseen propiedades no lineales, por lo que la resultante en la respuesta de estas sinapsis muestra que la magnitud de la LTP es mayor que la suma de los efectos provocados por la estimulación por separado de cada una de las aferencias ¹⁰⁴ (ver tabla 3).

Este fenómeno de coactivación sugiere un mecanismo integrador capaz de generar eventos neuronales que controlan la presencia y magnitud de la LTP. Indicaría también que el cambio neuronal responsable de la LTP puede estar ocurriendo en la postsinapsis. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de un mecanismo presináptico.

En las sinapsis la despolarización postsináptica desencadena la inducción de la LTP ¹⁰³. Estas respuestas son mediadas por los receptores de glutamato del tipo NMDA, y por lo tanto se piensa que el glutamato es el neurotransmisor en estas sinapsis ^{104,105}. Como evidencia experimental de lo anterior está el hecho de que los antagonistas del receptor NMDA, como el DL-2-amino-5-

fosfonopentanoato (AP5), bloquea la inducción de la LTP, pero no altera la expresión de la LTP una vez que ya se ha establecido ^{105,106}. La entrada de calcio a la célula, a través de los canales voltaje dependientes o sensibles a neurotransmisor que están asociados a los receptores de NMDA, sugiere una explicación atractiva para el mecanismo de la LTP ^{106,107}.

El complejo ionóforo-receptor debe presentar dos cambios para aumentar la permeabilidad al calcio. El primero, consiste en que la membrana debe despolarizarse por acción del glutamato sobre receptores quisqualato y kainato lo que trae como consecuencia que el canal asociado libere el magnesio que lo bloquea ^{107,108}. Esto ocurre a voltajes cercanos al potencial de reposo. El segundo, se presenta cuando el magnesio abandona el canal, el glutamato se une al receptor NMDA y provoca que los canales asociados se abran permitiendo el paso del calcio.

La estimulación de las aferencias débiles (D) causa la liberación presináptica de glutamato, pero no provoca una suficiente despolarización de la membrana postsináptica para liberar el bloqueo mediado por magnesio. Una despolarización insuficiente impide la inducción de la LTP, a menos que la estimulación se acompañe de una despolarización postsináptica intensa, producida por una aferencia fuerte (F) ^{108,104,109} (ver figura 4).

En resumen, las condiciones para que el ionóforo-receptor NMDA

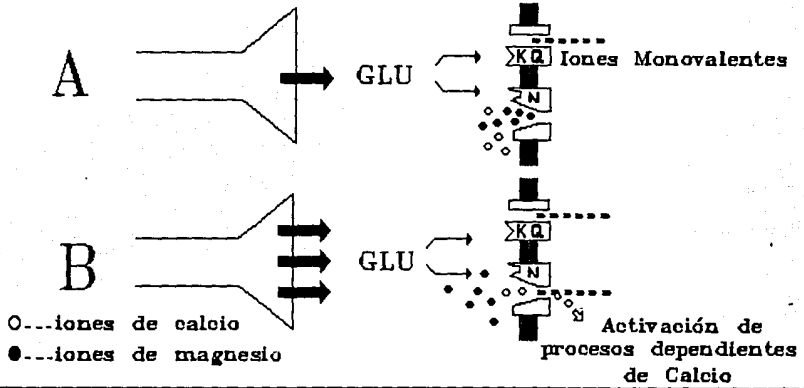
Terminal
PresinápticaMembrana
Postsináptica

Figura 4 Mecanismo de iniciación de la LTP. (A) El neurotransmisor (glutamato) liberado durante la estimulación de baja frecuencia, actúa sobre los receptores de Kainato y/o quisqualato (KQ) y sobre el NMDA (N). Sin embargo, el receptor de NMDA está bloqueado por los iones de magnesio extracelular (círculos llenos). Como consecuencia, la respuesta sináptica excitatoria es mediada predominantemente por cationes monovalentes (flechas) que cruzan a través del canal KQ. (B) Durante la estimulación tetánica, se reduce el bloqueo de los canales N por el magnesio debido a la despolarización. Esto permite que los cationes monovalentes crucen a través de los canales N y contribuyan al potencial sináptico. Los iones de calcio (círculos abiertos) también cruzan activando mecanismos bioquímicos involucrados en los cambios plásticos de la LTP.

Figura modificada de Collingridge¹⁰⁵

se abra, son: la ocupación del receptor por un agonista y una fuerte despolarización de la membrana postsináptica. Estas condiciones dan una explicación para tres características

importantes de la LTP, que son: la especificidad (la restricción de la LTP por la activación de determinadas vías); la cooperatividad y asociatividad (la coactivación de aferencias débiles y fuertes para alcanzar el umbral de intensidad suficiente para la inducción de la LTP). La especificidad se podría explicar por la ocupación del receptor NMDA por agonistas; y la cooperatividad y asociatividad, por la necesidad de una despolarización intensa que remueva al magnesio del canal.

La entrada de calcio a la célula a través del canal de calcio asociado al receptor NMDA tiene varios efectos sobre los procesos intracelulares dependiendo de la magnitud del influjo. Si esta entrada no es masiva, se inducen cambios intracelulares que promueven la fase de mantenimiento de la LTP y también la activación de segmentos del genoma celular, los cuales inducen la formación de un número mayor de contactos sinápticos ¹⁹⁵. Si la entrada de calcio es masiva, ocurre lesión y daño celular ²⁰⁸.

1.2.2.2.3 Mantenimiento de la LTP

La hipótesis de trabajo compartida por muchos grupos de investigación, y que ha dado pistas sobre los eventos enzimáticos que pueden controlar el mantenimiento de la LTP, es la que sugiere que el calcio sirve como segundo mensajero o cofactor para disparar la translocación o activación de enzimas ^{110,111,112}. Una

extensión de esta idea, es que la proteincinasa dependiente de calcio juega un papel esencial en el mecanismo de la LTP ¹¹³. La activación de ciertas proteincinasas, incluyendo a la proteincinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CamKII) y a la proteincinasa dependiente de Ca^{2+} -fosfolípido (PKC), requiere de concentraciones críticas de calcio y de la unión del ligando (calmodulina o lípidos) a la enzima. Estas proteincinasas pueden actuar como activadores independientes ya que no requieren ni de calcio ni de un ligando para llevar a cabo su actividad catalítica ¹¹⁴.

La evidencia farmacológica sobre el papel que juegan estas enzimas en la fase de mantenimiento de la LTP, es el efecto de la esfingosina (SPH), la cual bloquea la activación de PKC y CamKII y evita la unión de su ligando ¹¹⁵. La aplicación de SPH antes de la LTP, bloquea su expresión, no así cuando ya se estableció. Si en efecto, la LTP se mantiene por la actividad continua de una proteincinasa, entonces el bloqueo de la actividad catalítica de esta enzima, debería suprimir la expresión de la LTP. Se ha sugerido que las enzimas CamKII y PKC participan en la LTP. Y se ha demostrado que la inhibición de la actividad catalítica de estas enzimas por la aplicación de H-7 (inhibidor de la proteincinasa C y AMPc Num. cat. de RBI H-121)²⁰⁹ bloquea la expresión de la LTP ¹¹³.

La expresión de la LTP involucra a final de cuentas un aumento en la conductancia postsináptica. Hay tres explicaciones plausibles para este aumento en la conductancia postsináptica: a) un aumento en la liberación de neurotransmisor ¹⁰⁰; b) un aumento en la

sensibilidad de la membrana postsináptica al neurotransmisor liberado ¹¹⁴; c) un decremento en las resistencias en serie de las espinas dendríticas.

El que la LTP se mantenga por mecanismos presinápticos o postsinápticos, es controvertido. Hay evidencias que señalan que en la LTP, se involucran modificaciones presinápticas que aumentan la liberación de neurotransmisor, así como modificaciones postsinápticas que aparecen a distintos tiempos ¹¹⁴. Las modificaciones presinápticas aparecen en forma más temprana, manteniendo los estadios primarios de la LTP, ya que la LTP se establece en 30 segs. En cambio las modificaciones postsinápticas aparecen después, permitiendo los estadios posteriores, ya que los cambios en la sensibilidad de los receptores al neurotransmisor no es detectada sino después de 15 min (ver figura 5).

1.2.2.2.4 Activación de proto-oncogenes

En varios modelos de epilepsia como son el kindling de hipocampo ^{116,117,118} y la aplicación de pentilentetrazol o ácido kainico en el hipocampo ^{119,120,121}, se ha visto que los grupos neuronales involucrados en el fenómeno paroxístico, forman nuevos contactos sinápticos (fenómeno de sprouting). En las ratas estimuladas eléctricamente, las fibras musgosas forman una banda en la capa supragranular de la fascia dentada ^{122,123} y la capa

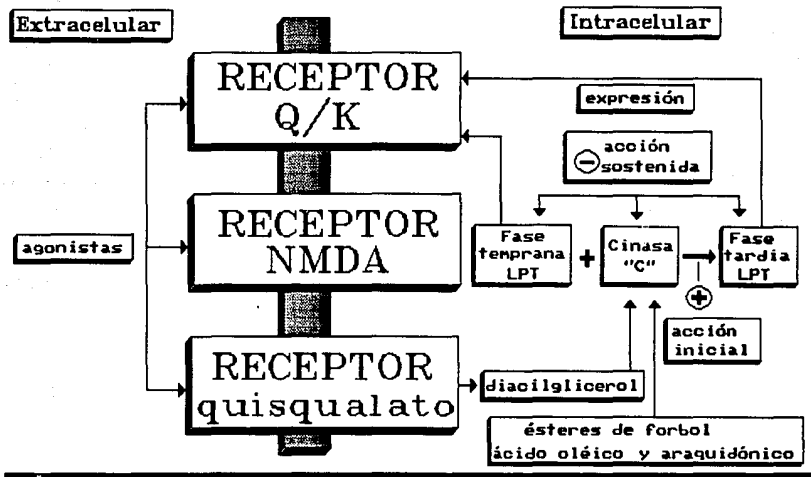


Figura 5 Posibles mecanismos de la expresión y mantenimiento de la LTP. El receptor QK, induce el primer potencial postsináptico excitatorio y este facilita la activación del receptor NMDA. Estos eventos dan inicio a la fase temprana de la LTP. La fase tardía de la LTP se produce sólo si ya se inició la fase temprana. Quizá la activación de otros receptores como el de quisqualato metabotrópico, inducen la hidrólisis del fosfatidilinositol y la activación de proteincinasas C dependiente de calcio, induce también la fase tardía de la LTP. Figura modificada de Anwyl, *Tips*, 10:236-239, 1989.

infrapirramidal de CA3. Estas ramificaciones se observaron con el microscopio electrónico y se corroboró que las fibras musgosas formaron contactos sinápticos aberrantes con dendritas de células granulosas ¹²⁴.

Por otro lado, estas ramificaciones también se han

comprobado en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal^{124,125,126}, el análisis ultraestructural de las piezas de necropsia, sugiere que los depósitos supragranulares de Timm (de zinc) corresponden a terminales de fibras musgosas.

El mecanismo para la formación de estos nuevos contactos sinápticos involucra posiblemente la entrada de calcio a la célula. Se ha reportado que en todos los modelos de epilepsia, aumenta la expresión de proto-oncogenes como el c-fos, c-jun, jun-b y zif/268 los cuales funcionan como terceros mensajeros intracelulares^{127,128,129}. Estos terceros mensajeros hacen que los cambios intracelulares a corto plazo lo sean a largo plazo. También se ha demostrado un aumento en la concentración de RNAm para el factor de crecimiento nervioso (FCN)¹³⁰. El FCN se libera en la región cerebral que muestra la actividad convulsiva, es incorporado por las terminales nerviosas y transportado mediante el transporte retrógrado hacia el soma neuronal¹³¹. El FCN aumenta las ramificaciones neuronales^{132,133} y su inactivación mediante anticuerpos anti-FCN impide la formación de contactos sinápticos¹³⁴.

1.2.2.2.5 Citotoxicidad del calcio intracelular

Cuando el calcio entra a la célula en forma masiva, se activan lipasas y proteasas. Algunas proteínas, pero en particular

organelos citoplásmicos como la mitocondria y el reticulo endoplásmico (RE), absorben el exceso de calcio que se mantiene secuestrado. La entrada de calcio promueve la entrada de cloro y por lo tanto daño osmótico ^{135,136,137}. Si la entrada de calcio sigue aumentando, las mitocondrias y el RE se dañan irreversiblemente, que es el caso del estatus epilepticus. Estos dos mecanismos, daño osmótico y el daño a organelos, son la causa de la muerte celular particularmente en el hipocampo. Este es el mecanismo de la esclerosis hipocampal de Spielmeyer que se observa en el estatus epilepticus ¹³⁸. Mouritzen Dam demostró que el daño neuronal está en función de la duración de las crisis epilépticas ¹³⁹.

1.2.2.3 SIMILITUD ENTRE LA LTP Y EL KINDLING

Como se mencionó, el kindling se asocia a un incremento a largo plazo en la respuesta sináptica similar a la que se observa en la LTP ¹⁴⁰. Es decir, ambos fenómenos muestran una facilitación persistente de la transmisión sináptica. Se ha reportado un efecto facilitador para el establecimiento del kindling si se induce antes la LTP ¹⁴¹. Tanto el kindling como la LTP, se pueden provocar fácilmente en las estructuras límbicas. Es más difícil que se presenten en estructuras no telencefálicas ¹⁴². Al igual que en el kindling, la LTP se puede establecer en animales cuando éstos son mayores de 12 días de edad ¹⁴³. Una vez que se ha establecido el

kindling no se puede inducir la LTP, lo que indica que son dos procesos no aditivos. A nivel bioquímico, se ha demostrado que en la LTP hay un aumento en los sitios de unión del glutamato. Este incremento no se observa cuando la estimulación se da en condiciones que previenen el establecimiento de la LTP (por ejemplo un medio con baja concentración de calcio, o con una alta concentración de magnesio) o bien, si la estimulación no es lo suficientemente intensa para inducir la LTP ^{144,145}. En el kindling de la corteza entorrinal, también ocurre un aumento en los sitios de unión al glutamato.

Una diferencia entre el kindling y la LTP consiste en que la LTP se desarrolla y decae (de horas a semanas) ^{97,146}, mientras que el kindling tiene un desarrollo más lento y es esencialmente permanente ^{147,148}. La extinción de la LTP puede llegar a niveles previos a la estimulación y la reinducción requiere el mismo tiempo para establecerse ¹⁴⁹. Por el contrario, cuando se reinduce el fenómeno de kindling se requiere un menor tiempo para observar la respuesta potenciada (Tabla 4).

Por lo anterior se puede pensar que la LTP es un factor que participa en la epileptogénesis. Sin embargo, la LTP no explica los cambios de excitabilidad general que se observan en la célula epiléptica. Por otra parte, en el fenómeno del kindling se observan mecanismos neuronales que también participan en la epileptogénesis. Uno de estos mecanismos puede ser la desinhibición que muestra el

tejido nervioso con kindling ya establecido.

**SIMILITUDES Y DIFERENCIAS
ENTRE KINDLING Y LPT**

KINDLING	LTP	
	Similitud	Diferencia
Incremento a largo plazo en la respuesta sináptica	x	
Se puede inducir fácilmente en estructuras límbicas y difícil en estructuras no telencefálicas.	x	
Se establece hasta 10 a 12 días postnatales.	x	
Aumento en los sitios de unión al glutamato.	x	
Efecto facilitador del kindling al inducir antes LTP.		x
Se establece, lentamente y es esencialmente permanente.		x

Tabla 4 Similitudes y diferencias entre el kindling y la LTP.

1.3 DESINHIBICION

1.3.1 EQUILIBRIO ENTRE EXCITACION E INHIBICION

La célula nerviosa recibe información excitatoria e inhibitoria. En un momento dado, la suma algebraica espacial y/o temporal de esta información determina que la neurona genere un potencial de acción.

Todas la células tienen una capacidad innata para generar potenciales de acción de manera espontánea ¹⁵⁰. Si una neurona en particular, se aísla de su contexto biológico y se mantiene en condiciones adecuadas, tendrá un patrón de disparo característico, cercano a su potencial frecuencia de descarga. Para cada neurona, este patrón es el resultado de la interacción entre el potencial genético y la llegada de información que actúa sobre ella en el momento de la observación.

Muchas neuronas en su ambiente normal, por ejemplo en un organismo intacto, forman parte de una agrupación neuronal y carecen de autonomía mientras sean integrantes de la red neuronal. De esta forma las neuronas tanto excitatorias como inhibitorias, participan en el procesamiento de la información modulando de esta forma la excitabilidad del tejido nervioso.

1.3.2 LA DESINHIBICION COMO MECANISMO DE MODULACION NEURONAL

La presencia de una gran cantidad de terminales inhibitorias modula la actividad del tejido nervioso inhibiendo la expresión de su funcionamiento y que para que se exprese esta función, los circuitos deben liberarse de la influencia de neuronas inhibitoras lo que determina la aparición del fenómeno de desinhibición. Las neuronas inhibitoras pueden estar fásicamente activas, su actividad dependerá de la información que reciban en un momento dado, o bien, pueden estar tónicamente activas, es decir con actividad constante. Algunas neuronas inhibitoras pueden liberar neurotransmisor inhibitor en forma constante y por lo tanto, mantener a otra neurona inhibida. Esta inhibición puede eliminarse si la neurona que estaba inhibida se despolariza directamente, o si se inhibe la neurona que ejerce la inhibición (desinhibición), o por una combinación de ambos mecanismos ¹⁵¹.

De acuerdo con este punto de vista, la desinhibición es permisiva, por lo tanto las aferencias excitatorias son las que tienen un papel fuertemente modulador. La participación de la desinhibición, junto con el papel modulador de neuronas excitatorias, parece ser el mecanismo por el cual se regula la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso. Por ejemplo, las neuronas piramidales corticales y del hipocampo, están literalmente cubiertas de terminales inhibitorias. Las terminales GABAérgicas de circuitos locales no sólo están densamente distribuidas en el soma

y dendritas, sino que también, están localizadas en el segmento inicial donde actúan como filtros de frecuencia. Más aún, las neuronas GABAérgicas tienen terminales de otras neuronas GABAérgicas. De esta forma, las neuronas piramidales están fuertemente inhibidas por circuitos locales. Las neuronas GABAérgicas de circuitos locales participan en procesos que resultan en la producción de inhibición "feedforward", "feedback", "recurrente", e inhibición presináptica y facilitación presináptica. Además, centros de comando, (como el cerebelo) ejercen una inhibición tónica de alta frecuencia en varias regiones cerebrales, vía proyecciones GABAérgicas ¹⁵².

1.3.3 CONSECUENCIAS DEL DESEQUILIBRIO ENTRE LA INHIBICION Y EXCITACION

Un desequilibrio entre el sistema inhibitorio (GABAérgico, glicinérgico) y el sistema excitatorio puede afectar una o varias regiones cerebrales. Un desequilibrio en una región cerebral clave, puede tener una repercusión drástica en todo el sistema nervioso, como es el caso de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Estas se generan por lesiones focales de la corteza cerebral o por lesiones focales de estructuras subcorticales. Bajo condiciones ambientales relativamente simples, en individuos con tal desequilibrio, el sistema nervioso puede funcionar en una forma

adaptativa aparentemente adecuada. Conforme la complejidad e intensidad de las influencias ambientales aumentan, el desequilibrio entre la inhibición y la excitación se acentúa.

La reducción de la inhibición mediada por GABA es un efecto común de varios agentes químicos convulsionantes ^{153,154,155}. Está bien establecido que el bloqueo completo de la inhibición produce convulsiones. Evidencias experimentales ^{155,156,157} sugieren que el sistema GABAérgico es muy lábil y especialmente susceptible a alterarse. Esta última observación es pertinente, ya que muchas epilepsias en humanos son causadas por traumatismos, tumores, angiomas cerebrales, etc., que muy probablemente lesionan a las neuronas GABAérgicas. Asimismo, estas condiciones pueden interferir con el aporte sanguíneo normal a una región en particular. Probablemente, las interneuronas GABAérgicas, tienen una tasa metabólica más alta y por lo tanto son más sensibles a la anoxia o hipoxia. Su función se altera, aun con una hipoxia ligera, y se pueden presentar desde cambios degenerativos, hasta destrucción celular si la anoxia persiste. La anoxia también puede ser el resultado de un aumento en la actividad metabólica. Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos de focos epilépticos crónicos de la corteza cerebral ^{156,157,158} de humanos y animales, mostraron una reducción de GABA y de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Sloviter mostró electrofisiológicamente, que en el estatus epilepticus se altera el sistema GABAérgico ^{159,160}. Estudios in vivo e in vitro, indican que la aplicación del ácido kaínico en el

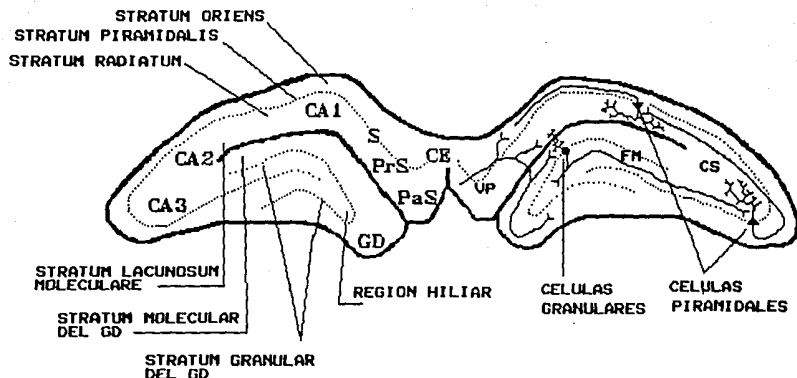


Figura 6 Regiones de la formación hipocámpica. Notose que consta de cuatro regiones. A) el giro dentado (GD); B) el hipocampo propiamente dicho, el cual se subdivide en tres campos CA1, CA2 y CA3; c) el complejo subicular que también se subdivide en: subiculum (S), presubiculum (PrS), y parasubiculum (PaS); y por último la corteza entorrinal (CE). En esta figura, también se muestran las distintas capas histológicas del hipocampo y giro dentado (Lado izquierdo), así como sus circuitos neuronales (Lado derecho). La corteza entorrinal (CE) manda sus fibras a través de la vía perforante (vp) hacia las células granulosas. Estas a su vez hacen contacto con las células piramidales de CA3; a estas fibras se les llama musgosas (FM). Las células piramidales de CA3 mandan sus fibras a CA2 y CA1 mediante las colaterales de Schaffer (CS).

hipocampo reduce la inhibición ^{161,162,163}. Por otra parte, las drogas anticonvulsivas como las benzodiazepinas, barbitúricos y el ácido valproico, facilitan la actividad del sistema GABAérgico en forma sinérgica.

1.4 HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura ampliamente estudiada y presenta ciertas ventajas para llevar a cabo estudios electrofisiológicos encaminados a entender los cambios neuronales que se presentan en la epileptogénesis. Dentro de estas ventajas están las siguientes: 1) el hipocampo tiene una estructura laminar la cual ofrece la posibilidad de identificar, con precisión razonable, la posición del electrodo y los generadores de los diferentes componentes del potencial de campo; 2) Las propiedades de las células y la fisiología básica de los circuitos neuronales del hipocampo de la rata son ampliamente conocidas.

La formación hipocampal tiene cuatro regiones relativamente simples. Estas incluyen al giro dentado y al hipocampo propiamente dicho, que se compone de tres regiones: CA1, CA2, CA3, el complejo subicular (el cual también se puede dividir en tres partes: el subiculum, presubiculum y parasubiculum) y la corteza entorrinal que en los roedores se divide en medial y lateral (ver figura 6). La estructura tridimensional de la formación hipocampal de los roedores es relativamente compleja. A grosso modo parece como una estructura elongada cuyo eje longitudinal se dobla formando una C desde el núcleo septal rostro-dorsal a el lóbulo temporal caudo-ventral. El eje longitudinal generalmente se llama septotemporal y el eje ortogonal se llama transversal (ver figura 7).

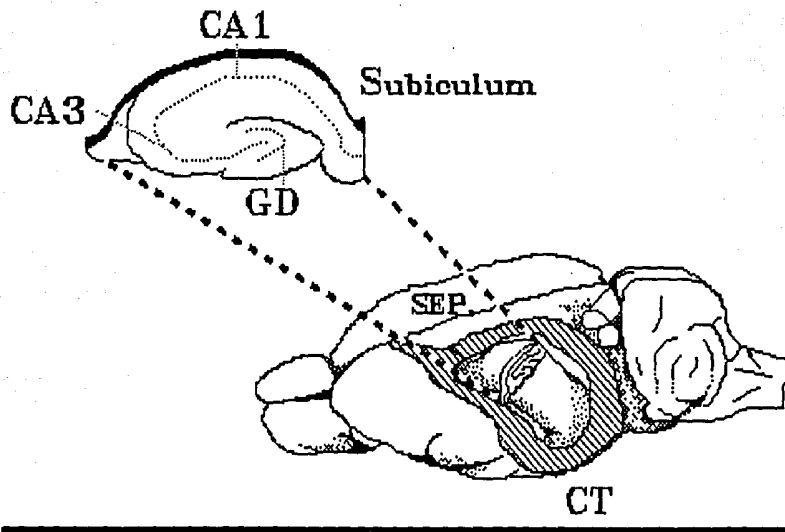


Figura 7 Posición del hipocampo en el cerebro de la rata. El hipocampo es una estructura elongada en forma de C. El eje longitudinal o septotemporal va desde el núcleo septal (Sep.) a la corteza temporal (CT). El eje transversal está orientado perpendicular al eje septotemporal. Figura tomada de Amaral, *Neuroscience* 31(3):571-591, 1989.

1.4.1 CORTEZA ENTORRINAL Y LA VIA PERFORANTE

En los estudios con la técnica de Golgi realizados por Ramón y Cajal ¹⁶⁴, Lorente de No ^{165,166} y en los estudios con la técnica de degeneración realizados por Blackstad ^{167,168}, y

Raisman y col. ¹⁶⁹, se demostró que la corteza entorrinal es el origen de las proyecciones (la vía perforante) al giro dentado e hipocampo. Ambas técnicas demostraron fibras que emergen de la corteza entorrinal, continúan en la sustancia blanca y forman un paquete relativamente compacto, que Ramón y Cajal llamó "haz angular". Las fibras de la vía perforante, viajan dorsalmente y se doblan en el plano transversal, perforando la capa piramidal del subiculum a lo largo de su eje longitudinal y finalmente entran al giro dentado. Las fibras de la vía perforante se distribuyen a lo largo de la capa molecular del giro dentado, el striatum lacunosum-moleculare del hipocampo y la capa molecular del subiculum 170,171,172,173.

Existen varias nomenclaturas para las porciones del giro dentado. Designaremos a la porción adyacente a la fisura hipocampal como sección suprapiramidal; a la porción opuesta como sección infrapiramidal y a la parte donde se conectan, la cresta. En los estudios con la técnica de Golgi, se nota que las fibras de la vía perforante cruzan la fisura hipocampal en la región de la cresta, se bifurca y se extiende ramificándose en las secciones supra e infrapiramidal de la capa molecular (ver figura 6). El 10% de la corteza entorrinal proyecta a un 25% del giro dentado en forma divergente. Experimentos en hipocampo de mono, indican que las células de la corteza entorrinal tienen colaterales que inervan niveles septotemporales distantes del giro dentado.

1.4.2 GIRO DENTADO Y LAS FIBRAS MUSGOSAS

El giro dentado es el receptor mayor de las proyecciones de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal. A su vez, es una importante referencia a la región CA3 del hipocampo. El giro dentado se divide en tres capas: la molecular, en la cual terminan las fibras de la vía perforante; la capa granular, la cual está poblada de los principales tipos de células (las células granulares); y una capa profunda o polimórfica, la cual está poblada de una variedad de tipos neuronales (ver figura 6). Las células granulares dan origen a haces de axones, llamadas fibras musgosas, que se ramifican en la capa polimórfica antes de entrar a la región de CA3, en donde forman sinapsis en las dendritas proximales de células piramidales ^{174,175,176,177}.

Las células granulosas tienen dos patrones de distribución: un plexo difuso de colaterales que inervan la capa polimórfica del giro dentado, y otro con una mayor cantidad de fibras que ocupan el stratum lucidum y se localiza superficial a la capa de células piramidales a las cuales inervan.

La región polimórfica del giro dentado está compuesta de una gran variedad de tipos neuronales. Estas células forman plexos axonales que se ramifican localmente ¹⁷⁸. Este plexo axonal termina en muchas de estas mismas neuronas ^{175,179}.

1.4.3 CONEXIONES DE CA3

El hipocampo se subdivide generalmente en tres regiones (CA1, CA2 y CA3) de acuerdo a la nomenclatura sugerida por Lorente de No. El principal tipo celular, la célula piramidal, es el mayor componente de la capa celular piramidal. En la profundidad de esta capa está el stratum oriens, en la cual descienden las dendritas basales de las células piramidales, y que también contiene células no piramidales. La región acelular, superficial a la capa piramidal, donde se localizan las dendritas apicales de las células piramidales se divide en stratum radiatum profundo y stratum lacunosum-moleculare superficial. En CA3, en la región justo por encima de la capa piramidal, se localizan las fibras musgosas provenientes del giro dentado y se llaman stratum lucidum.

Las células piramidales de CA3 tienen axones muy ramificados que contribuyen a las proyecciones de asociación que terminan ahí mismo, y además son la mayor eferencia a CA1, (las llamadas colaterales de Schaffer)^{180,181}. Las proyecciones de CA3 a sí misma y de CA3 a CA1 ya se habían apreciado en los estudios de Ramón y Cajal y Lorente de No con la técnica de Golgi. En cuanto a las proyecciones de CA3 a sí misma, son también divergentes. Las fibras que se originan en células de CA3 localizadas cerca del giro dentado, se distribuyen preferentemente en la parte distal de CA1, por ejemplo cerca del borde subicular, donde terminan en la porción superficial del stratum radiatum. Las células de CA3

de la corteza entorrinal que forman la vía perforante terminan en circuitos cerrados. Las fibras

localizadas progresivamente cerca del borde de CA1, proyectan preferentemente a partes de CA1 cercanas a CA3 y a porciones profundas del stratum radiatum. Células de CA3 localizadas cerca del giro dentado, tienden a proyectar más en dirección septal. En tanto que células localizadas cerca del borde de CA1, tienden a proyectar más en dirección temporal.

1.4.4 OTRAS CONEXIONES INTRINSECAS

Además de las conexiones ya descritas, existen proyecciones hipocampales intrínsecas, cuya organización topográfica deber ser estudiada con más detalle. A diferencia de CA3, las células piramidales de CA1 no originan proyecciones a otros niveles de CA1 sino que proyectan en forma columnar al subiculum.

Una proyección relativamente débil de CA1 se dirige a capas profundas de la corteza entorrinal. El subiculum proyecta hacia el pre y parasubiculum además de la corteza entorrinal. El pre y parasubiculum, originan proyecciones hacia la corteza entorrinal, que terminan en las capas III y II respectivamente. Finalmente, parecen haber proyecciones intrínsecas en la corteza entorrinal que unen varias partes de la región y unen capas profundas con capas más superficiales. En resumen, la formación hipocampal consiste de una serie organizada de circuitos cerrados. Las fibras de la corteza entorrinal que forman la vía perforante terminan en

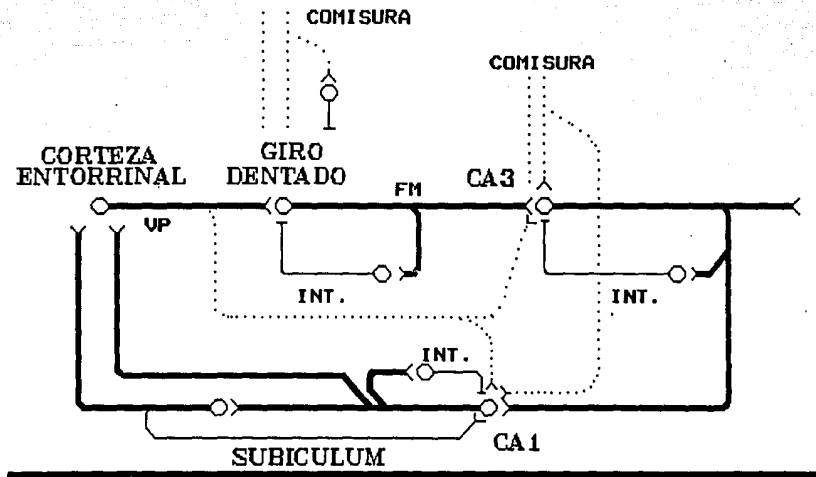


Figura 8 Representación esquemática de algunos circuitos intrínsecos de la formación hipocámpica. Las líneas gruesas representan las vías que ejercen fuerte influencia sináptica y las punteadas las vías que ejercen una influencia débil. Los axones que forman la vía perforante (VP) son la aferencia principal a las células granulosas del giro dentado, y muy escasa a las células piramidales de CA1 y CA3. La aferencia principal de CA3 son los axones de las células granulosas que forman las fibras musgosas (FM). Y la de CA1, son los axones de las células piramidales de CA3 que forman las colaterales de Schaffer. De la región CA1 salen fibras directamente a la corteza entorrinal o bien haciendo un relevo en el subículo. En las regiones del giro dentado, CA3 y CA1, existen circuitos locales de inhibición recurrente. En éstos, una fibra colateral de las células granulosas o piramidales, conectan a una interneurona inhibitoria (int.) posiblemente GABAérgica, la cual a su vez inerva a la misma célula granulosa o piramidal que la inerva. Figura tomada de Scabassi, J. *Neurophysial.*, 60(3):1066-1076, 1988

una forma laminada en los dos tercios externos de las dendritas de las células granulares en el giro dentado. Las proyecciones de las células granulosas terminan en las dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de la región inferior (neuronas CA3), que se proyectan además a neuronas piramidales de la región superior (neuronas de CA1). El grupo celular de CA1 hace contacto en la corteza subicular adyacente y tanto la región superior y el subiculum envían axones a la corteza entorrinal, cerrando de esta forma, un circuito de retroalimentación a las células de origen de la vía perforante. Existen numerosos circuitos pequeños de retroalimentación y de alimentación anterógrada positiva (feedforward) en cada circuito largo de retroalimentación formando una red compleja.

1.5 HIPOTESIS

Se ha observado en pacientes epilépticos sin tratamiento, un aumento en la intensidad, duración y manifestaciones de las crisis convulsivas conforme pasa el tiempo. También en modelos experimentales de epilepsia como es el paradigma del kindling, hay un aumento en la duración de las manifestaciones electroencefalográficas (postdescarga) y conductuales conforme se aplican las estimulaciones eléctricas. Dependiendo de la especie animal y de la región cerebral estimulada los cambios en la excitabilidad neuronal ya permanentes muestran un curso temporal que puede durar meses. Por lo anterior pensamos que existe un fenómeno de LTP en las primeras etapas de inicio de la actividad convulsiva. Este establecimiento de la LTP, estaría determinando otros cambios neuronales que modifican en otras etapas la excitabilidad neuronal. Ahora bien, las evidencias experimentales (ver introducción) muestran que existe una similitud entre la LTP y el kindling. De hecho varios autores postulan que la LTP es el mecanismo celular del kindling, Consideramos que esta LTP de alguna manera se modifica y provoca los cambios en la excitabilidad neuronal que hacen que una neurona genere actividad paroxística.

En el SNC existe un equilibrio entre la inhibición y

excitación que modula la excitabilidad neuronal. La pérdida de tal equilibrio, en el sentido de predominio de excitación o disminución de la inhibición altera la excitabilidad neuronal. El propósito de este trabajo es considerar la disminución en la inhibición y explicar los cambios observados en la actividad neuronal paroxística por la existencia de un fenómeno de desinhibición.

1.6 OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal analizar los mecanismos celulares que aparecen y están en relación con la actividad convulsiva. En particular tienen también como objetivo el entender la participación de la inhibición recurrente como moduladora de la excitabilidad neuronal y su participación en la epileptogénesis cuando se altera. Por otro lado también pretende explicar de qué forma interviene la LTP en los cambios de excitabilidad neuronal que determinan el fenómeno convulsivo.

2 METODO

Para probar la hipótesis sobre la desinhibición, usamos tres estrategias experimentales. En la primera estrategia empleamos la estimulación eléctrica iterativa en la corteza entorrinal lateroventral para provocar cambios directos en la excitabilidad de las células granulosas del giro dentado, e indirectos en los circuitos de inhibición recurrente. En la segunda estrategia provocamos cambios directamente a los circuitos de inhibición recurrente mediante la aplicación de sustancias que afectan al neurotransmisor involucrado. En la tercera estrategia aplicamos sustancias neurotransmisoras con la técnica de microiontoforesis.

2.1 KINDLING DE CORTEZA ENTORRINAL

2.1.1 PREPARACION

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 ±40 gr. Se mantuvieron en un ambiente con humedad de 45%, temperatura entre 21 a 23 grados centígrados e iluminación de 100 a 125 lux, en un ciclo de luz-obscuridad de 12 Hrs. La alimentación fue "ad libitum".

Las ratas se anestesiaron con uretano (dosis de 1.25 gr/kg por vía intraperitoneal). Una vez que las ratas llegaron a la anestesia

profunda, se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica y se inmovilizaron con bromuro de pancuronio (dosis de 0.04 mg/kg). Se mantuvo la ventilación con un ventilador mecánico de presión positiva intermitente. Durante todo el experimento, se registró el electrocardiograma y la temperatura rectal. Se aplicaron dosis suplementarias tanto de uretano como de pancuronio conforme fue necesario.

Se realizó la tricotomía de la región y se practicó una incisión en la piel. Se separaron los tejidos blandos, y se hicieron cuatro trépanos según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson ¹⁸². El primero, a 7.5 mm posterior, 4.5 mm lateral izquierdo con respecto a bregma y de 2 mm de diámetro. El segundo, a 3 mm posterior, 2 mm lateral izquierdo a bregma y de 3 a 4 mm de diámetro. Los otros dos, uno a 2 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo a bregma, el otro a 3 mm posterior y 2 mm lateral derecho a bregma. Se realizó una incisión en la duramadre y se colocaron los electrodos de registro y estimulación.

Se colocó un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable con un calibre de 0.4mm y de 500 Ω para estimular la corteza entorrinal lateral (izquierda, derecha o ambas). Asimismo se usó una micropipeta con 5 M Ω de impedancia, hecha con un estirador David Kopf Instruments modelo 700C, y se llenó con una solución de azul de pontamina al 2.5% en KCl 2M. Con un micromanipulador hidráulico David Kopf modelo 1207B, se colocó la pipeta en la región hipocámpica para obtener los registros de los potenciales de

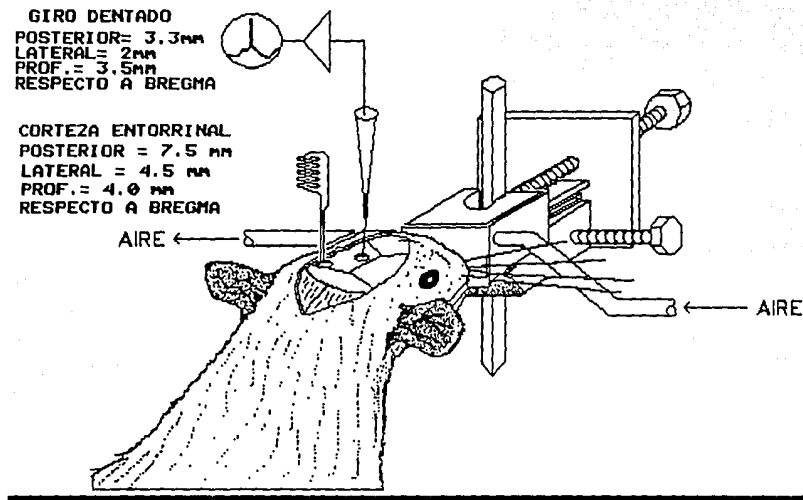


Figura 9 Las ratas fueron anestesiadas con uretano, inmovilizadas con bromuro de pancuronio, y mantenidas con ventilador mecánico a presión positiva intermitente.

campo provocados. En los dos últimos trépanos, se colocaron electrodos corticales fabricados con alambre de acero inoxidable para obtener el registro del electrocorticograma (Figura 9 y 10).

2.1.2 ESTIMULACION Y REGISTRO

El estímulo eléctrico se aplicó directamente a la corteza entorrinal a través del electrodo bipolar con un estimulador Grass

modelo S11. El paradigma de estimulación tipo kindling tiene por objeto provocar descargas en las células granulosas del hipocampo, sin producir hidrólisis del tejido, y consiste en aplicar un tren de pulsos de 1 mseg de duración, con frecuencia de 80 a 100 Hz e intensidad de 250 μ A. La duración de cada tren de pulsos fue de un segundo aplicado cada 30 minutos durante 24 Hrs.

Con el propósito de observar los cambios en el circuito de inhibición recurrente, durante todo el experimento se utilizó la técnica de pulsos pares. Este paradigma, consiste en la aplicación de un par de pulsos eléctricos a la corteza entorrinal con 25 mseg de intervalo entre pulso y pulso. Estos pulsos tienen las mismas características de intensidad y duración (por esto reciben el nombre de pulsos pares o gemelos). Cada pulso tiene intensidad de 150 a 200 μ A y duración de 0.2 mseg.

Por otro lado, para valorar la participación de la LTP en el kindling. A un grupo de ratas sometidas a estimulación eléctrica se les aplicó ácido aminofosfonovalérico (APV) o ácido kinureico a una dosis de 5 μ l con una concentración de 10 μ g/ 10 μ l por vía intracerebroventricular.

Los potenciales provocados en el giro dentado, inducidos por los pulsos pares (por cada pulso se obtiene un potencial), se registraron antes y después del estímulo eléctrico tipo kindling. Los potenciales se amplificaron, grabaron (grabadora Heulett Packard modelo 3869A) y se observaron en un osciloscopio Tektronix modelo 5113. Estos potenciales también se digitalizaron y

promediaron a través de un convertidor analógico a digital RC electronics modelo SC18, con una computadora At Vectra ES/12, Hewlett Packard (Figura 10).

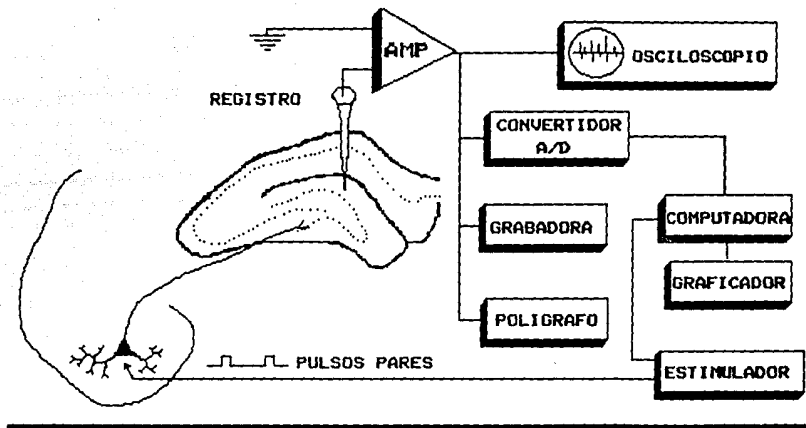


Figura 10 Se registraron los potenciales con una micropipeta. Fueron amplificados, grabados y desplegados en un osciloscopio. La señal también fue digitalizada para ser analizada en una computadora.

2.1.3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

El potencial de campo producido por la descarga sincrónica de las células granulosas, se puede predecir por la teoría del dipolo, debido al arreglo laminar de los elementos celulares y de la

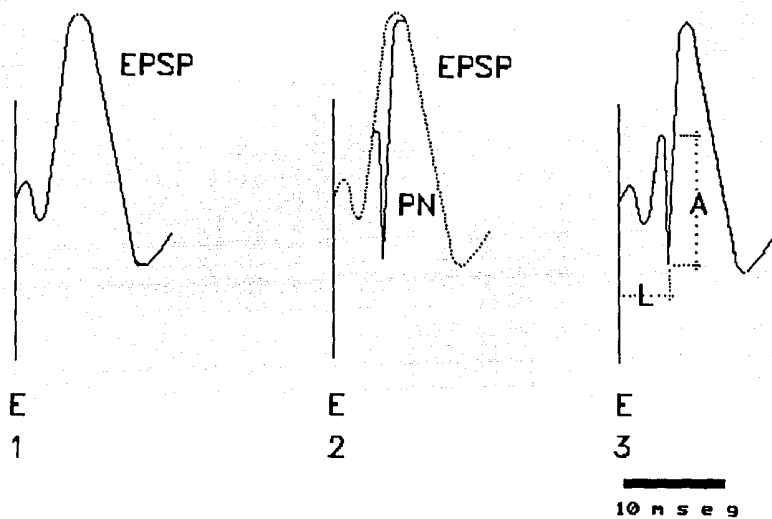


Figura 11 Ejemplos de potenciales de campo provocados por la estimulación de la vía perforante con la técnica de los pulsos pares, registradas en el giro dentado. La respuesta a un estímulo subumbral (1), es un potencial postsináptico excitatorio (EPSP). La respuesta a un estímulo supraumbral (2), incluye a la descarga neuronal (PN) traslapada con el EPSP. En esta serie de experimentos, lo que interesa medir son los potenciales de campo (3), la latencia (L) y la amplitud (A). Figura modificada de Sclabassi, J. y cols. *Neurophysiol*, 60(3):1066-1076, 1988.

organización laminar de las vías intrínsecas y extrínsecas de la región. Los distintos componentes de estos potenciales, reflejan diferentes eventos intracelulares. Las aferencias de las células granulosas son excitatorias, por lo que la estimulación eléctrica de la vía perforante, provoca un potencial postsináptico

excitatorio (EPSP). El sumidero de corriente extracelular resultante del EPSP, se manifiesta como una negatividad cerca de la región dendrítica. En tanto que la fuente de corriente correspondiente, se manifiesta como una positividad cerca de las láminas donde se encuentran los cuerpos celulares. Cuando la estimulación es de suficiente intensidad, se producen potenciales de acción, que se reflejan extracelularmente como una negatividad cercana a la región de los cuerpos celulares (descarga neuronal). Esta descarga neuronal, se traslapa sobre el EPSP de campo, y su amplitud, se correlaciona con el número de células granulosas que generan potenciales de acción en respuesta a la estimulación. La latencia de la descarga depende en parte de la distancia entre la vía perforante y las células granulosas. Esta latencia es más corta cuando las células granulosas son activadas por fibras proximales de la vía perforante medial.

Como consecuencia, la descarga neuronal compuesta por la actividad dendrítica y la actividad de los somas neuronales puede ser analizada por los componentes que integran el potencial provocado, en donde el primer componente representa la descarga dendrítica y el segundo componente la descarga del soma neuronal. Este patrón de actividad puede ser analizado por separado (Figura 11).

El primer pulso eléctrico aplicado a la corteza entorrinal genera impulsos que llegan hasta las células granulosas del giro dentado a través de la vía perforante. De esta forma, provoca en

esta región la activación de las células granulosas, que a su vez activan las interneuronas inhibitorias de los circuitos de inhibición recurrente. Al activarse estas interneuronas, inhiben a las células granulosas con las que están asociadas. Al aplicar otro pulso eléctrico 25 mseg. después del primero, los impulsos generados por este segundo pulso llegan a las células granulosas cuando éstas todavía están bajo los efectos inhibitorios de las interneuronas. Lo anterior explica que el segundo componente del primer potencial (descarga neuronal condicionante PN(C)), provocado por el primer estímulo, es de mayor amplitud que el segundo componente del segundo potencial (descarga neuronal prueba PN(T)), provocado por el segundo estímulo. Asimismo, dado que el segundo estímulo encontró a las células granulosas bajo la influencia inhibitoria de las interneuronas, por lo que podemos inferir que el circuito de inhibición recurrente está funcionando normalmente (Figura 12).

Para tener una medición objetiva del funcionamiento de este circuito que implica la inhibición recurrente, se obtuvo el índice de máxima inhibición (IMI), y su evolución para cada experimento. Para ello, se midieron las amplitudes de los segundos componentes del primer (condicionante) y segundo potencial (prueba). El índice entonces, se obtuvo dividiendo la amplitud PN(T) entre la amplitud PN(C). Cuando el circuito de inhibición recurrente funciona normalmente, los valores del IMI son menores de 1. Cuando se establece falta de inhibición recurrente, los valores del IMI son

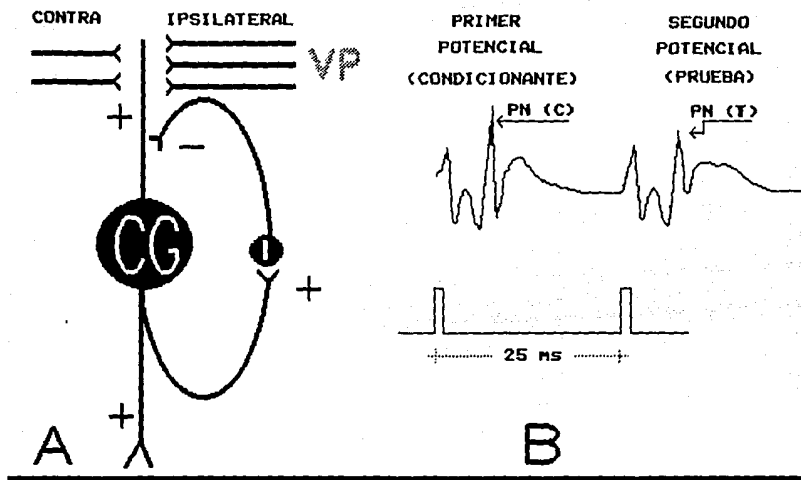


Figura 12 En (A) se muestra el circuito de inhibición recurrente. A las células granulosas (CG), llegan las aferencias excitatorias de la vía perforante (VP), que las activan. Estas, activan a su vez a las interneuronas inhibitorias (I), las cuales modulan la actividad de las granulares inhibiéndolas. En (B) se muestran los pares de potenciales registrados en un par de pulsos gemelos. El primer potencial, es el condicionante (PN(C)), el segundo es el que prueba al circuito de inhibición recurrente (PN(P)). En ambos, se muestra el segundo componente (flecha), el cual representa la descarga de la población neuronal.

mayores de 1. Posteriormente se elaboraron gráficas del IMI en función del número de estímulos.

La técnica de estímulos pares o gemelos, nos ha resultado muy útil ya que el análisis de los potenciales de campo registrados proporciona información sobre dos fenómenos que posiblemente están

involucrados en la epileptogénesis. Por un lado, la amplitud del primer componente del primer potencial da información sobre el fenómeno de la potenciación a largo plazo y por el otro, al comparar las amplitudes de los segundos componentes de cada par de potenciales se obtiene información sobre el estado de la inhibición recurrente.

También se registró la actividad eléctrica del hipocampo con un poligrafo GRASS modelo 78B, con un módulo para EEG modelo 7P511G. Se midió la duración de la postdescarga inducida por la estimulación eléctrica tipo kindling. Con estos datos se elaboraron gráficas de la duración de la postdescarga en función del número de estimulaciones aplicadas desde el tiempo cero. Se consideró al kindling establecido, cuando ya no aumentó significativamente la duración (en segs) de la postdescarga registrada en el hipocampo.

2.2 INDUCCION DE LOS CAMBIOS DE EXCITABILIDAD POR SUBSTANCIAS ANTAGONISTAS AL GABA Y GLICINA

2.2.1 PREPARACION

La metodología utilizada es similar a la descrita para los experimentos sobre el kindling de la corteza entorrinal. Los trépanos se realizaron en las mismas coordenadas estereotáxicas y se utilizaron el mismo tipo de electrodos.

**DOSIS USADAS PARA
ANTAGONISTAS DE GABA**

Antagonistas	concentración	
	local ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	sistémica (mg/Kg)
Estricnina ¹	0.1	0.4
Bicuculina ¹	0.1	0.4
Picrotoxina ¹	5.0	2.5
Penicilina ²	500 U/ μl	400 000 U/Kg

1. Las sustancias fueron disueltas en solución salina.
2. La penicilina fue disuelta en agua destilada.

Tabla 5. En la administración local, se aplicaron las sustancias microiontoforéticamente con 40 PSI durante 5 segs. La aplicación sistémica, se realizó por vía intraperitoneal en la dosis total mostrada.

2.2.2 ESTIMULACION Y REGISTRO

En estos experimentos, se utilizaron varios antagonistas de glicina y GABA como son: estricnina (hidrocloruro de estricnina, Sigma cat S-8753), bicuculina (Sigma), picrotoxina (Sigma cat P-5753), y penicilina (penicilina G sódica, Pisa) en forma local y sistémica.

Para la aplicación local, se elaboró una micropipeta de vidrio con una punta de 20 μm , y se llenó con 2 μl de la sustancia (consultar la tabla 5 para las dosis). Mediante un micromanipulador

hidráulico, se posicionó estereotáxicamente la micropipeta en el giro dentado. La sustancia fue inyectada (40 PSI de presión durante 5 segs.) con un aparato de microiontoforesis Neuro Phore modelo BH-2 con un módulo de presión modelo PPM-2. Se utilizó una presión creada con gas nitrógeno de 0.08 Kg/cm^2 .

La aplicación sistémica se realizó mediante la inyección intraperitoneal de las sustancias (consultar la tabla 5 para las dosis).

Se registró la actividad eléctrica del hipocampo durante 5 horas aprox. Con una ventana discriminadora, toda espiga epiléptica fue convertida en un pulso TTL (transistor transistor logic) con el cual fue alimentada una computadora. Con la información captada se elaboraron histogramas de distribución de frecuencias.

Para valorar el circuito de inhibición recorrente, se utilizó también la técnica de los pulsos pares. Los potenciales se valoraron antes y cada 10 minutos después de la aplicación de los antagonistas a GABA.

2.2.3 ANALISIS

Al igual que en los experimentos anteriores, se midieron las amplitudes de los segundos componentes del primer y segundo potencial. Se obtuvo el índice de máxima inhibición (IMI), y se elaboraron las gráficas del IMI en función del tiempo.

2.3 VALORACION DE LOS CAMBIOS EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL MEDIANTE LA TECNICA DE MICROIONTOFORESIS

2.3.1 PREPARACION

Después de inducir los cambios en la inhibición recurrente con las dos estrategias experimentales anteriores, se aprovecharon las mismas preparaciones para valorar estos cambios mediante la técnica de la microiontoforesis. Para tal efecto, se elaboraron micropipetas múltiples de 4 barriles y de 2-5 M Ω cuya punta fue de 5 μ de diámetro aprox. Uno de ellos, se llenó con una solución de azul de pontamina al 2.5% en KCl 2M. Otro barril, se llenó con NaCl 2M para balancear la corriente. Los otros dos se llenaron con acetilcolina (1M en sol. salina) y glutamato (2M en sol. salina) respectivamente.

2.3.2 REGISTRO E IONTOFORESIS

La micropipeta se colocó en el giro dentado (3500 a 4000 μ m de profundidad) mediante un micromanipulador hidráulico. A partir de ahí, la pipeta se hizo descender en pasos de 1 μ m de distancia con el objeto de aislar y registrar la actividad individual de una célula. La actividad unitaria extracelular se amplificó, grabó, visualizó en un osciloscopio y con una ventana discriminadora de amplitudes; se generó un pulso TTL por cada potencial de acción.

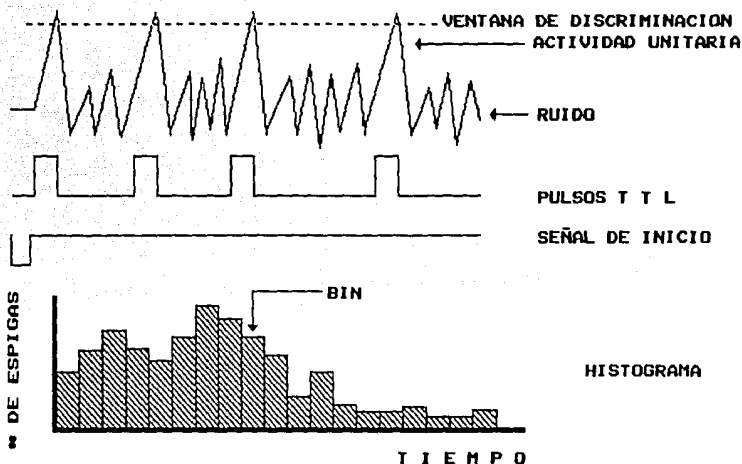


Figura 13 La actividad unitaria extracelular, va acompañada de ruido. Para aislar a la actividad unitaria, se utiliza una ventana de discriminación que convierte cada potencial en un pulso TTL. Estos pulsos son alimentados a una computadora, y se elaboran histogramas de distribución de frecuencias.

Estos pulsos se caracterizan por ser de no más de 5 volts de amplitud y de 1 msec. de duración. La ventaja de esta ventana, es su capacidad para aislar la señal que nos interesa (actividad unitaria) del ruido existente. Con este pulso se alimentó a la computadora a través de un convertidor analógico a digital y se elaboraron histogramas de distribución de frecuencias.

Una vez detectada la actividad unitaria de una célula, se registró durante un período de 5 minutos su actividad espontánea

basal. Posteriormente, se aplicó la acetilcolina o el glutamato iontoforéticamente con distintas intensidades de corriente durante 5 segundos.

2.3.3 ANALISIS

Los pulsos TTL se utilizaron para construir histogramas de distribución de frecuencias y de intervalos en tiempo real.

El histograma de distribución de frecuencias, consiste en graficar el número de espigas que dispara la célula cada segundo (bin) antes, durante, y después de la inyección de la sustancia. En estos histogramas, cada barra (bin) representa el número de espigas disparadas por la célula en un segundo. El histograma de distribución de intervalos, consiste en medir el intervalo de tiempo entre espiga y espiga para determinar su frecuencia. Posteriormente se construyen histogramas del número de intervalos en función de las frecuencias predominantes.

Para obtener un valor más objetivo se elevaró gráficas del Índice de responsividad a la aplicación iontoforética de acetilcolina y glutamato. En ratas control y ratas a las que se les provocó cambios de excitabilidad mediante estimulación eléctrica iterativa o mediante la aplicación de antagonistas del GABA y glicina. El Índice se calculó dividiendo el número de potenciales de acción por segundo entre la carga iontoforética (nC). La carga iontoforética se calcula multiplicando la corriente usada para la

inyección en nano Amperes (nA) por la duración de la inyección en segundos.

En los casos donde se requirió se compararon los grupos control contra los experimentales con la prueba de ANOVA, y prueba de T de Student con el paquete estadístico para computadora STATA version 2.05.

2.4 CONTROL HISTOLOGICO

Una vez concluido el experimento, se procedió a marcar el sitio de registro haciendo pasar una corriente eléctrica de 10 μ A durante 15 a 20 minutos a través de la pipeta que contiene azul de pontamina. Posteriormente, el animal aún en estado de anestesia, se perfundió en el ventrículo izquierdo con una solución de formaldehído al 10%. El cerebro se extrajo y se depositó en un frasco con formaldehído al 10% durante un día. Se hicieron cortes de 10 μ m de espesor con un microtomo de congelación. Los cortes que contenían la marca de azul de pontamina, se colocaron en portaobjetos y se tiñeron ligeramente con la técnica de Nissl (con tionina). Posteriormente se colocaron en una ampliadora fotográfica como si fueran un negativo para hacer una impresión en papel fotográfico, y se revelaron, permitiendo identificar la marca dejada por la micropipeta según la técnica modificada de Gusman Flores ¹⁹⁷.

3 RESULTADOS

3.1 KINDLING DE CORTEZA ENTORRINAL

El establecimiento del kindling en este grupo de ratas, se observó y cuantificó midiendo la duración de la postdescarga en el hipocampo la cual refleja el cambio en la excitabilidad neuronal. En el inserto de la figura 14, se puede observar la evolución de la postdescarga (en segundos) en función del número de estimulaciones. En el primer estímulo la postdescarga se mantuvo en promedio 20 segundos (± 3.3 SE, $n=30$), posteriormente progresó hasta alcanzar una duración promedio de 80 segs (± 4.4 SE, $n=30$). (estímulo 15). En la figura 15, se muestran las postdescargas en diferentes momentos de la evolución del kindling. Asimismo, se muestran los potenciales de campo provocados en el hipocampo. Se puede observar que la duración de la postdescarga aumentó al mismo tiempo que disminuyó la inhibición recurrente. En el análisis del estímulo K-1 es posible advertir que el segundo componente del segundo potencial (PN(T)), es más pequeño en amplitud que el segundo componente del primer potencial (PN(C)), esto indica que la inhibición recurrente está presente. Sin embargo, conforme se aplicaron los estímulos eléctricos, la amplitud del PN(T) se incrementó hasta que se

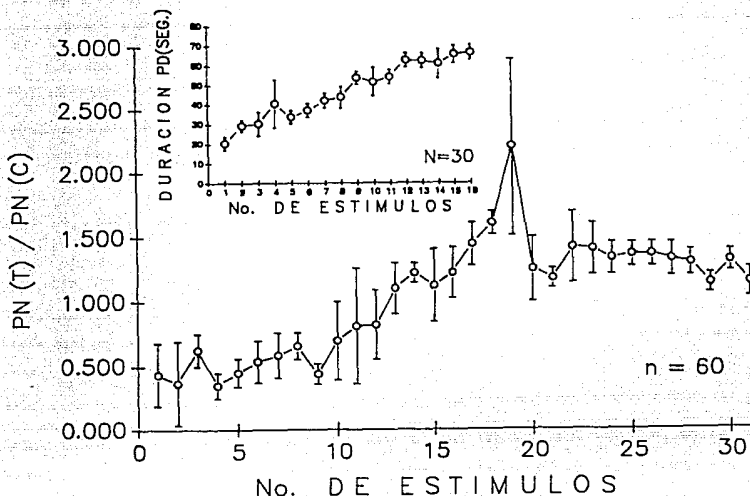


Figura 14 En el inserto, se muestra la evolución de la postdescarga registrada en la corteza somatosensorial de 30 ratas. Cada punto representa el promedio \pm el error estandar de la duración en segundos de la postdescarga registrada en el hipocampo en función del número de estímulos tipo kindling aplicados desde el tiempo cero. La estimulación consistió en un tren de pulsos de 1 msec de duración, con frecuencia de 80-100 Hz e intensidad de 250 μ A, aplicados a la corteza entorrinal. En la gráfica, se muestra la evolución del índice de máxima inhibición (IMI) cuantificado con los potenciales de campo obtenidos en el hipocampo. Cada punto representa el promedio \pm el error estandar del IMI en función del número de estimulaciones tipo kindling aplicadas desde el tiempo cero. Estos potenciales fueron provocados con la técnica de los pulsos pares en la corteza entorrinal de 60 ratas.

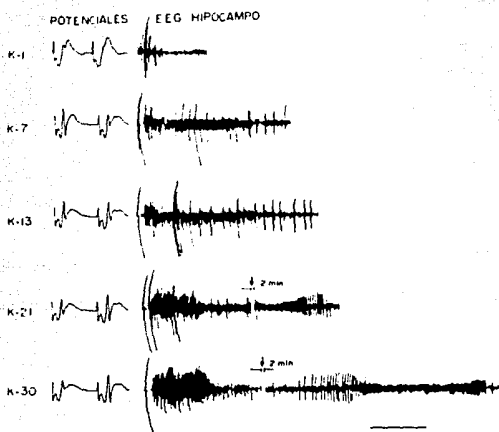


Figura 15 A la derecha, se muestra la postdescarga registrada en el hipocampo y la evolución en su duración. A la izquierda se muestran, los potenciales de campo registrados en el giro dentado, provocados por la técnica de pulsos pares en la corteza entorrinal, así como su evolución. La técnica de pulsos pares consiste en aplicar un par de estímulos eléctricos con 25 msec de intervalo entre pulso y pulso. Cada pulso tiene una intensidad de 150 a 200 μA y duración de 0.2 μseg .

estableció el kindling. En el estímulo K-13 la amplitud de PN(T) y PN(C) son equivalentes y ya en el estímulo K-30, la amplitud de PN(T) es marcadamente mayor que la de PN(C), esto indica que no existe inhibición recurrente.

En la gráfica del IMI en función del número de estímulos (figura 14, gráfica grande), podemos observar que del estímulo 1 (\bar{x} 0.4, \pm 0.28 SE, $n=60$) al 12 (\bar{x} 0.8, \pm 0.27 SE, $n=60$) los valores del IMI son menores de uno, lo que indica que está presente la inhibición recurrente. Sin embargo, la pendiente ascendente de la gráfica indica que se está modificando. A partir del estímulo 13 en promedio (\bar{x} 1.1, \pm 0.19 SE, $n=60$), los valores del IMI son mayores de uno. Esto indica que la inhibición recurrente empieza a disminuir alterando el funcionamiento de los circuitos neuronales.

En la figura 16 se muestra la duración de la postdescarga en el hipocampo, en función del número de estímulos eléctricos aplicados a la corteza entorrinal (círculos vacíos), y al giro dentado (círculos llenos). En esta gráfica, se puede observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la duración de las postdescargas en ambas estructuras (ya que la prueba de Anova con un nivel de significancia de 0.005 dió como resultado $P > 0.0785$ y la prueba de t de Student fué de $P > 0.1418$). Esto significa que se puede estimular eléctricamente la corteza entorrinal y producir los mismos cambios de excitabilidad que al estimular directamente al giro dentado sin lesionarlo.

Se cuantificó la amplitud del primer componente del primer potencial de cada par. Este representa el potencial postsináptico excitatorio (EPSP) y por lo tanto, los cambios en su amplitud pueden considerarse como una manifestación de la evolución de la LTP. En la figura 17 (control), se muestra la evolución de este

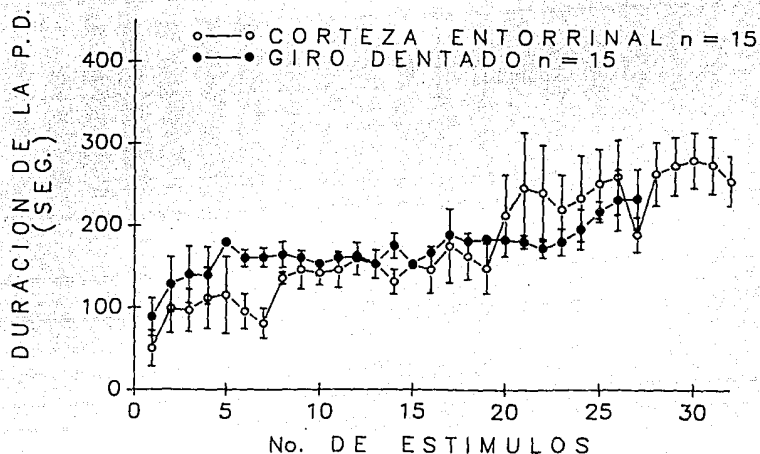


Figura 16 Duración de la postdescarga en función del número de estímulos eléctricos aplicados desde el tiempo cero. Los datos son promedios \pm error estándar obtenidos con el paradigma del kindling de la corteza entorrinal (círculos vacíos) en 15 ratas y del giro dentado (círculos llenos) en otro grupo de 15 ratas. Los parámetros de estimulación fueron iguales para ambos.

EPSP en función del número de estimulaciones. Se puede apreciar que la amplitud aumenta progresivamente hasta alcanzar una meseta. Esta meseta se mantiene durante más de dos semanas (algunos autores reportan que se sigue observando durante meses). Para valorar la participación de los receptores NMDA en la LTP, se administraron

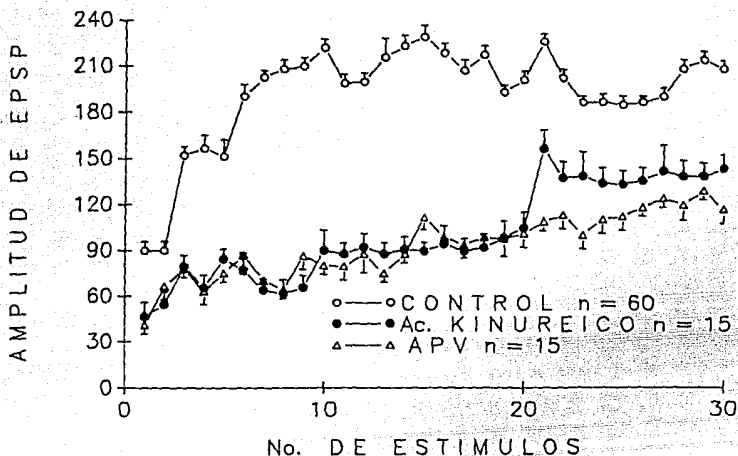


Figura 17 Evolución de la amplitud del primer componente del primer potencial par, que representa el potencial postsináptico excitatorio durante la estimulación eléctrica de 60 ratas. Se muestra la evolución de la amplitud durante la estimulación después de inyectar ácido kinureico y APV intracerebroventricular ($10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) en 15 ratas. Cada punto representa el promedio \pm el error estandar de la amplitud del EPSP en función del número de estimulaciones aplicadas desde el tiempo cero.

antagonistas de receptores NMDA como son el APV (ácido aminofosfonoalérgico) y el ácido Kinurérico a dosis de $5\mu\text{l}$ con una concentración de $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ por vía intracerebroventricular. Tanto el APV como el ácido Kinurérico modificaron la evolución de la amplitud del EPSP (la prueba de t de Student comparando APV o AC.

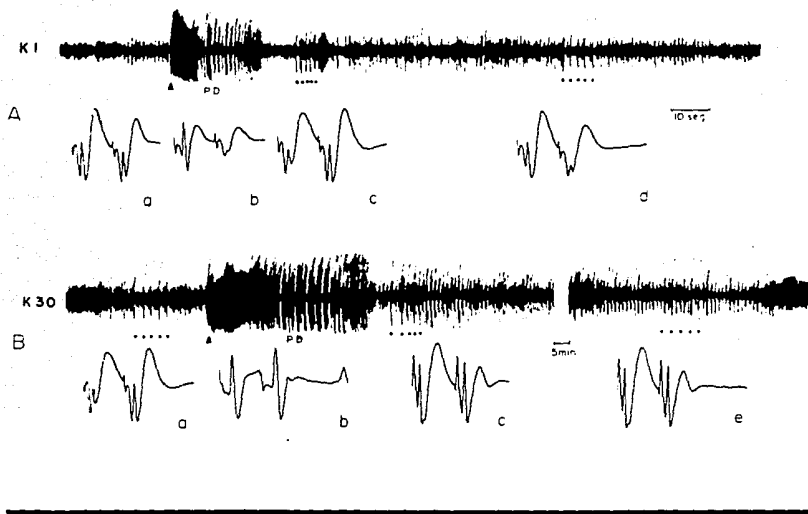


Figura 18 En A se muestran el registro electroencefalográfico del hipocampo (trazo superior), y los potenciales de campo registrados (trazos inferiores) antes (a), durante (b), inmediatamente después (c), y un minuto después (d) de la postdescarga (PD). Los puntos indican los artefactos de la estimulación para obtener los potenciales, los triángulos indican el momento de la estimulación tipo kindling. En B se muestra el registro electroencefalográfico del hipocampo el cual fue cortado cinco minutos (trazo superior), y los potenciales de campo (trazos inferiores), hasta cinco minutos después (e).

Kinureico con el control fue de $P < 0.0001$ para ambos). Esto es, la amplitud del potencial fue menor que la amplitud observada en los animales que no recibieron los antagonistas NMDA (controles), lo que significa que se bloqueó la aparición de la LTP. No hay

diferencia significativa comparando APV y Ac. Kinureico ($P > 0.3086$). En la figura 18, se muestran los potenciales registrados antes (a), durante (b), inmediatamente después (c), un minuto después (d), y cinco minutos después (e) de la postdescarga inducida con la primera estimulación eléctrica (K1 (A)), y en la última K30 (B). En K1 el par de potenciales registrado antes de la postdescarga (a) se encuentra normal, en tanto que en K30 se encuentra modificado ya que el PN(T) muestra una mayor amplitud que PN(C). Durante la postdescarga (b) en K1 PN(C) es de mayor amplitud, esto refleja que se está dando el fenómeno de LTP, y PN(P) está disminuido, lo que indica que en este momento la inhibición recurrente está aumentada. En K30, tanto PN(C) como PN(T) son de mayor amplitud que los potenciales observados antes de la postdescarga (de K30) y que los de K1 observados durante la postdescarga. Esto sugiere que el fenómeno de LTP se ha establecido y que la inhibición recurrente está disminuida. Los potenciales registrados inmediatamente después de la postdescarga (c), tanto en K1 como en K30, se encuentran alterados y al minuto de la postdescarga (d), en K1 vuelven a las condiciones control, mientras que en K30 no ocurre así. Esto significa que existen dos fases; una reversible, donde la inhibición recurrente se normaliza (primeras estimulaciones eléctricas) y otra, irreversible, en donde ya la inhibición recurrente no se recupera (últimas estimulaciones).

El 5% de las aferencias que recibe el giro dentado de la corteza entorrinal son del lado contralateral y el 95% corresponden

al lado ipsilateral. Con el objeto de explorar si el paradigma de la potenciación a largo plazo de tipo asociativo potencia la desinhibición, se estimuló no sólo la corteza entorrinal ipsilateral sino también la contralateral.

En las figuras 14 y 15, se muestran los resultados obtenidos por la estimulación de la corteza entorrinal ipsilateral exclusivamente. En la figura 19 se muestra la evolución del IMI en función del número de estimulaciones por la estimulación contralateral (cuadros vacíos), ipsilateral (triángulos llenos) y contra e ipsilateral (círculos vacíos). En cuanto a la estimulación contralateral, el IMI no mostró valores mayores de uno, es decir, la inhibición recurrente no se alteró. Con la estimulación ipsilateral, el valor del IMI se fué incrementando hasta que en el estímulo número 13 en promedio adquirió valores mayores que uno, lo que indica que la inhibición recurrente se modificó en forma más eficiente que la estimulación contralateral ($P < 0.0005$).

Con la estimulación simultánea tanto ipsilateral como contralateral, el IMI mostró valores mayores que uno desde el estímulo 11 en promedio, es decir, la modificación de la inhibición recurrente se estableció de forma más rápida que con la estimulación ipsi y contralateral ($P < 0.0002$).

3.2 INDUCCION DE LA DESINHIBICION POR SUBSTANCIAS ANTAGONISTAS AL GABA Y GLICINA

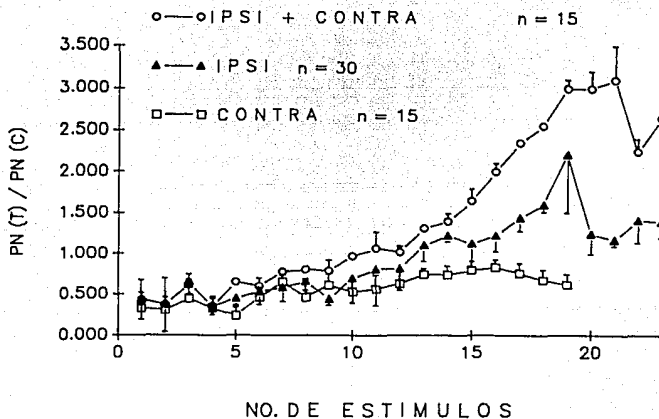


Figura 19 Evolución del IMI cuantificado con los potenciales de campo registrados en el giro dentado. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar del IMI en función de los estímulos tipo kindling aplicados, durante la estimulación de la corteza entorrinal contralateral de 15 ratas (cuadros vacíos), ipsilateral de 30 ratas (triángulos llenos) y contra e ipsilateral simultáneamente de 15 ratas (círculos vacíos).

En la figura 20 se muestran histogramas que representan la cantidad de espigas epilépticas registradas en el hipocampo, en función del tiempo. Estas espigas se provocaron por la aplicación intrahipocampal de antagonistas del GABA y de la glicina. Cada barra del histograma (bin), representa el número de espigas por segundo. De esta forma, tenemos la historia completa durante varias horas de la respuesta hipocampal. La latencia en la aparición de espigas epilépticas en el hipocampo, fue de 15 minutos aproximadamente para la penicilina de 20 minutos en promedio para la picrotoxina, en tanto que para la bicuculina y estriknina la aparición de espigas interictales fue inmediata. En estos histogramas se pueden ver periodos, en donde los valores de varios bins fueron mayores al resto, estas regiones corresponden a ráfagas de espigas (burst), poco frecuentes por la aplicación de la penicilina y bicuculina, en tanto que fueron muy frecuentes con la estriknina y picrotoxina. La recuperación fue rápida en el caso de la penicilina y picrotoxina (4 Hrs en promedio), más lenta para la bicuculina (6 Hrs) y en el caso de la estriknina no hubo recuperación.

3.2.1 PENICILINA

La aplicación intrahipocampal de penicilina, provocó que los valores del IMI fueran mayores que 1 a los 15 minutos de ser

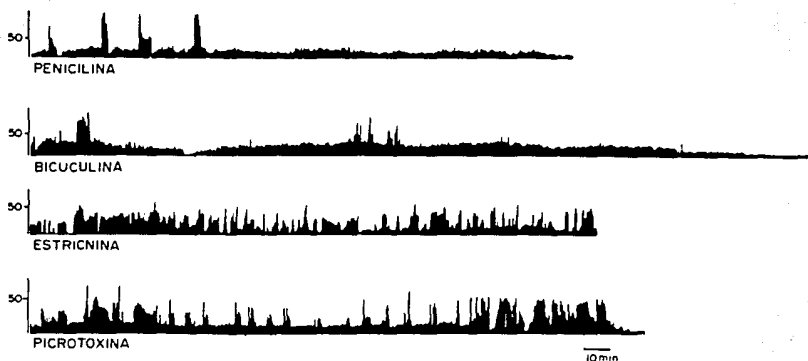


Figura 20 Histogramas de la respuesta hipocampal a la aplicación intrahipocampal mediante la técnica de microiontoforesis por presión, de antagonistas de el GABA y la glicina. Estos histogramas están elaborados con el registro electroencefalográfico del giro dentado. Cada barra del histograma representa el número de espigas epilépticas por segundo.

aplicada y alcanzó su máximo a los 90 minutos, es decir, que la inhibición recurrente disminuyó a partir del minuto 15, alcanzando su máximo valor al minuto 90. La recuperación de la inhibición recurrente ocurrió a los 120 minutos (figura 21, sup.) en tanto que la recuperación de las espigas epilépticas se inició a partir de los 400 minutos (figura 21, inferior).

La aplicación intraperitoneal (i.p.) de penicilina, provocó que el IMI rebasara el valor de 1 a los 70 minutos y alcanzó su máximo a los 90 minutos, al igual que en la aplicación local. La recuperación de la inhibición recurrente ocurrió a los 120 minutos como en el caso de la aplicación local (figura 22 superior). Sin embargo, el EEG inició su recuperación a los 220 minutos (figura 22 inferior).

Tanto la aplicación local como sistémica de penicilina, modificaron la morfología de los potenciales registrados al aumentar el número de componentes.

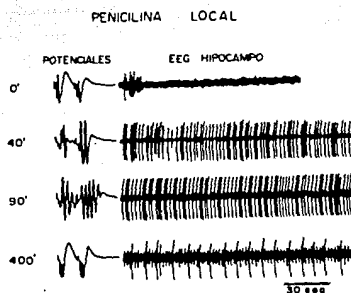
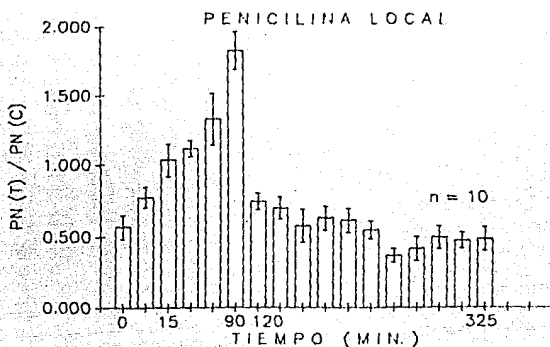


Figura 21 En la parte superior, se muestra la evolución del IMI en 10 ratas, a la aplicación intrahipocampal de penicilina con la técnica de microiontoforesis por presión. En la parte inferior, se muestra el registro electroencefalográfico y los potenciales de campo registrados en el hipocampo, durante los efectos de la penicilina de las mismas ratas.

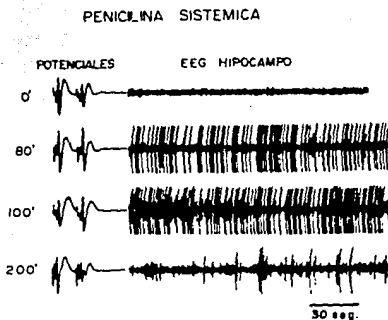
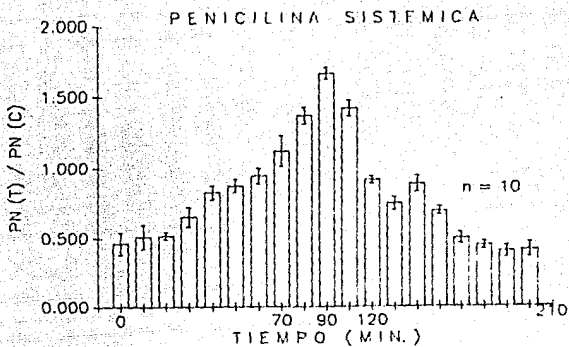


Figura 22 En la parte superior se muestra la evolución del IMI en función del tiempo, durante los efectos de la penicilina aplicada intraperitonealmente. En la parte inferior, se muestra el EEG y los potenciales registrados en el hipocampo de 10 ratas.

3.2.2 PICROTOXINA

La aplicación intrahipocampal de picrotoxina provocó que el IMI rebasara el valor de 1 a los 30 minutos alcanzó el máximo valor a los 60 minutos y regresó a valores menores que 1 a los 90 minutos (figura 23 superior). El EEG inició su recuperación a partir de los 120 minutos (figura 23 inferior).

La aplicación i.p. de picrotoxina produjo una disminución de la inhibición recurrente a los 40 minutos, alcanzó su máximo valor a los 60 minutos y se recuperó a los 80 minutos (figura 24 superior). Estos tiempos fueron similares a los obtenidos por la aplicación local. Sin embargo, el EEG no inició su recuperación sino hasta los 200 minutos (figura 24 inferior).

La morfología de los potenciales de campo registrados durante el efecto de esta substancia no mostraron alteración alguna excepto que su amplitud aumentó.

3.2.3 ESTRICNINA

La aplicación intrahipocampal de estriquina, disminuyó la inhibición recurrente a los 35 minutos, alcanzó su máximo efecto a los 90 minutos y la inhibición se recuperó a los 105 minutos (figura 25 superior). El EEG inició su recuperación a los 140 minutos (figura 25 inferior).

La aplicación i.p., modificó la inhibición recurrente a los 60

minutos, 30 minutos después que la aplicación local. Alcanzó su máximo efecto a los 90 minutos y la inhibición se recuperó a los 120 (figura 26 superior). El EEG inició la recuperación a los 160 minutos (figura 26 inferior).

La morfología de los potenciales, tanto en la aplicación local como sistémica, no se modificó excepto que su amplitud aumentó al final.

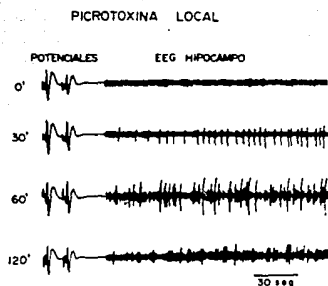
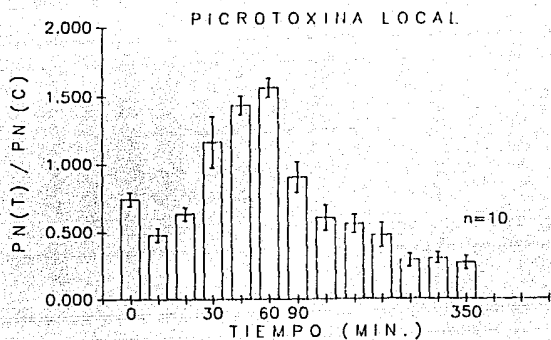


Figura 23 Se muestra en la parte superior, la evolución del IMI en la aplicación intrahipocampal de picrotoxina ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) en 10 ratas. En la parte inferior, se muestra el EEG y los potenciales registrados durante los efectos de la sustancia.

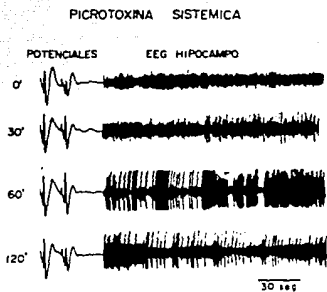
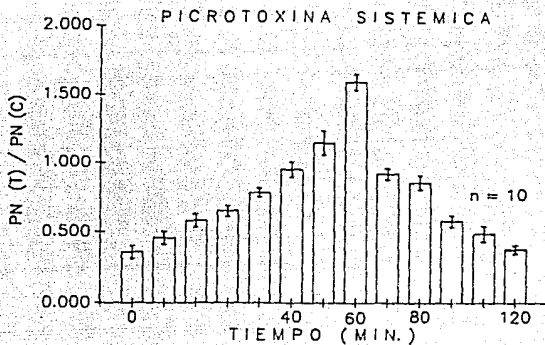


Figura 24 En la parte superior, se muestra la gráfica del IMI en función del tiempo, durante la aplicación de picrotoxina intraperitoneal (2.5 mg/Kg) de 10 ratas. En la parte inferior, el EEG y los potenciales registrados durante el efecto de la substancia.

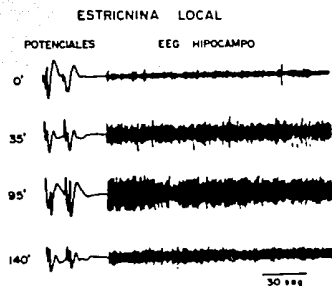
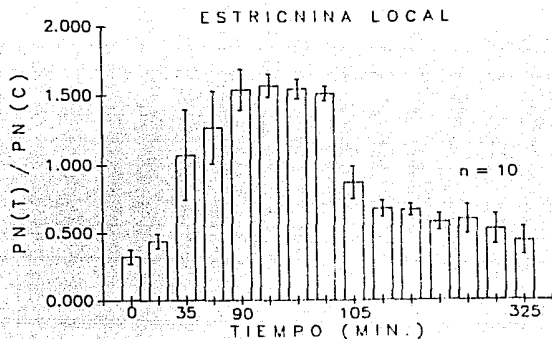


Figura 25 En la parte superior, se muestra el IMI en función del tiempo, en la aplicación local de estriquina ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). En la parte inferior, el EEG y los potenciales registrados en el hipocampo de 10 ratas durante los efectos de la estriquina.

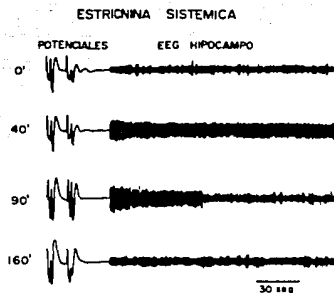
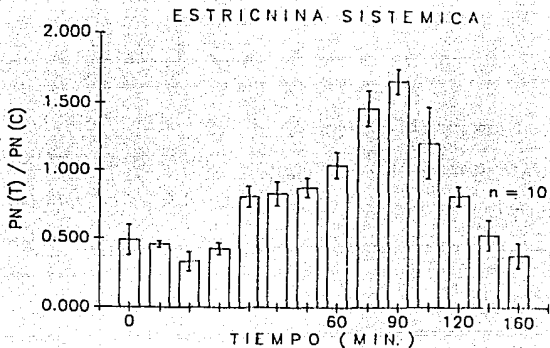


Figura 26 En la parte superior, se muestra la evolución del IMI en la aplicación sistémica de estriquina (0.4 mg/Kg). En la inferior, se muestra el EEG y los potenciales registrados en el hipocampo de 10 ratas correspondientes a dicha aplicación.

3.2.4 BICUCULINA

La aplicación de bicuculina intrahipocampal, incrementó los valores del IMI al minuto 75, alcanzó su máximo efecto al minuto 90 y la inhibición se recuperó a los 120 minutos (figura 27 superior). El EEG inició su recuperación a los 140 minutos (figura 27 inferior).

3.3 VALORACION DE LOS CAMBIOS EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL MEDIANTE LA TECNICA DE MICROIONTOFORESIS

Una vez inducidos los cambios en las células del giro dentado mediante estímulos eléctricos (kindling), o con sustancias antagonistas del GABA y glicina se valoró en estas mismas ratas el cambio de excitabilidad neuronal. Esta valoración se hizo a través de la aplicación iontoforética de dos neurotransmisores, la acetilcolina y el glutamato.

En la figura 28, se muestran histogramas de distribución de frecuencias en donde cada barra representa el número de potenciales de acción cuantificados cada dos segundos. En el histograma superior se muestran respuestas celulares a la aplicación iontoforética de Ach y Glu. Este patrón de respuesta se obtuvo en ratas sin estimulación iterativa previa y sin la aplicación de sustancias antagonistas del GABA. En la parte inferior, se muestran las respuestas obtenidas en ratas con cambio de excitabilidad ya establecido después de haber

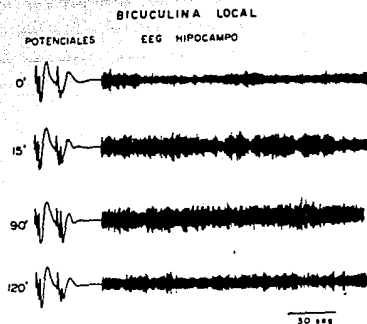
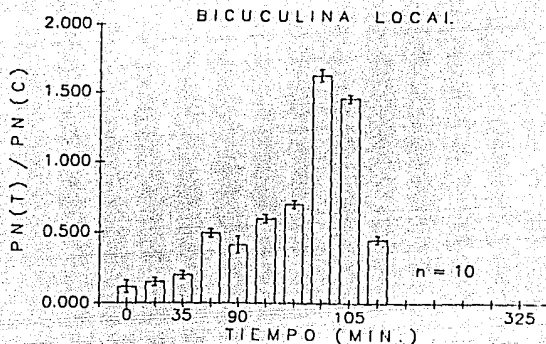


Figura 27 En la parte superior, se muestran los valores del IMI en la aplicación local de bicuculina (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En la parte inferior, se muestran el EEG y los potenciales registrados en el hipocampo de 10 ratas durante los efectos de la bicuculina.

estimulado eléctricamente el giro dentado. Al comparar ambos grupos de registros, una vez que los cambios plásticos ya están

establecidos, la respuesta de las células a los neurotransmisores es mucho mayor.

En la figura 29, se muestran ejemplos de histogramas de distribución de intervalos. En el grupo de registro (A), se muestran los histogramas obtenidos en ratas sin estimulación iterativa previa y se puede observar que no existe una moda bien definida pero se encuentra sobre el intervalo de los 64 milisegundos. En los histogramas del grupo (B), se muestran los histogramas obtenidos en ratas después de haber inducido el cambio de excitabilidad por estímulos eléctricos. En estos histogramas, si existe una moda bien definida, la cual está a intervalos menores de 64 mseg, lo que significa que la célula tiene una frecuencia de disparo mayor que el grupo control. Estos cambios se observaron en todas las ratas sometidas al paradigma del kindling.

En la figura 30 se presenta el índice de responsabilidad. Este fué obtenido dividiendo potenciales neuronales provocados por la inyección iontoforética de Ach y Glu entre la carga iontoforética (ver capítulo de método). En esta figura se muestra el índice en ratas sin previa manipulación y en ratas a las que se les provocó el cambio de excitabilidad por estimulación eléctrica iterativa o por la aplicación de antagonistas de GABA y glicina. Nótese que en todos los casos, las células respondieron más que los controles a la aplicación de los neurotransmisores acetilcolina y glutamato. Los grupos que más respondieron fueron a los que se les aplicó bicuculina y a los que se les aplicó estimulación eléctrica

iterativa.

En este trabajo sólo se analizaron los experimentos en donde se comprobó que el sitio de registro fue el giro dentado. En la figura 31, se muestra el corte histológico que se realizó como control después de haber dejado una marca de azul de pontamina en el sitio de registro.

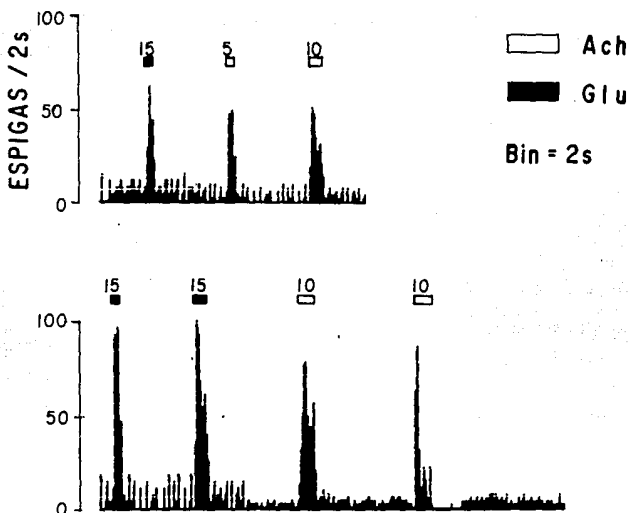


Figura 28 Histogramas de distribución de frecuencias de las respuestas celulares a la aplicación de acetilcolina y glutamato. Cada barra del histograma representa el número de potenciales de acción por cada dos segundos. De esta forma se muestra, los efectos antes durante y después de la aplicación iontoforética de acetilcolina (cuadros vacíos) o glutamato (cuadros llenos). En el histograma superior, se muestra la respuesta celular en ratas control, y en el histograma inferior, la respuesta una vez inducidos los cambios plásticos mediante el kindling de la corteza entorrinal. En la parte superior de los histogramas se muestran las intensidades de las inyecciones (nA), el momento (ubicación del cuadro) y su duración (tamaño del cuadro).

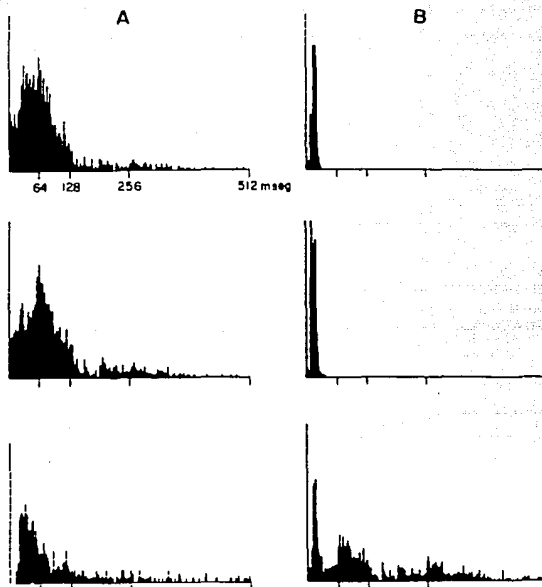


Figura 29 Histogramas de distribución de intervalos de la actividad unitaria espontánea. Cada histograma, representa el número de intervalos entre espiga y espiga neuronal y por lo tanto, la frecuencia de disparo de la célula. En (A), se muestran registros una vez inducidos los cambios plásticos en el giro dentado por el kindling de la corteza entorrinal.

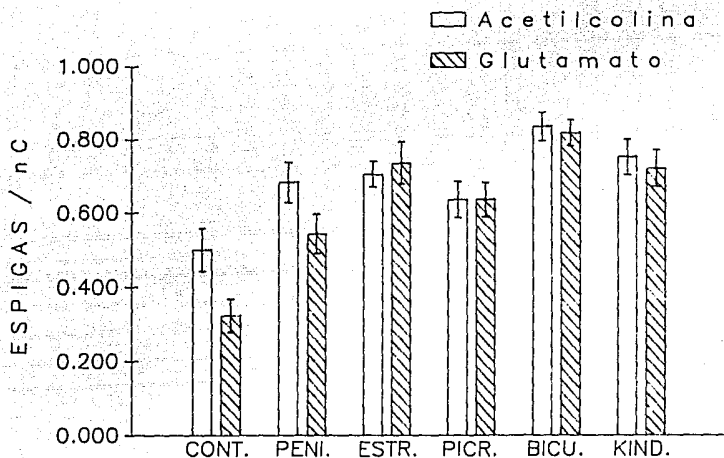


Figura 30 Histogramas del índice de responsividad neuronal a la aplicación de acetilcolina y glutamato iontoforéticamente. Este índice fué obtenido en ratas sin previa manipulación (n=15), en estimulación eléctrica iterativa (n=30) y en ratas a las que previamente se les aplicó antagonistas de GABA y glicina (n=20 para penicilina (peni.); n=20 para estriquina (estric.); n=20 para picrotoxina (picro); n=10 para bicuculina (bicu.)). El índice se calcula dividiendo los potenciales de acción por segundo entre la carga iontoforética. La carga iontoforética se calcula multiplicando la corriente eléctrica usada para la inyección en nano amperes (nA) por el tiempo que duró la inyección en segundos.

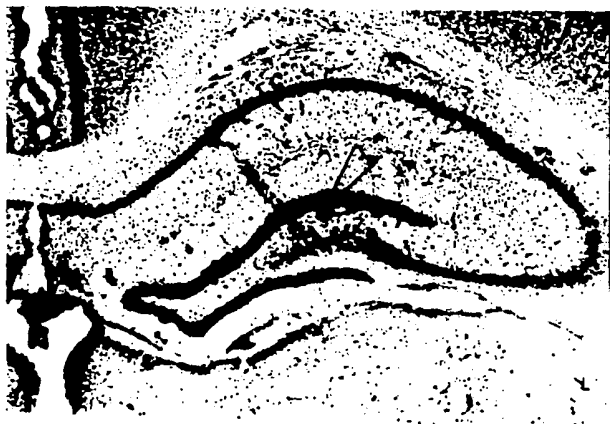


Figura 31 Se muestra un corte histológico de la región del hipocampo, de 10 μm de espesor, teñido con tionina. La flecha indica la marca de azul de pontamina en el sitio de registro. Sólo se analizaron los experimentos en donde se demostró el sitio de registro en el giro dentado del hipocampo.

4 DISCUSION

Para este estudio tenemos que hacer una consideración que creemos importante y es la siguiente: no utilizamos el método experimental que clásicamente se emplea para provocar el fenómeno del kindling. Es decir, en lugar de emplear animales con electrodos implantados a permanencia en el hipocampo o la amígdala y estar en movimiento, no anestesiados, empleamos animales anestesiados con uretano e inmovilizados. Sin embargo, en esta condición todos los animales mostraron los cambios electroencefalográficos, como son el aumento paulatino de la postdescarga y la aparición de espigas interictales, que presentan los animales con electrodos implantados a permanencia. Es evidente que la única restricción que nos impone esta preparación es no poder analizar la conducta del animal que se presenta durante el establecimiento del kindling. Sin embargo, nos ofrece la ventaja de poder analizar de manera objetiva, actividad electrofisiológica como son los potenciales provocados y el registro de la actividad neuronal individual.

En el hipocampo existe un equilibrio entre la inhibición y la excitación y si predomina esta última sobre la primera, pueden manifestarse las crisis convulsivas. En particular, el hipocampo es

una estructura del SNC que es sumamente sensible a alteraciones en tal equilibrio, por lo que se ha considerado importante explorar en ella los mecanismos que subyacen en la epileptogénesis. La estimulación eléctrica iterativa provoca cambios en la excitabilidad neuronal en la mayor parte del tejido nervioso como fue demostrado por Goddard ⁴³, Racine ⁴⁴, Y Wadda ⁴⁵ entre otros; el giro dentado no es la excepción. Este cambio de excitabilidad se manifiesta en el registro electroencefalográfico como una oscilación en la frecuencia y voltaje de las ondas cerebrales (a lo que se le llamó postdescarga). Esta actividad es provocada por la descarga sincronizada y de mayor frecuencia de las neuronas cercanas al electrodo de registro y que coincide con las oscilaciones del registro electroencefalográfico como lo demostró Gloor ^{183,184}. Nosotros logramos este cambio de excitabilidad dado que la duración de la postdescarga fue aumentando conforme se aplicaron los estímulos eléctricos (inserto de la figura 14). Este cambio de excitabilidad fue demostrado al comparar la respuesta neuronal a la aplicación de acetilcolina o glutamato en células normales y en células a las que se les provocó el cambio de excitabilidad. Como puede observarse en la figura 28, las células de ratas con kindling ya establecido mostraron mayor responsividad que las estudiadas en ratas a las cuales no se les provocó el cambio de excitabilidad (controles) por la aplicación de estímulos eléctricos. Por otro lado, al registrar simplemente la actividad espontánea se puede observar que las células de ratas

electricamente sensibles tienen un patrón de disparo de mayor frecuencia dado que el intervalo entre potencial y potencial es menor al del control (ver figura 29).

Al comparar los resultados obtenidos en dos grupos de ratas a las cuales se les estimuló eléctricamente en la corteza entorrinal y en el giro dentado respectivamente (figura 16), no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Esto para nosotros representa una gran ventaja ya que se puede estimular la corteza entorrinal y producir los mismos cambios de excitabilidad en el giro dentado sin dañarlo.

Durante la estimulación eléctrica iterativa pudimos observar que el fenómeno de inhibición recurrente se modificó desde las primeras estimulaciones. En la figura 15 del lado izquierdo se puede ver la evolución de los potenciales pares registrados en el transcurso de la estimulación eléctrica. Esta evolución consiste en un aumento del segundo componente PN(T) del segundo potencial con respecto al segundo componente PN(C) del primer potencial. Esto nos indica que la inhibición recurrente fue disminuyendo desde las primeras estimulaciones eléctricas. Sin embargo, desde el estímulo 13 en adelante la inhibición recurrente disminuyó a tal grado (valores del IMI > 1 , ver figura 14) que le fue imposible modular la excitabilidad de las células granulosas del giro dentado provocando una facilitación por desinhibición.

El hecho de que del estímulo 1 al 12 los valores del IMI fueron menores de 1 y que del 13 en adelante fueron mayores (figura

14), nos indica que el fenómeno lo podemos dividir en dos fases, una reversible y otra irreversible. Para ilustrar este fenómeno tomaremos como referencia la observado en la figura 18 la cual me parece muy importante. En A es el registro del primer estímulo eléctrico aplicado a la rata (K1) podemos ver que antes de dar el estímulo PN(T) es menor que PN(C). Durante la postdescarga inducida por el estímulo eléctrico es menor aún, esto significa que el circuito neuronal de la inhibición recurrente está funcionando normalmente. Más aún, está participando activamente en detener la postdescarga. En el potencial registrado inmediatamente después de la postdescarga, PN(T) es mayor que PN(C) lo que nos indica que la inhibición recurrente está disminuida ya que de alguna manera toda esa actividad neuronal aumentada está afectando a las interneuronas inhibitorias. Sin embargo los potenciales registrados un minuto después de la postdescarga son normales, es decir que la inhibición recurrente vuelve a funcionar normalmente. En este momento (K1) los mecanismos de daño celular no sobrepasan los mecanismos homeostáticos de las interneuronas inhibitorias y por lo tanto la inhibición recurrente se restablece. En B que es el último estímulo eléctrico aplicado a la rata (K30), los potenciales registrados antes del estímulo eléctrico, PN(T) es mayor que PN(C). Esto es por que la inhibición recurrente no funciona normalmente, está disminuida al grado de no poder modular la actividad de las células granulosas del giro dentado. Los potenciales registrados durante, inmediatamente después y cinco minutos después siguen iguales, ya

no se restablece la inhibición recurrente. En este momento (K30), los mecanismos de daño celular sobrepasaron los mecanismos homeostáticos de las interneuronas inhibitorias estableciéndose la fase irreversible.

La evolución del kindling en el hipocampo es prácticamente nula cuando estimulamos la corteza entorrinal contralateral (ya que la aferencia al giro dentado de la corteza entorrinal contralateral es sólo de un 5%). La evolución del kindling en el hipocampo es más rápida cuando estimulamos la corteza entorrinal ipsilateral (la aferencia al giro dentado por parte de la corteza entorrinal ipsilateral es de un 95%). Por lo anterior observamos que, en efecto, la coactivación de ambas aferencias determina en forma más rápida el cambio de excitabilidad como se muestra en la figura 19 (esto lo observaron también Bliss y Lomo 1973⁸², Yamamoto y Sawada 1981¹⁸⁵ en la inducción de LTP) y pensamos que este cambio se comporta de manera similar al que se presenta en la LTP.

Con base en esto último analizamos la evolución en amplitud del primer componente del primer potencial que representa el potencial postsináptico excitatorio (EPSP). Este aumentó rápidamente durante las primeras estimulaciones (ver figura 17) y se mantuvo constante en las subsiguientes. Esto mismo ha sido observado en la estimulación para inducir LTP por Bliss y Lomo 1973⁸², y por Wilson et al.¹⁸⁶ entre otros. Por lo tanto, este hecho sugiere que en el kindling se establece un cambio en la excitabilidad similar al que se presenta en la potenciación de la

transmisión sináptica de larga duración como es la LTP y más aún que la LTP puede ser el mecanismo celular de el kindling.

Para confirmar una de las hipótesis que hemos planteado y que consiste en explicar el fenómeno convulsivo por una falta de inhibición y por establecimiento de un fenómeno de desinhibición, hemos empleado sustancias que antagonizan la acción del principal neurotransmisor inhibitor que es el GABA. Todas las sustancias que empleamos provocaron el fenómeno convulsivo ya sea en forma de crisis generalizadas o de crisis focales, como son la aparición de espigas interictales de manera reversible. Asimismo, todas ellas provocaron falta de inhibición que valoramos con la técnica de estímulos pares.

Por lo anterior, y con base en estos resultados podemos sugerir algunas hipótesis explicativas del cambio de excitabilidad que observamos en nuestros experimentos. Con la estimulación eléctrica repetida se provoca una despolarización de las células del hipocampo. Esta despolarización induce una liberación al medio extracelular de glutamato. El glutamato activa a los receptores de glutamato no NMDA y provoca un potencial postsináptico excitatorio por un aumento en la conductancia de corrientes entrantes de sodio^{107,108}. Este cambio en el potencial de membrana libera a los canales de calcio asociados al receptor NMDA del magnesio que los mantiene bloqueados¹⁰⁵. La cantidad de fibras aferentes es importante para desbloquear los canales. La coactivación de las vías perforantes ipsi y contralateral es más eficiente que la activación de

cualquiera de éstas por separado ^{109,110}. En estas condiciones, la activación de los receptores NMDA por el glutamato aumenta la conductancia al calcio el cual entra a la célula (lo que explica la disminución de calcio extracelular observado en el foco epiléptico) ¹⁸⁴ e induce cambios intracelulares que aumentan la excitabilidad de la neurona.

Por lo tanto, en la formación del primer foco epiléptico se presenta un proceso de LTP tanto en las células granulosas como en las interneuronas inhibitorias del hipocampo. En la LTP que se establece en tejido previamente dañado como por ejemplo por inflamación, isquemia, hemorragia, etc. a diferencia de la LTP que se da en tejido nervioso normal como se propone para la memoria, hay un aumento anormal de la conductancia de calcio. Esta entrada anormal de calcio, no obstante que al principio de la LTP los mecanismos homeostáticos de la célula son suficientes para regular el calcio intracelular, hace que las interneuronas GABAérgicas modifiquen su potencial de membrana a valores menos negativos. Posiblemente este mecanismo explique la forma en que se altera el funcionamiento de la inhibición recurrente, en su fase reversible, ya que un minuto después de la postdescarga, las concentraciones tanto de calcio como de potasio vuelven a sus niveles normales. En la fase irreversible, los mecanismos homeostáticos de la célula son excedidos por la entrada masiva de calcio. Esta entrada de calcio tiene efectos citotóxicos sobre las interneuronas inhibitorias ^{136,137,138} lesionandolos y por lo tanto disminuyendo la inhibición

recurrente en forma permanente. De esta forma en el tejido hiperexcitable y se establece una facilitación por desinhibición.

En las células granulosas los mecanismos homeostáticos son eficientes para regular la concentración de calcio intracelular durante todo el tiempo. Esto provocan que la célula cambie su patrón de disparo normal (potencial de acción) a despolarizaciones paroxísticas que son características de las células epilépticas ^{6,7}. Por lo anterior, y con base a la información existente en la literatura podemos especular sobre los posibles mecanismos, que a nivel molecular, pudieran estar involucrados en el cambio de excitabilidad. Por ejemplo se menciona que el calcio intracelular activa complejos enzimáticos y proto-oncogenes que hacen que los cambios de excitabilidad de estas células sean a largo plazo (LTP), si no es que permanentes. Uno de estos cambios a largo plazo es el aumento de factor de crecimiento neuronal ¹³¹ que promueve la formación de nuevos contactos sinápticos de las fibras musgosas con dendritas de células granulosas ^{124, 133, 134}. Este hecho podría servir de base al fenómeno denominado Sprouting y que representa un significativo cambio morfológico y de plasticidad. De esta forma se establecen circuitos de excitación recurrente los cuales son muy importantes porque amplifican los efectos de los fenómenos electrofisiológicos establecidos en el tejido excitable que se. Y por otro lado inducen los mismos cambios en las neuronas normales que rodean al foco epiléptico permitiendo la propagación de la actividad convulsiva.

5 CONCLUSIONES

- La estimulación eléctrica iterativa de la corteza entorrinal (kindling) provocó cambios en la excitabilidad de las neuronas del giro dentado. No obstante de que la aplicación de los estímulos eléctricos no se hicieron cada 24 Hrs, sino cada 60 minutos, los cambios observados en la excitabilidad neuronal fueron significativos y permanentes. Por esta razón pensamos, que desde el punto de vista metodológico, el procedimiento es bueno para obtener cambios permanentes en la excitabilidad neuronal de manera rápida, es decir que obtuvimos un kindling-agudo.

- No hubo diferencias estadísticamente significativas en la evolución del kindling del giro dentado cuando se estimuló directamente, o bien cuando se estimuló la corteza entorrinal. Esto significa que se provocan los mismos cambios de excitabilidad en el giro dentado por estimulación de la corteza entorrinal o de manera directa.

- Estos cambios en la excitabilidad neuronal se obtuvieron de manera más eficiente y rápida al coactivar la mayor parte de las aferencias del giro dentado.
- Durante el transcurso de la estimulación eléctrica se observó un aumento en la amplitud de los EPSP en forma progresiva. Este aumento se mantuvo estable durante largos periodos de tiempo. Este fenómeno se comporta igual al de la LTP.
- En las 15 primeras estimulaciones se dio el fenómeno de desinhibición reversible que muy posiblemente se correlaciona con alteraciones celulares que no implican una lesión grave por lo que al suspender la estimulación el efecto se revierte.
- En las últimas estimulaciones, también se dio el fenómeno de desinhibición pero en forma irreversible debido muy posiblemente a que el daño celular es severo y por lo tanto irreversible.
- Por la aplicación tanto sistémica como local de antagonistas al GABA y glicina, se presentaron cambios en la excitabilidad neuronal y el fenómeno de desinhibición. Sin embargo, estos cambios fueron reversibles como en las

primeras etapas del kindling.

En conclusión, pensamos que la generación de la actividad paroxística se debe a la aparición de un proceso de potenciación a largo plazo. Este fenómeno de potenciación determina una significativa disminución en la inhibición. Esta disminución en la inhibición determina así mismo, la aparición del fenómeno de desinhibición. Esta desinhibición es la responsable del aumento de la excitabilidad neuronal que está íntimamente relacionada con cambios en la conductancia de la membrana a varios iones. De estos, creemos que el ion calcio juega un papel muy significativo ya que es conocida su acción citotóxica cuando entra masivamente al interior de la célula. Consideramos que con los resultados obtenidos en este trabajo se abren nuevas posibilidades de estudio del fenómeno convulsivo. Por ejemplo, los futuros experimentos estarán encaminados a tratar de dilucidar la participación específica del ión calcio en relación a los cambios de conductancia. Así mismo tratar de dilucidar los cambios morfológicos en el tejido excitable que expliquen de manera más objetiva los posibles cambios neuronales presentes en la generación y propagación de la actividad convulsiva.

REFERENCIAS

1. Commission for the Control of Epilepsy and its Consequences. Dhrew Publication No. (NIH) 78-276, 1978.
2. Commission on Classification and Terminology, International League Against Epilepsy. Proposed revisions of clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. Epilepsia 2:480-501, 1981.
3. Compendio de estadísticas vitales de México, Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1975.
4. Escobedo Ríos, F., Rubio Donnadieu, F. Otero, E., Rivas Alcalá, R., y Martínez Contreras. Epidemiología de la Epilepsia. 105:155-165, 1973.
5. Faingold, C.L., Hoffman, W.E., y Caspary, D.M. Effects of iontophoretic application of convulsants on the sensory responses of neurons in the brain stem reticular formation. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 58:55-64, 1984.
6. Ajmone Marsan, C. Acute effects of topical epileptogenic agents. En: BASIC MECHANISMS OF THE EPILEPSIES (H.H. Jasper, A.A. Ward, Jr., y A. Pope, eds) Little Brown and Company, Boston, 1969.
7. Prince, D.A. Neurophysiology of epilepsy. Ann. Rev. Neurosci. 1:395-415, 1978.
8. Calvin, W.H., Ojemann, G.A., y Ward Jr., A.A. Human cortical neurons in epileptogenic foci: Comparison of inter-ictal firing patterns to those of "epileptic" neurons in animals. Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 34:337-351, 1973.
9. Prince, D.A., y Wong, R.K.S. Human epileptic neurons studied in vitro. Brain Res. 210:323-333, 1981.
10. Johnson, B. Strychnine paroxysms in brain stem, I. Anatomical distribution. J. Neurophysiol. 18:189-199, 1955.
11. Faingold, C.L. Strychnine effects on the sensory response patterns of reticular formation neurons. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 50:102-111, 1980.
12. Faingold, C.L. Convulsant-induced enhancement of non-primary sensory evoked responses in reticular formation pathways. Neuropharmacology. 16:73-81, 1977.

13. Bradley, P.B., Easton, D.M., y Eccles, J.C. An investigation of primary or direct inhibition. J. Physiol. 122:474-488, 1953.
14. Curtis, D.R. The pharmacology of spinal postsynaptic inhibition. Prog. Brain Res. 31:171-189, 1969.
15. Curtis, D.R., Duggan, A.W., y Johnston, G.A.R. The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal cord. Exp. Brain Res. 12:547-565, 1971.
16. Hosli, L. y Tebecis, A.K. Actions of amino acids and convulsants on bulbar reticular neurones. Exp. Brain Res. 11:111-127, 1970.
17. Tebecis, A.K. y DiMaria, A. Strychnine-sensitive inhibition in the medullary reticular formation: Evidence for glycine as an inhibitory transmitter. Brain Res. 40:373-383, 1972.
18. Haas, H.J., y Hosli, L. Strychnine and inhibition of bulbar reticular neurones. Experientia. 29:542-544, 1973.
19. Martin, R.J. Glycine and GABA induced conductance changes in lamprey reticulospinal neurons and their antagonism by strychnine, the baine, bicuculline and picrotoxin. Comp. Biochem. Physiol. 63C:109-115, 1979.
20. Barker, J.L., McBurney, R.N., y Mathers, D.A. Convulsant-induced depression of amino acid responses in cultured mouse spinal neurons studied under voltage clamp. Br.J. Pharmacol. 80:619-629, 1983.
21. Young, A.B. y Snyder, S.H. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. 70:2832-2836, 1973.
22. Zarbin, M.A., Wamsley, J.K., y Kuhar, M.J. Glycine receptor: Light microscopic autoradiographic localization with [³H]strychnine. J. Neurosci. 1:532-547, 1981.
23. Tribble, G.L., Schwindt, P.C., y Crill, W.E. Reduction of postsynaptic inhibition tolerated before seizure initiation: spinal cord. Exp. Neurol. 80:288-303, 1983.
24. Freeman, A.R. Electrophysiological analysis of the actions of strychnine, bicuculline and picrotoxin on the axonal membrane. J. Neurobiol. 4:567-582, 1973.

25. Klee, M.R., Faber, D.S., y Hoyer, J. Strychnine and pentylenetetrazol induced changes of excitability in Aplysia neurons. Science. 179:1133-1136, 1973.
26. Shapiro, B.I., Wang, C.M., y Narahashi, T. Effects of strychnine on ionic conductances of squid axon membrane. J. Pharmacol. Exp. Ther. 188:66-76, 1974.
27. Davidoff, R.A. Studies of neurotransmitter actions (GABA, Glycine, and Convulsants). En: Epilepsy (A. A. Ward, Jr., J. K. Penry, y D. Purpura, eds) Raven, New York, 1983.
28. Alid, G., Valdes, L.F., y Orrego, F.J. Strychnine as an anticholinesterase: In vitro studies with rat brain enzymes. Experientia 30:266-268, 1974.
29. Young, A.B., Zukin, S.R., y Snyder, S.H. Interaction of benzodiazepines with central nervous glycine receptors: Possible mechanism of action. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2246-2250, 1974.
30. Welch, A.D. y Henderson, V.E. A comparative study of hydrastine, bicuculline and adlumine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 51:482-491, 1934.
31. Loscher, W. y Frey, H.H. Effect of convulsant and anticonvulsant agents on level and metabolism of gamma-aminobutyric acid in mouse brain. NS Arch. Pharmacol. 296: 263-269, 1977.
32. Greenwood, R.S., Goddar, S.E., y Winstead, K.K. Focal penicillin seizures-motor activity and cellular physiology and morphology. Brain Res. Bull. 11:91-101, 1983.
33. Goddard, G.V., McIntyre, P.C., Leech, D.K. A Permanent Change in Brain Function Resulting From daily Electrical Stimulation. Expl. Neurol. 25:295-330, 1969.
34. Schmutz, M. Relevance of Kindling and Related Process to Human Epileptogenesis. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat. 11:505-525, 1987.
35. Engel, J.Jr., Cahan, L. Potential Relevance of Kindling to Human Partial Epilepsy. Kindling. pag. 37-51, 1986.
36. Goddard, G.V., Maru, E., Kairiss, B.W. The Kindling Effect and Epilepsy. Neurosurgeons 5:213-226, 1987.

37. Schwark, W.S., Hatuska, M. Prophylaxis of Amygdala Kindling-induced Epileptogenesis: Comparison of a GABA uptake Inhibitor and Diazepam. Epilepsy Res. 1:63-69, 1987.
38. Fitz, J.G., McNamara, J.O. Spontaneous Interictal Spiking in the Awake Kindled Rat. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. 47:592-596, 1979.
39. Pinel, F.P.F., Rovner, L.I. Electrode Placement and Kindling Induced experimental Epilepsy. Expl. Neurol. 58:335-346, 1978.
40. Albright, P.S., Burnham, W.M. Development of a New Pharmacological Seizure Model: Effects of Anticonvulsants on Cortical and Amygdala-Kindled Seizures in the Rat. Epilepsia. 21:681-689, 1980.
41. Sharvan, S.D., Reynolds, E.M. Early Prognosis of Epilepsy. Brit. Med. J. 285:1699-1701, 1982.
42. Ribak, Ch. E. Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci. Brain Research 326:251-260, 1985.
43. Racine, R.J., Gardner, F.G., Burnham, W.M. Epileptiform Activity and Neuronal Plasticity in Limbic Structures. Brain Res. 47:262-268, 1972.
44. Wada, J.A. y Sato, M. Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of the amigdala in cats. Neurol. 24:565-574, 1974.
45. Morimoto, K., Goddard, G.V. Kindling Induced Changes in EEG Recorded During Stimulation From the Site of Stimulation. Expl. Neurol. 28:1-10, 1987.
46. De Jonge, M., Racine, R.J. The Development and Decay of Kindling-Induced Increases in Paired-Pulse Depression in the Dentata Gyrus. Brain Res. 412:318-328, 1987.
47. Vosu, H., Wise, R.A. Cholinergic Seizure Kindling in the Rat: Comparison of Caudate, Amygdala, and Hippocampus. Neurosci. Lett. 13:491-495, 1975.
48. Wasterlain, C.G., Jonec, V. Chemical Kindling by Muscarinic Amygdaloid Stimulation in the Rat. Brain Res. 271:311-323, 1983.
49. Arnold, P.S., Racine, R.J., Wise, R.A. Effects of Atropine, Reserpine, 6-hydroxy dopamine, and Handling on Seizure Development in the Rat. Exp. Neurol. 40:457-470, 1973.

50. Albright, P.S., Burnham, W.M., Okazake, M. **Effect of Atropine Sulfate on Amygdaloid Kindling in the Rat.** Exp. Neurol. 66:409-412, 1979.
51. Foote, F., Gale, K. **Morphine Potentiates Seizures Induced by GABA Antagonists and Attenuates Seizures Induced by Electroshock in the Rat.**, Eur. J. Pharmacol. 95:259-264, 1983.
52. Wang, R.Y., Aghaganian, G.K. **Inhibition of Neurons in the Amygdala by Dorsal Raphe Stimulation.** Brain Res. 120:85-102, 1977.
53. Segal, M., Bloom, F.E. **The Action of Norepinephrine in the Rat Hippocampus. II Activation of the Input Pathway.** Brain Res. 107:499-511, 1976.
54. Corcoran, M.E., Maso, S.T. **Role of Forebrain Catecholamines in Amygdaloid Kindling.** Brain Res. 190:473-484, 1980.
55. Ehlers, C.L., Clifton, D.K., Sawyer, C.H. **Facilitation of Amygdaloid Kindling in the Rat by Transecting Ascending Noradrenergic Pathways.** Brain Res. 189:274-278, 1980.
56. McIntyre, D.C., Edson, N. **Facilitation of Amygdala Kindling After Norepinephrine Depletion with 6-hydroxydopamine in Rats.** Exp. Neurol. 74:748-757, 1981.
57. Gee, K.W., Killam, E.K., Hollinger, M.A. **Effects of Haloperidol Induced Dopamine Receptor supersensitivity on Kindled Seizure Development.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 225:70-76, 1983.
58. Sato, M., Hikasa, N., Otsuke, S. **Experimental Epilepsy, Psychosis and Dopamine Receptor Sensitivity.** Bio. Psychiat. 14:537-540, 1979.
59. Callaghan, D.A., Schwark, W.S. **Involvement of Catecholamines in Kindled Amygdaloid Convulsions in the Rat.** Neuropharmacology 18:541-545, 1979.
60. Stock, G., Kummer, P., Sstumpf, H., Zenner, K., Sturm, V. **Involvement of Dopamine in Amygdaloid Kindling.** Exp. Neurol. 80:439-450, 1983.
61. Araki, H., Wtanabe, H.S., Ohta, H., Yamamoto, T., Ueki, S. **The role of Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Hippocampal Kindling Effect.** Jpn. J. Pharmacol. 33:57-64, 1983.

62. Araki, H., Aihara, H., Watanabe, S., Yamamoto, T., Weki, S. Effects of Reserpine, and α -methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine on the Hippocampal Kindling Effect in Rats. Jpn. J. Pharmacol. 33:1177-1182, 1983.
63. Racine, R., Coscina, D.V. Effects of midbrain raphe lesions or systemic p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. Brain Res. 4:1-7, 1979.
64. Watson, S.J., Khachaturian, H., Akil, H., Coy, D.H., and Goldstein, A. Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. Science. 218:1134-1136, 1982.
65. Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., and Fernandez-Guardiola, A. Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. Neurosci. Lett. 21:39-43, 1981.
66. Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., and Fernandez-Guardiola, A. Brain content of Leu⁵ - and - Met⁵ -enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. Neurosci. Lett. 26:125-130, 1981.
67. Talavera E., Omana-Zapata I., Asai M., Condes-Lara M. Regional Brain IR-MET-, IR-LEU-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. Brain Res. 485(1):141-148, 1989.
68. Albertson, T.E., Bowyer, J.F., and Paule, M. G. Modification of kindled amygdaloid seizures by opiate agonists and antagonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. 228:620-627, 1984.
69. Frenk, H., Engel, J., Jr., Ackermann, R.F., Shavit, Y., and Liebeskind, J.C. Endogenous opioids may mediate post-ictal behavioral depression in amygdaloid-kindled rats. Brain Res. 167:435-440, 1979.
70. Morin, A.M. Ro 15-1788 suppresses the development of kindling through the benzodiazepine receptor. Brain Res. 397:259-264, 1986.
71. Santori, E.M., and Collins, R.C. Effects of chronic cortical seizures on GABA and benzodiazepine receptors within seizure pathways. Brain Res. 442:261-269, 1988.
72. King, P.H., Shin, C., Mansbach, H.H., Chen, L.S., and McNamara, J.O. Microinjection of a benzodiazepin into substantia nigra elevates kindled seizure threshold. Brain

Res. 423:261-268, 1987.

73. Wise, R.A., and Chinerman, J. Effects of diazepam and phentobarbital on electrically-induced amygdaloid seizures and seizure development. Expl. Neurol. 45:355-363, 1974.
74. Racine, R., Livingston, K., and Joaquin, A. Effects of procaine hydrochloride, diazepam and diphenylhydantoin on seizure development in cortical and subcortical structures in rats. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 38:355-365, 1975.
75. Kalichman, M.W., Livingston, K. E., and Burnham, W.M. Pharmacological investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and the development of amygdala-kindled seizures in the rat. Expl. Neurol. 74:829-836, 1981.
76. Loscher, W., Czuczwar, S.J., Jackel, R., and Schwarz, M. Effect of microinjections of gamma-vinyl GABA or isoniazid into substantia nigra on the development of amygdala kindling in rats. Exp. Neurol. 95:622-638, 1987.
77. Lothman, B.W., Bennett, J.P., and Perlin, J.B. Alterations in neurotransmitter amino acids in hippocampal kindled seizures. Epilepsy Res. 1:313-320, 1987.
78. Mody, I., and Heinemann, U. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. Nature 326:701-703, 1987.
79. Mody, I., Stanton, P.K., and Heinemann, U. Activation of N-methyl-D-Aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate gyrus granule cells after kindling. J. Neurophysiol. 59:1033-1054, 1988.
80. Goddard, G.V., and Douglas, R.M. Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory?. Can. J. Neurolog. Neurosci. 2:295-330, 1975.
81. Bliss, T.V.p., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232:331-356, 1973.
82. Bliss, T.V.P., Gardner-Medwin, A.R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232:357-273, 1973.

83. Wilson, R., Levy, W.B., Steward, O. Functional effects of lesion-induced plasticity: Long-term potentiation in the normal and lesion-induced temporodentate circuits. Brain Res. 176:65-78, 1979.
84. McNaughton, B.L., Miller, J.J. Medial septal projections to the dentate gyrus of the rat: Electrophysiological analysis of distribution and plasticity. Exp. Brain Res. 56:243-256, 1984.
85. Racine, R.J., Milgram, N.W., Hafner, S. Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. Brain Res. 260:217-231, 1983.
86. Doller, H.J., Wight, F.F. Perforant pathway-evoked long-term potentiation of CA1 neurons in the hippocampal slice preparation. Brain Res. 333:305-310, 1985.
87. Gerren, R.A., Weinberger, N.M. Long-term potentiation in the magnocellular medial geniculate nucleus of the anesthetized cat. Brain Res. 265:138-142, 1983.
88. Komatsu, Y., Toyama, K., Maeda, J., Sakaguchi, H. Long-term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kittens. Neurosci. Lett. 26:269-274, 1981.
89. Voronin, L.L. Synaptic plasticity at archicortical and neocortical levels. Neirofiziolgiya 16:651-665, 1985.
90. Stripling, J.S., Patneau, D.K., Granlich, C.A. Long-term changes in the pyriform cortex evoked potential produced by stimulation of the olfactory bulb. Soc. Neurosci. Abstr. 10:A26.6, 1984.
91. Libet, B., Kobayashi, H., Tanaka, T. Synaptic coupling into the production and storage of a neuronal memory trace. Nature 258:155-157, 1975.
92. Lewis, D., Teyler, T.J. Long-term potentiation in the goldfish optic tectum. Brain Res. 375:246-250, 1986.
93. Larson, J.R., Lynch, G. Long-term potentiation in lizard cerebral cortex. Soc. Neurosci. Abstr. 11:A225.2, 1985.
94. Walters, E.T., Byrne, J.H. Long-term enhancement produced by activity-dependent modulation of Aplysia sensory neurons. J. Neurosci. 5:662-672, 1985.

95. Harris, K.M., Teyler, T.J. Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. J. Physiol. 346:27-48, 1984.
96. Baudry, M., Arst, O., Oliver, M., Lynch, G. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. Dev. Brain Res. 1:37-48, 1981.
97. Wilson, D.A. A comparison of the postnatal development of post-activation potentiation in the neocortex and dentate gyrus of the rat. Dev. Brain Res. 16:61-68, 1984.
98. Duffy, C.J., Teyler, T.J. Development of potentiation in the dentate gyrus of rat: Physiology and anatomy. Brain Res. Bull. 3:425-430, 1978.
99. Bliss, T.V.P., and Lynch, M.A. Long-term potentiation: From biophysics to behaviour., Landfeld, P.W., and Deadwyler, S.A., Eds. Liss, New York, 1988, p.3.
100. Brown, T.H., Chang, V.C., Ganong, A.H., Keenan, C.L., Kelso, S.R. In long-term potentiation: From biophysics to behaviour., Landfeld and Deadwyler, Eds. (Liss, New York, 1988), p.197.
101. Briggs, C.A., Brown, T.H. McAfee, D.A. Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion. J. Physiol. (London) 359:503-521, 1985.
102. McNaughton, B.L., Douglas, R.M., Goddard, G.V. Medial septal projections to the dentate gyrus of the rat: Electrophysiological analysis of distribution and plasticity. Exp. Brain Res. 56:243-256, 1984.
103. Kelso, S.R., Ganong, A.H., Brown, T.H. Hebbian synapses in hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83(14):5326-5330, 1986.
104. Collingridge, G.L., and Bliss, T.V.P. NMDA receptors- their role in long-term potentiation. Trends Neurosci. 10(7):288, 1987.
105. Monaghan, D.T., and Cotman, C.W. J. Neurosci. 5:2909, 1985.
106. Jahr, C.E., and Stevens, C.F. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. Nature 325:522-525, 1987.

107. Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature 309:261-263, 1984.
108. Kelso, S.R., and Brown, T.H. Differential conditioning of associative synaptic enhancement in hippocampal brain slices. Science 232:85-87, 1986.
109. Malinow, R., and Miller, J.P. Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. Nature 320:529-530, 1986.
110. Dunwiddie, T.V., and Lynch, G. The relationship between extracellular calcium concentration and the induction of hippocampal long-term potentiation. Brain Res. 169:103-110, 1979.
111. Akers, R.F., Lovinger, D., Colley, P., Linden, D., Routtenberg, A. Kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. Science 231:587-589, 1986.
112. Madison, D.V., Malinow, R., Tsien, R.W. Inhibitors of protein kinase C block long-term potentiation in rat hippocampal slices. J. Physiol. (London) 398:18P-19P, 1988.
113. Baudry, M., Larson, J., Lynch, G. In Long-term potentiation: From Biophysics to behaviour. Landfield, P.W., and Deadwyler, S.A., Eds. (Liss, New York, 1988), p.109.
114. Lisman, J.E. A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover: a bistable autophosphorylating kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82(9):3055-3057, 1985.
115. Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., Bell, R.M. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. J. Biol. Chem. 261(27):12604-12609, 1986.
116. Morgan JL, Cohen DR, Hemstead JL, Cuffan T, Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure, Science 234:80-83, 1987.
117. Dragunow M., Robertson HA., Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus, Nature, 329:441-442, 1987.
118. Dragunow M., Robertson HA., Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons, Brain Res., 440:252-260, 1988.

119. Represa A., Tremblay E., y Ben-Ari Y., **Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity**, Neuroscience, 20:739-748, 1987.
120. Nadler JV., Perry BW., Gentry C., y Cotman CW, **Fate of the hippocampal mossy fiber projection after destruction of its postsynaptic targets with intraventricular kainic acid**, J. Comp. Neurol., 196:549-569, 1981.
121. Frotscher M., y Zimmer J., **Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique**, J. Comp. Neurol., 215:299-311, 1983.
122. Sutula T., Xiao-Xian H., Cavazos J., y Scott G., Science, 239:1147-1150, 1988.
123. Represa A., Le Gal La Salle G., y Ben-Ari Y., **Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats**, Neurosci. Lett., 99:345-350, 1989.
124. Lanerolle NC., Kim JH., Robbins RJ., y Spencer DD., **Dose-dependent phorbol ester facilitation or blockade of hippocampal long-term potentiation: relation to membrane/cytosol distribution of protein kinase C activity**, Brain Res., 495:387-395, 1989.
125. Sutula T., Cascino G., Cavazos J., Parada I., y Ramirez L., **Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe**, Ann. Neurol., 26:321-330, 1989.
126. Houser CR., J. Neurosci., 10:267-282, 1990.
127. Dragunow M., y Robertson HA., **Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus**, Nature, 329:441-442, 1987.
128. Le Gal La Salle G., **Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus**, Neurosci. Lett., 88:127-130, 1988.
129. Morgan JI., y Curran T., Trends neurosci., 12:459-462, 1989.
130. Gall CM., y Isackson PJ., **Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor**, Science, 245:758-761, 1989.
131. Schwab ME., Otten Y., Agid Y., y Thoensen H., Brain Res., 168:473-483, 1979.

132. Snider WD., Neurosci. Lett., 8:2628-2634, 1988.
133. Gähwiler Bh., Enz A., y Hefti F., Nerve growth factor promotes development of the rat septo-hippocampal cholinergic projection in vitro, Neurosci. Lett., 75:6-10, 1987.
134. Springer JE., y Loy R., Intrahippocampal injection of antiserum to nerve growth factor inhibit symphathohippocampal sprouting, Brain Res. Bull., 15:629-634, 1985.
135. Tothman SM., Olney JW., Excitotoxicity and the NMDA receptor, Trends in Neurosci., 10:299-302, 1990.
136. Griffiths T., Evans MC., Meldrum BS., Intracellular calcium accumulation in rat hippocampus during seizures induced by bicuculine or L-allylglicine, Neurosci., 10:385-395, 1983.
137. Alney JW., Collins RC., Sloviter RS., Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage En: Delgado-Escueta AV., Ward AA Jr., Woodbury DM., Porter RJ., eds. Advances in Neurology, New York, Raven Press 44:857-877, 1986.
138. Spielmeyer W., Die Pathogenese des epileptischen Krampfes, Z. ges. Neurol. Psychiat., 109:501-520, 1927.
139. Mouritzen Dam A., Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures, Acta Neurol. Scand., 66:601-642, 1982.
140. Mary, E., and Goddard, G.V. Alteration in dentata neuronal activities associated with perforant path kindling, long term potentiation of excitatory synaptic transmission., Expl. Neurol. 96:19-32, 1987.
141. Sutula, T., and Steward, O. Facilitation of kindling by prior induction of long-term potentiation in the perforant path. Brain Res. 420:109-117, 1987.
142. Racine, R.J., Milgram, N.W., and Hafner, S. Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. Brain Res. 260:217-231, 1983.
143. Gilbert, M.E., and Cain, D.P. A developmental study of kindling in the rat. Dev. Brain Res. 2:321-328, 1981.
144. Baudry, M., Arst, D., Aliver, M., and Lynch, G. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. Dev. Brain Res., 1:37-48, 1981.

145. Lynch, G., Halpain, S., and Baudry, M. Effects of high-frequency synaptic stimulation on glutamate receptor binding studies with a modified in vitro hippocampal slice preparation. Brain Res. 244:101-111, 1982.
146. Barnes, C. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol. 93(1):74-104, 1979.
147. Racine, R. Kindling: the first decade. Neurosurgery 3(2):234-252, 1978.
148. Staubli, U. and Lynch, G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation. Brain Res. 435:227-234, 1987.
149. De Jong, M., and Racine, R., Brain Res. 328:181-185, 1985.
150. Roberts, E. Epilepsy and antiepileptic drugs: A speculative synthesis. In: Antiepileptic drugs: Mechanisms of action. Edit. Glaser, G.H., Penry, J.K., and Woodbury, D.M. pp.667-713, Raven Press, New York.
151. Roberts, E. Roles of GABA neurons in information processing in the vertebrate CNS. En: Neuronal Information Transfer, edit. Karlin, A., Tennyson, V.M., Vogel, H.J., pages 213-239, Academic Press, Orlando, Fla., 1978.
152. Stelxer, A., Slater, N.T., and Ten Bruggencate, G. Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. Nature 326:698-701, 1987.
153. Dingledine, R., and Gjerstad, L. Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. J. Physiol. Lond. 305:297-313, 1980.
154. Hablitz, J.J. Picrotoxin-induced epileptiform activity in hippocampus: role of endogenous versus synaptic factors. J. Neurophysiol. 51:1011-1027, 1984.
155. Woodbury, D.M. Convulsant drugs: mechanisms of action. En: Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action. Edit. Glaser, G.H., Penry, J.K., Woodbury, D.M., New York: Raven, 1980, cap 15, pages 249-304.
156. Lloyd, K.G., Munari, C., Bossi, L., and Morselli, P.L. Neurochemical evidence for the GABA hypothesis of human epilepsy. en: Advances in Epileptology, XVth Epilepsy Int. Symp., Edit. Porter, R.J., Porter, R. H., Mattson, A.A., Ward,

- Jr., and M. Dams., New York. Raven 1984, p. 3-7.
157. Ribak, C.E., Bradburne, R.M., and Harris, A.B. A preferential loss of GABAergic, symmetric synapses in epileptic foci: a quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. J. Neurosci. 2:1725-1735, 1983.
 158. Ribak, C.E., Hunt, C.A., Bakay, R.A.W., and Oertel, W.H. A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci. Brain Res. 363:78-90, 1986.
 159. Sloviter, R.S. "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I Acute electrophysiological and light microscopic study. Brain Res. Bull. 10:675-697, 1983.
 160. Sloviter, R.S., and Damiano, B.P. Sustained electrical stimulation of the perforant path duplicates kainate induced electrophysiologic effects and hippocampal damage in rats. Neurosci. Lett. 24:229-284, 1981.
 161. Ashwood, T.J., and Wheal, H.V. Loss of inhibition in the CA1 region of the kainic acid lesioned hippocampus is not associated with changes in postsynaptic responses to GABA. Brain Res. 367:390-394, 1986.
 162. Fisher, R.S., and Alger, B.E. Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. Neurosci. 4:1212-1223, 1984.
 163. Lancaster, B., and Wheal, H.V. Chronic failure of inhibition of the CA1 area of the hippocampus following icv kainic acid lesions of the CA3/4 area. Brain Res. 295:317-324, 1984.
 164. Ramón y Cajal S. Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. Ann. Soc. Esp. Hist. Nat. 22, 1892.
 165. Lorente de No, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. I. the area entorhinalis. J. Psychol. Neurol. 45: 381-438, 1933.
 166. Lorente de No, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II continuation of the study of the ammonic system. J. Psychol. Neurol. 46:113-177, 1934.
 167. Blackstad T.W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. J. Comp. Neurol. 105:417-537, 1956.

168. Blackstad T.W. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. An experimental study in the rat. Acta Anat. 35:202-214, 1958.
169. Raisman G., Cowan W.M y Powell T.P.S. The extrinsic afferent, commissural and association fibers of the hippocampus. Brain 88: 963-997, 1965.
170. Hjorth-Simonsen A. y Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. J. comp. Neurol. 144:215-231, 1972.
171. Nafstad P.H.J. An electron microscope study on the termination of the perforant path fibers in the hippocampus and the fascia dentata. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 76: 532-542, 1965.
172. Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. J. Comp. Neurol. 167:285-314, 1976.
173. Witter M. P., Griffioen A.W., Jorritsma-Byham B. y Krijnen J.L.M. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. Neurosci. Lett. 85: 193-198, 1988.
174. Blackstad T.W., Brink K., Hem, J. y Jeune B. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. J. comp. Neurol. 138: 433-450, 1970.
175. Claiborne B.J., Amaral D.G. y Cowan W.M. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 246:435-458, 1986.
176. Gaarskjaer F.B. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi, I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. J. Comp. Neurol. 178:49-72, 1978.
177. Gaarskjaer F.B. The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. Brain Res. 392:335-357, 1986.
178. Amaral, D.G. A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. J. Comp. Neurol. 182: 851-914, 1978.
179. Ribak, C.E., Seress, L. and Amaral D.G. Development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. J. Neurocytol. 14:835-857, 1985.

180. Swanson, L.W., Sawchenko, P.E. and Cowan, W.M. Evidence that the commissural, associational and septal projections of the region inferior of the hippocampus arise from the cell neurons. Brain Res. 197:207-212, 1980.
181. Swanson, L.W., Sawchenko, P.E. and Cowan, W.M. Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. J. Neurocit. 1:548-559, 1981.
182. Paxinos, G. and Watson, Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Sydney, Australia, 1982.
183. Gloor, P. Generalized epilepsy with spike-and-wave discharge: a reinterpretation of its electrographic and clinical manifestations. Epilepsia 20:571-588, 1979.
184. Gloor, P. Electrophysiology of generalized epilepsy in: Schwartzkroin, P.A., Wheal, H. eds. Electrophysiology of epilepsy. Academic Press. London, pag 107-136, 1984.
185. Yamamoto C., Sawada S, Important factors in induction of long-term potentiation in thin hippocampal sections, Esp. Neurol., 74:122-130, 1981.
186. Wilson RC, Levy WB, Steward O, Changes in translation of synaptic excitation to dentate granule cell discharge accompanying long-term potentiation. II An evaluation of mechanisms utilizing dentate gyrus dually innervated by surviving ipsilateral and sprouted crossed temporodentate inputs, J. Neurophysiol. 46:324-338, 1981.
188. Racine R, Modification of seizure activity by electrical stimulation: I After-discharge threshold. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32:269-279, 1972.
189. Schramka M, Sedlak P, Nadvomik P, Observation of kindling phenomenon in treatment of pain by stimulation in thalamus. En: Neurological treatment in psychiatry, pain and epilepsy, Sweet WA, eds. pp 651-654, University Park Press, USA, 1977.
190. Dennison Z, Cain D, Soc. Neurosci, Abstr. 13:751, 1987.
191. Holmes K, Goddard G, Proc. Univ Otago Med School. 64:37-38, 1986.
192. Brown WJ, Structural Substrate of seizure foci in human temporal lobe. En: Epilepsy, its phenomeno in man. Brazier HAB eds., pp 339-374, 1973.
193. Racine RJ, DeJunge M, In long-term potentiation: from biophysics to behavior, Landfiel, Deadwyler eds. LISS, New

196. Polc P, Bonetti EP, Schaffner R, and Haefely W, A three model of the benzodiazepine receptor explains the interaction between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, beta-carbolines, and phenobarbitone. Naunyn-Schmiedeberg. Arch. Pharmacol., 321:200-264, 1982.
197. Guzmán Flores CM, Alcaraz M y Fernández Guardiola A, Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology, Biol. Inst. Estud. Med. Biol., 16:26-31, 1958.
198. Alemán-Alemán V, Martínez de Muñoz D, Effect of different convulsant drugs on some seizure parameters in morphine dependent mice, Exp. Neurol. 80:451-456, 1983.
199. Hill RG, Simmonds MA, and Straughan D, Antagonism of γ -aminobutyric acid and glycine by convulsants in the cuneate nucleus of cat, Br. J. Pharmacol., 56:9-19, 1976.
200. Simmonds MA, Classification of some GABA antagonist with regard to site of action and potency in slices of rat cuneate nucleus, Eur. J. Pharmacol. 80:347-358, 1982.
201. Faber DS and Klee MR, Strychnine interaction with acetylcholine dopamine and serotonin receptors in Aplysian neurons, Brain Res. 65:109-126, 1974.
202. Phillis JW and Yark DA, Strychnine block of neural and drug induced inhibition in the cerebral cortex, Nature 216:922-923, 1967.
203. Simmonds MA, Presynaptic actions of γ -aminobutyric acid and some antagonist in a slice preparation of cuneate nucleus, BR. J. Pharmacol. 63:495-502, 1978.
204. Simmonds MA, Evidence that bicuculine and picrotoxin act at separate sites to antagonize γ -aminobutyric acid in rat cuneate nucleus, Neuropharmacology 19:39-45, 1980.
205. DeFeudis FU, Do different populations of GABA receptor exist in the vertebrate CNS? Neurochem. Int. 5:175-183, 1983.
206. Fariello RG, Parenteral penicillin in rats: An experimental model of multifocal epilepsy, Epilepsia 17:217-222, 1976.
207. Dingledine R and Gjerstad L, Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice, J. Physiol. 305:297-313, 1980.

208. Rothman SM, Olney JW, Excitotoxicity and de NMDA receptor, Trend in Neurosci. 10:299-302, 1990.
209. Research Biochemicals Incorporated (RBI), **Neurochemicals for the neuroscientist**, pag. 88, catalogo de 1991.