

# Modelos experimentales de epilepsia

## I. Introducción

AUGUSTO FERNANDEZ GUARDIOLA\*

Algunas enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) nos han enseñado mucho sobre su desarrollo y funcionamiento. La correlación anatómo-funcional y clínica -así como las respuestas a diferentes terapéuticas- han esclarecido muchos aspectos, principalmente localizacionistas y de distribución de neurotransmisores. Así supimos, por ejemplo, donde se encontraban en el SNC las áreas de integración de la motilidad, las de proyección sensorial y las de percepción y emisión del lenguaje.

Sin embargo, estas correlaciones no son suficientes para establecer con seguridad la naturaleza del trastorno, puesto que en muchos padecimientos es difícil, o hasta ahora imposible establecer la alteración del SNC que le dio origen. Tal sucede con un gran número de síndromes epilépticos o epilepsias como los denominaremos en adelante. Este problema se ha intentado resolver a través de la creación de modelos animales experimentales. Los de las epilepsias han sido numerosísimos. Este padecimiento es el que más modelos ha originado entre todas las enfermedades. Tal vez esto se deba a la extraordinaria excitabilidad del cerebro, siendo relativamente fácil hacer que un grupo de neuronas responda en una forma exagerada, paroxística, ante una estimulación intensa. Además estos paroxismos pueden medirse mediante el electroencefalograma (EEG) y directamente colocando finos electrodos en el tejido nervioso en la vecindad de las neuronas o en su interior. Por otra parte, las características de los paroxismos y alteraciones conductuales desencadenados experimentalmente van a variar mucho dependiendo sobre qué región del SNC se actúe. Como quiera que sea, lo cierto es que todos estos modelos de

epilepsia experimental están estrechamente ligados a los progresos en el conocimiento de la neurobiología cerebral.

En este simposio de la Academia Nacional de Medicina hemos tratado de ofrecer un panorama de diferentes enfoques experimentales y teóricos de estos modelos. Están representadas las perspectivas neuroquímica, neurofarmacológica y neurofisiológica, que en algunos modelos se imbrican en forma inextricable. Estos modelos que hoy presentamos incluyen las epilepsias generalizadas convulsivas, las crisis parciales (focales) simples, las crisis parciales de sintomatología compleja y un modelo de alteración neuronal de larga duración en sistema nervioso autónomo periférico.

## II. Modelos neuroquímicos de epilepsia experimental

RICARDO TAPIA\*

### Introducción

Desde el punto de vista neuroquímico, sin duda el foco de atención más interesante en cuanto a los mecanismos de la epilepsia experimental es el de las alteraciones en la función sináptica, ya que ésta constituye el proceso central de la comunicación interneuronal y por lo tanto del funcionamiento

Simposio presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el día 24 de octubre de 1990.

\*Académico titular. División de Investigaciones en Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría.

\*Académico titular. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

del sistema nervioso central (SNC). Esto se manifiesta claramente cuando se considera que la actividad de los circuitos neuronales depende del equilibrio entre las sinapsis excitadoras y las inhibitorias: si se incrementa la actividad de las primeras o disminuye la de las segundas, habrá una hiperexcitabilidad, que es una de las características definitorias de la aparición de la epilepsia.

Los dos sistemas de transmisión sináptica predominantes en el mantenimiento del equilibrio mencionado, sin que esto quiera decir que no participan ningún otro neurotransmisor, son la transmisión inhibitoria mediada por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la transmisión excitadora mediada por el ácido glutámico. De aquí que sea importante considerar las alteraciones en estos dos sistemas de transmisión sináptica y su relación con las epilepsias. Por otra parte, el  $Ca^{2+}$  parece jugar también un papel importante, ya el transporte de este catión a través de la membrana neuronal es determinante de algunos pasos de la transmisión sináptica, tanto a nivel pre como postsináptico. Además, un incremento de  $Ca^{2+}$  en el interior de las neuronas parece jugar un importante papel en la generación de las descargas epilépticas.

### Sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas

Como se mencionó, los dos sistemas de transmisión sináptica que, aunque no de manera exclusiva, parecen estar íntimamente relacionados con la actividad epiléptica, son la excitación sináptica mediada por el glutamato y la inhibición mediada por el GABA. En las sinapsis glutamatérgicas el glutamato, formado fundamentalmente por transaminación de varios aminoácidos con el  $\alpha$ -cetoglutarato, o por desaminación de la glutamina catalizada por la glutaminasa, es liberado por estimulación de la terminal presináptica. En contraste, en las sinapsis GABAérgicas el glutamato sirve como el precursor inmediato del GABA, mediante la reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa (GAD).<sup>1,3</sup> En ambos casos, como en el de cualquier transmisor sináptico en el SNC o periférico, se requiere que la molécula transmisora sea liberada al espacio sináptico y se combine con su receptor en la membrana de la neurona postsináptica.

De acuerdo con lo anterior, es posible disminuir la eficacia del funcionamiento de las sinapsis GABAérgicas, y por lo tanto producir una desinhibición de la neurona postsináptica correspondiente, mediante alguno de los siguientes mecanismos: a) disminución de la actividad de la GAD; b) bloqueo del receptor postsináptico; c) daño de la neurona GABAérgica; d) disminución de la liberación de GABA. Por otro lado, un aumento en la eficacia de la sinapsis glutamatérgica, y por tanto una hiperexcitación, se podrá producir por un incremento en la liberación de glutamato, o mediante una activación de su receptor postsináptico.

Los mecanismos de los que depende el equilibrio entre la excitación por sinapsis glutamatérgicas y la inhibición por sinapsis GABAérgicas, así como el papel del  $Ca^{2+}$  en la pre y la postsinapsis, se presentan de manera simplificada en la figura 1. El receptor postsináptico al GABA (conocido como receptor GABA<sub>A</sub> para diferenciarlo del GABA<sub>B</sub>, el cual parece ser presináptico y tiene propiedades farmacológicas diferentes), está íntimamente asociado a un canal que permite el paso de  $Cl^-$ , por lo que cuando se abre la neurona se hiperpolariza y por lo tanto se inhibe. Las drogas que funcionan como antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> o de su canal asociado, como la bicuculina y la picrotoxina respectivamente, son, como era de esperarse, potentes agentes convulsivantes.<sup>1</sup>

Los receptores postsinápticos al glutamato son también sensibles al aspartato y a otros aminoácidos ácidos (llamados por eso aminoácidos excitadores, AAE), y se clasifican en dos grandes tipos, sobre la base de sus propiedades farmacológicas: receptores NMDA y no-NMDA (Figura 1). El receptor NMDA reconoce específicamente al ácido N-metil-D-aspartico (de ahí sus siglas) y está asociado a un canal de  $Ca^{2+}$ . En cambio, existen al menos tres subtipos de receptores no-NMDA, que reconocen distintas drogas excitotóxicas y en general están asociados a un canal de  $Na^+$ .

Conviene en este punto describir otro tipo de canales de  $Ca^{2+}$ , que no están acoplados a receptores sino que se abren como respuesta a la despolarización de la membrana neuronal, y que por esta razón se denominan canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje (CCaSV). Como se señala en la Figura 1, existen CCaSV en la terminal presináptica, que se abren cuando el potencial de acción llega a la terminal. Como consecuencia, el  $Ca^{2+}$  penetra a ésta, y el incremento en su concentración dispara la liberación del transmisor. Sin embargo, en la membrana del soma neuronal también existen CCaSV, que son aparentemente diferentes de los que existen en las terminales.

Por su disposición y su papel fisiológico, es claro que estos dos tipos de CCaSV participan de manera fundamental en las alteraciones de tipo epiléptico. Si se bloquean o se estimula la apertura de los CCaSV presinápticos, se inhibe o se exagera, respectivamente, la liberación de los transmisores. ¿Qué tanto se afecta al GABA o al glutamato? sin embargo, dependerá de la condición basal de liberación de cada uno de ellos. Es decir, aquel que se libere de manera más continua o tónica se afectará más por bloqueadores de este canal (disminuirá su liberación), mientras que el que sea liberado de modo más intermitente o fásico será poco afectado por tales bloqueadores pero será más sensible (aumentará su liberación) por drogas que incrementen la apertura de estos canales. En el primer caso (liberación tónica) se encuentra el GABA y en el segundo (liberación fásica) el glutamato.

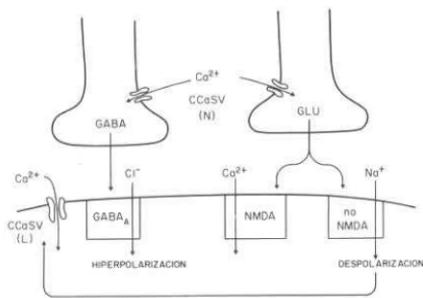


Fig. 1. Esquema del funcionamiento conjunto de las sinapsis excitadoras glutamatergicas y las inhibitorias GABAérgicas, actuando sobre una misma neurona. Cuando el potencial de acción alcanza la terminal presináptica, se abren los CCaSV tipo N y el  $Ca^{2+}$  penetra y dispara el mecanismo liberador del transmisor. En la región postsináptica, el complejo receptor-ionóforo de  $Cl^-$  deja pasar a este anión como respuesta a la unión del GABA y la neurona se hiperpolariza. En contraste, la unión del glutamato a sus receptores produce dos tipos de respuestas: la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  asociados al receptor NMDA, o de canales de  $Na^+$  asociados al receptor tipo no-NMDA. En el primer caso la célula aumenta su excitabilidad y genera los potenciales de  $Ca^{2+}$ , y en el segundo la neurona se despolariza, lo cual trae como consecuencia la apertura de los CCaSV de la membrana somática, principalmente los del tipo L, sensibles a las dihidropiridinas, y la entrada de  $Ca^{2+}$  incrementa así más la excitabilidad. Véase el texto para una discusión más detallada.

Por otro lado, una mayor apertura de los CCaSV del soma neuronal resultará en hiperexcitabilidad, y por consiguiente drogas que impidan tal apertura teóricamente deberán ser antiepilépticos.

En el marco anteriormente descrito, es claro que la apertura del canal de  $Na^+$  asociado a los receptores no-NMDA, que produce una despolarización, es decir, una excitación de la neurona, causará la apertura de los CCaSV del soma y por consiguiente facilitará la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de ellos, lo cual a su vez aumentará la excitabilidad (Figura 1). Podemos concluir así que drogas agonistas de los receptores a AAE, tanto los NMDA como los no-NMDA, deberán ser convulsivantes, y los antagonistas deberán comportarse como antiepilépticos.

### Modelos experimentales de epilepsia en que participan algunos de los mecanismos revisados

**Inhibición de la actividad de la GAD.** La lista de drogas que inhiben la actividad de la GAD y producen convulsiones es

muy extensa. En la referencia<sup>1</sup> se incluye una larga enumeración de ellas. En experimentos realizados hace algunos años, demostramos que la inhibición de la actividad de la GAD cerebral del ratón *in vivo*, en condiciones en que previamente se produjo un aumento en la concentración de GABA mediante la inhibición de la transaminasa de este aminoácido,<sup>2</sup> resulta en convulsiones que se correlacionan con la disminución de la GAD, a pesar de que la concentración total de GABA está elevada hasta en más de un 200 por ciento. Estos resultados indican que la actividad de la enzima que sintetiza el GABA, más que la concentración total del aminoácido, es un factor determinante de su función sináptica inhibitoria, y sugieren por lo tanto que existe un acoplamiento entre la síntesis y la liberación de GABA.

**Disminución de la liberación de GABA.** Este mecanismo se ha estudiado en el laboratorio mediante el empleo de un colorante inorgánico, el rojo de rutenio (RRu), ya que se demostró que en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) este compuesto inhibe el transporte de  $Ca^{2+}$  a través de los CCaSV y como consecuencia inhibe también la liberación de GABA y otros neurotransmisores.<sup>4,6</sup> Nuestros hallazgos acerca de la acción del RRu *in vivo* se resumen a continuación:<sup>5,7,8</sup> inciso a) una pequeña cantidad de RRu produce intensas convulsiones en el ratón, la rata y el gato, cuando se administra por vía intracisternal (i.c.) o intracerebroventricular (i.c.v.); b) la administración i.c. de  $Ca^{2+}$  simultáneamente con RRu, en el ratón, protege contra las convulsiones; c) la inyección i.c. de un quelante de  $Ca^{2+}$  como el EDTA también produce rápidamente convulsiones, y éstas son también antagonizadas por la administración simultánea de  $Ca^{2+}$ ; d) la liberación de GABA dependiente de  $Ca^{2+}$  en sinaptosomas aislados del cerebro de ratones sacrificados en el momento de las convulsiones producidas por RRu i.c., está inhibida; e) la administración i.c. de  $La^{3+}$  también produce convulsiones.

En el marco de la discusión de la sección precedente, sobre los CCaSV de la terminal presináptica y el papel del  $Ca^{2+}$  en la liberación de transmisores, los datos anteriores indican que cuando el RRu se administra directamente en el líquido cefalorraquídeo se producen convulsiones probablemente por una disminución de la liberación de GABA. Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio<sup>9</sup> indican que cuando el RRu se inyecta directamente en el parénquima cerebral, puede penetrar al interior de los somas neuronales y producir excitación y daño neuronal. Evidentemente la interpretación de los efectos del colorante en estas condiciones experimentales debe ser diferente.

**Aumento de la liberación de glutamato y/o de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la soma neuronal.** En experimentos *in vivo*, en la rata, encontramos que la administración sistémica de 4-aminopiridina (4-AP), un compuesto que en sinaptosomas estimula

la liberación de glutamato y otros neurotransmisores de manera dependiente de calcio,<sup>6,11</sup> produce convulsiones. Además, la microinyección de esta droga en el hipocampo induce descargas epileptiformes generalizadas y una alteración motora conocida como "sacudidas de perro mojado", la cual se asocia a epilepsia experimental de tipo límbico. En ambos casos la administración sistémica de dihidropiridinas antagonistas de los CCaSV de la membrana somática, como la nifedipina, resultó paradójicamente en una potenciación de la actividad convulsiva.<sup>12</sup> Estos resultados se podrían explicar si la nifedipina tuviera en estas condiciones una acción como agonista parcial, más que como antagonista, de los CCaSV del soma, lo cual indicaría que la 4-AP podría facilitar la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de ellos. De hecho, otra dihidropiridina, el BAY-K-8644, que es un agonista de estos canales, produce convulsiones cuando se administra i.c.v., y éstas se impiden por el tratamiento con nifedipina u otras dihidropiridinas antagonistas de los CCaSV.<sup>13</sup>

Se interpretaron estos resultados en el sentido de que la 4-AP produce un aumento de la liberación de AAE y, mediante este mecanismo, un aumento en la entrada de Ca<sup>2+</sup> a las neuronas, aunque es también posible que la 4-AP facilite directamente la entrada de este catión a los somas neuronales a través de los CCaSV.

## Conclusión

Es claro que los nuevos conceptos que han surgido a raíz de la información anterior generarán el diseño y la síntesis de drogas anticonvulsivantes más efectivas. En este sentido, los antagonistas de los receptores NMDA, algunos de los cuales ya se han probado que poseen efectos anticonvulsivantes en varios modelos de epilepsia experimental, tanto *in vivo*<sup>14,15</sup> como *in vitro*, en rebanadas de hipocampo,<sup>16</sup> prometen ser un campo fértil para el desarrollo de nuevos fármacos antiepilepticos. Hasta ahora, sin embargo, estos antagonistas tienen efectos tóxicos de consideración, por lo que es necesario obtener otros compuestos con la misma acción antagonista sobre los receptores NMDA pero con menor toxicidad.

## Agradecimientos

Las investigaciones más recientes de laboratorio mencionadas en este trabajo, fueron financiadas en parte por Conacyt (proyecto P228CCOX-880370), el Programa Universitario de Investigación en Salud y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (proyecto IN-20-10-89).

## Referencias

1. Tapia R. Biochemical Pharmacology of GABA in CNS. En: Iversen L.L., Iversen S.D. y Snyder S.H. (Eds.): Handbook of Psychopharmacology. Nueva York. Plenum. 1975;4:1.
2. Tapia R, Sandoval ME y Contreras P. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J. Neurochem.* 1975;24:1283.
3. Tapia R. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico. En Pasantes-Morales H. y Aréchiga H. (Eds.): Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. UNAM. México, D.F. 1983, p.57.
4. Tapia R. Effects of drugs on neurotransmitter release: experiments *in vivo* and *in vitro*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1985;9:391.
5. Tapia R y Meza-Ruiz G. Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [<sup>3</sup>H]GABA in synaptosomal fractions. *Brain Res.* 1977;126:160.
6. Tapia R, Sitges M y Morales E. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 1985;361:373.
7. Meza-Ruiz Gy Tapia R. [<sup>3</sup>H]-GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 1978;154:163.
8. Tapia R, Meza-Ruiz G, Durán L y Drucker-Colín RR. Convulsiones o flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. *Brain Res.* 1976; 116:101.
9. Tapia R y Flores-Hernández J. Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience*, 1990;39:657.
10. Garcia-Ugalde G y Tapia R. Convulsions and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat. *Exp. Brain Res.* 1991;86:633
11. Tapia R y Sitges M. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 1982;250:291.
12. Fragozo-Veloz J, Massieu L, Alvarado R y Tapia R. Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;178:275.
13. Shelton RC, Grebb JA y Freed WJ. Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel agonist BAY k 8644. *Brain Res.* 1987; 402:399.
14. Croucher MJ, Collins JF y Meldrum BS. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science* 1982; 216:899.
15. Löscher W, Nolting B y Hönack D. Evaluation of CPP, a selective NMDA antagonist, in various rodent models of epilepsy. Comparison with other NMDA antagonists, and with diazepam and phenobarbital. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 152:9.
16. Stasheff SF, Anderson WW, Clark S y Wilson WA. NMDA antagonists differentiate epileptogenesis from seizure expression in an *in vitro* model. *Science* 1989; 245: 648.

### III. El sistema GABAérgico cortical en dos modelos de epilepsia experimental

SIMON BRILOWSKY\*

En este trabajo describiremos los efectos de la manipulación de las concentraciones intracorticales del ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central, en un modelo de epilepsia generalizada en el mono y en un modelo de epilepsia focal en la rata. Mostraremos como el aumento en estas concentraciones es capaz de inducir potentes efectos antiepilépticos y como el descenso brusco de las mismas puede inducir fenómenos paroxísticos.

#### Efectos anticonvulsivos de infusiones localizadas de GABA

Los experimentos iniciales se llevaron a cabo en monos *Papio papio* fotosensibles. Estos animales muestran signos de epilepsia generalizada cuando se les estimula con *flashes* a una frecuencia vecina a los 25 Hz. Dependiendo del grado de fotosensibilidad, se pueden observar desde mioclonías de los párpados hasta crisis tónico-clónicas de tipo gran mal. Esta conducta se asocia con descargas paroxísticas que se expresan en forma particularmente intensa y temprana en las regiones fronto-rolándicas de ambos hemisferios cerebrales, sitios generadores de la descarga anormal. Estas descargas fronto-rolándicas (áreas 4 y 6) preceden siempre las mioclonías.

Experimentos de farmacología sistémica en estos animales han mostrado que todos aquellos fármacos que interfieren con la transmisión GABAérgica facilitan la fotosensibilidad, mientras que todos aquellos que la favorecen tienen efectos anticonvulsivos.<sup>1</sup>

Con objeto de investigar el papel del GABA a nivel de esta corteza fronto-rolándica en particular, realizamos experimentos en los que elevamos la concentración extracelular del GABA en forma circunscrita, en animales fotosensibles y no fotosensibles. En animales naturalmente fotosensibles, la infusión, crónica bilateral de GABA (100 µg/µl) mediante minibombas osmóticas produjo un bloqueo completo tanto de los signos clínicos como electrográficos de fotosensibilidad. Las infusiones bilaterales del vehículo (solución salina) no tuvieron ningún efecto. Efectuamos estas infusiones en cuatro regiones diferentes de la corteza cerebral: la corteza occipital,

la corteza motora, el área premotora y la corteza prefrontal. Sólo las infusiones de GABA en la corteza occipital (visual) y en la motora tuvieron estos efectos de bloqueo completo del síndrome fotosensible. Las infusiones en el área 6 (premotora) mostraron efectos anticonvulsivos parciales y las infusiones en el área prefrontal no tuvieron ningún efecto antiepiléptico.<sup>2,3</sup>

Estos experimentos indican que en este modelo de epilepsia generalizada refleja, existen áreas críticas para la regulación de la excitabilidad cerebral: la corteza visual juega un papel "permissivo" mientras que la corteza motora tiene un papel "ejecutivo" para la expresión del síndrome fotosensible. Se han identificado áreas semejantes tanto para la epileptogénesis como para los efectos anticonvulsivos en el cerebro de la rata.<sup>4</sup>

#### El síndrome de abstinencia al GABA (SAG) en el mono

En todos los monos, fotosensibles o no, en los que se administró el GABA constatamos la aparición de focos de actividad paroxística. Independientemente del área infundida, la cánula de infusión utilizada también como electrodo de registro mostraba la presencia de poliespigas y de actividades en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora, se correlacionaba con la aparición de mioclonías de las porciones distales del miembro inferior. El SAG en el *Papio* tuvo una duración de tres a cinco días, después de los cuales desapareció. La fotosensibilidad comenzó a reaparecer de dos a cuatro días después del fin del tratamiento con el GABA, de tal manera que en las fases finales del SAG, coexistían en el mismo animal una epilepsia generalizada (la fotosensibilidad) con una parcial (el SAG).

#### El SAG en la rata con kindling

Con objeto de verificar los efectos anticonvulsivos de las infusiones intracorticales de GABA, ensayamos el mismo procedimiento realizado en el *Papio papio* esta vez en el modelo del "kindling" amigdalino en la rata. En animales que presentaban un estadio 5 (crisis generalizadas con pérdida del equilibrio) estable, la infusión intracortical (región somatomotora) de GABA disminuyó la intensidad de las crisis motoras, sin afectar la duración de la postdescarga amigdalina.<sup>5</sup> Estos efectos se interpretaron como una acción del GABA sobre la expresión motora de las crisis sin afectar la actividad del foco de origen de dicha actividad (la amígdala).

En estas ratas también pudimos constatar al cese de la infusión del GABA, la aparición de un SAG. Este SAG se presentó en ambas cortezas somatomotoras, dado que la infusión del GABA fue bilateral.

\*Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

## El SAG en la rata no epiléptica

La aparición de un SAG después de la infusión crónica de GABA pudo confirmarse en ratas no epilépticas, y después de infusiones unilaterales del aminoácido tanto a nivel de la corteza cerebral como del sistema límbico.<sup>6</sup> Es interesante subrayar que el SAG límbico, tanto a nivel del hipocampo como de la amígdala, fue menos duradero que a nivel cortical. En ambas estructuras, este nunca persistió por más de 12 horas. Estos hallazgos muestran que la susceptibilidad a la epileptogénesis varía de acuerdo al estímulo desencadenante (en otras palabras, al modelo de epilepsia): si bien es cierto que el sistema límbico muestra una susceptibilidad extrema a los efectos de la estimulación eléctrica, lo es menos para la expresión del SAG.

## Relación entre tiempo de infusión del GABA y el SAG

Iniciamos un estudio enfocado específicamente a estudiar la relación entre tiempo de infusión con el GABA y la latencia y la duración del fenómeno paroxístico. Así, se preparó a los animales con cánulas intracorticales en ambas cortezas somatomotoras (región contralateral a la pata posterior) y de electrodos epidurales de registro. En todos los casos, se hizo la infusión de GABA en el lado izquierdo y de solución salina en el derecho. Los registros EEG se hacían de ambos lados del cerebro, con fines comparativos.

Se realizaron infusiones que iban desde 3 horas a dos semanas, usando una dosis de GABA de 100 µg/µL/hora o de salina (1 µL/hr). Observamos que para aquellas infusiones que duraban entre 6 y 24 horas, la latencia de aparición del SAG fue de entre 50 y 60 minutos en promedio, mientras que la duración de las espigas epilépticas fue de entre 90 y 170 horas. En ocho animales en los que se infundió el GABA a la misma dosis durante 3 horas no se observó ningún SAG.<sup>7</sup> En grupos de ratas en los que se administró el GABA durante 3, 5, 7 y 14 días, la latencia de inicio de la actividad epiléptica fue de entre 10 a 25 minutos, mientras que la duración del SAG fue de entre 10 y 40 horas. Así, aparece una relación inversa entre tiempo de infusión del GABA y la latencia y la duración del SAG: a tiempos de infusión más cortos corresponde un SAG de latencia y duración largas. No sabemos aún las razones de esta relación, pero pudiera estar ligada a los efectos histológicos de la infusión.

## Patrones EEG del SAG

Nos llamó la atención que tanto para SAG cortos (algunas horas) como para largos (varios días), la evolución temporal de los cambios electrográficos seguía una misma morfología. Observamos tres tipos de patrones EEG: el patrón que deno-

minamos I, constituido por actividades en forma de espiga-onda única, de 200 a 700 µV de amplitud y a una frecuencia de 0.5 a 3 cps. El patrón II, constituido por elementos en forma de espiga-onda seguidos de poliespigas de alta frecuencia. En sus fases iniciales, estos dos patrones se acompañaron de mioclonías de la pata posterior contralateral. Finalmente, el patrón III formado por espigas que se propagan a las áreas homólogas del hemisferio contralateral, en forma de crisis de varios segundos de duración, acompañadas de inmovilidad del animal y, ocasionalmente, de las llamadas "sacudidas de perro mojado", indicativas de una posible propagación de la actividad anormal a estructuras hipocámpicas.

En la mayoría de los casos, el SAG se inicia con el patrón I, el cual predomina también a partir del 2° día y hasta el final. Los patrones II y III se observan en general entre la primera y la cuarta hora del SAG y son raros después de 10 a 12 horas de iniciado el rebote epiléptico. En todos los casos, el final del SAG se anunciaba como la desaparición de la actividad anormal durante la vigilia y el sueño de movimientos oculares rápidos, y su reaparición durante el sueño de ondas lentas, tanto para los SAG cortos como para los largos (Figura 1).

## SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA

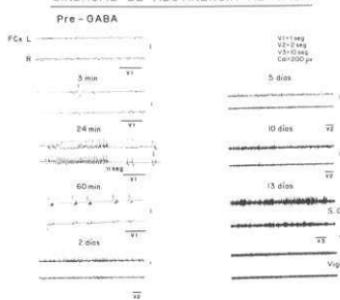


Fig. 1. Registro electroencefalográfico mostrando la evolución temporal del síndrome de abstinencia al GABA (SAG) en una rata que recibió la infusión intracortical del aminoácido durante 6 horas en la corteza somatomotora (MCx) del lado izquierdo. La primera espiga aparece a los 3 minutos de la interrupción del tratamiento, y la actividad paroxística continúa hasta por 13 días. Nótese que el final del SAG se caracteriza por la presencia de la actividad de tipo epiléptico solamente durante el sueño de ondas lentas ("SOL").

## Cambios neuroquímicos en el SAG

Actualmente se está estudiando los efectos de las infusiones crónicas intracorticales del aminoácido sobre la actividad de la enzima de síntesis del GABA, la descarboxilasa del ácido glutámico, en colaboración con Ricardo Tapia y Patricia Salazar. Los resultados preliminares muestran una reducción

de aproximadamente 50 por ciento en la actividad de la GAD, tanto en ausencia como en presencia del cofactor, el fosfato de piridoxal. Estos resultados indican que existen cambios regulatorios en el aparato enzimático del GABA a consecuencia del aumento en la concentración del producto. Se está estudiando la cinética de estos cambios, tanto en el sentido de la disminución de la síntesis (down-regulation) como de la recuperación de los niveles enzimáticos una vez suspendida la infusión del aminoácido.

### Cambios histológicos inducidos por el SAG

El análisis histológico del SAG ha mostrado cambios locales, a nivel del sitio de infusión así como en aquellas estructuras que reciben proyecciones de la zona cortical infundida. A nivel local, se encontró una despoblación neuro-glial en las áreas más próximas a la cánula de infusión. En las zonas más alejadas (0.5 a 0.8 mm) se apreció una zona de gliosis, visible con la tinción de Nissl (violeta de cresilo) y más claramente con la inmunocitoquímica (anticuerpos anti-GFAP) teniendo los astrocitos reactivos que expresan la proteína ácida fibrilar característica de estas células.

En la zona talámica de proyección de la corteza motora (núcleos del grupo ventro-medial) se observaron cambios glióticos cuya localización variaba de acuerdo al área cortical que había mostrado actividad paroxística. Pensamos que estos cambios se deben a la liberación de aminoácidos excitadores a partir de las terminales cortico-talámicas. Existe evidencia de que estas fibras corticofugas son glutamatérgicas, y se ha descrito<sup>8</sup> que el aumento en la concentración de agonistas del glutamato se acompaña de efectos neurotóxicos. En otros modelos de epilepsia cortical focal se han descrito lesiones a nivel talámico<sup>9</sup> así como los efectos protectores de estos cambios degenerativos por medio de antagonistas del receptor al NMDA (N-metil-D-aspartato) como son la ketamina y el MK-801.<sup>10</sup> La posibilidad de que los cambios a distancia observados en el SAG se deban a mecanismos similares puede ser probada mediante la administración de dichos antagonistas en animales que presenten un SAG.

### Cambios metabólicos inducidos por el SAG

Los cambios a distancia producidos por el SAG cortical han podido ser observados también por medio de la técnica de la 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva.<sup>11</sup> Mediante esta técnica es posible estudiar el metabolismo glucídico cerebral ya que la 2-DG se acumula en el sitio de su utilización. Así, las áreas cerebrales más activas acumularán más 2-DG, la cual puede ser visualizada mediante autoradiografía. De esta manera hemos observado un aumento significativo en el consumo local de glucosa (tres a cinco veces en relación al control) no

sólo del área cortical involucrada en la generación de actividad paroxística, sino también en la zona talámica ipsilateral de proyección de dicha área cortical (núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central-lateral, ventro-lateral y reticular).

### Cambios microfisiológicos durante el SAG

En colaboración con Silva-Barrat y col.<sup>12</sup> realizamos experimentos *in vitro* en rebanadas de corteza cerebral obtenidas de ratas que presentaban *in vivo* un SAG clínico (mioclonías unilaterales) o eléctrico (espigas en el sitio de infusión). A partir de estas rebanadas, se analizaron en registro intracelular las neuronas situadas en la vecindad del sitio de infusión.

La estimulación eléctrica de la sustancia blanca situada en el mismo plano columnar del sitio de registro indujo, en todas las células analizadas, despolarizaciones paroxísticas acompañadas de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas actividades son las llamadas PDS (*paroxysmal depolarization shift*) y se han considerado como una característica de células epilépticas.<sup>13</sup> Cuando la estimulación eléctrica era de menor intensidad, se obtenían potenciales post-sinápticos excitadores (PPSE) de gran amplitud.

En estas rebanadas se encontró una población de neuronas que presentaban, además de los PDS inducidos sinápticamente, trenes de potenciales de acción de alta frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente. Estas neuronas con capacidades intrínsecas para la generación de PDS se diferenciaron de las otras (i.e. aquellas en las que los PDS sólo podían ser producidos por estimulación sináptica) en: a) presentar potenciales voltaje-dependientes (PPSE que aumentaban por hiperpolarización y disminuían por despolarización), b) presentar PDS calcio-dependientes: la sustitución del calcio del medio por cobalto produjo la desaparición de los trenes de potenciales de acción de alta frecuencia inducidos por corriente para dar paso a potenciales únicos, y c) una mayor tolerancia a los efectos hiperpolarizantes del GABA aplicado al baño en el que se mantenían a las rebanadas. Esta tolerancia se manifestó como una ED50 (concentración efectiva 50) 50-100 veces mayor para estas células que para las neuronas con PDS sinápticos usando la isoguvascina, agonista específico de los receptores GABA-A.

Existe aún controversia sobre el papel de la activación sináptica *versus* la existencia de neuronas de tipo "marcapaso" en la producción de actividades de tipo epiléptico. Existe una escuela que propone que la actividad epiléptica (PDS) es producida por PPSE "gigantes", caracterizados por un aumento de 5 a 10 veces en la conductancia sináptica en relación a PPSE normales.<sup>14,15</sup> Estos PPSE gigantes activarían un mayor número de neuronas estableciéndose un circuito reverberante de actividad anormal. Los PDS "endógenos" dependerían de propiedades membranales especiales de la neurona.<sup>16</sup>

Por otra parte, Wong y col.<sup>17</sup> han propuesto que los PDS observados en la mayoría de los modelos de epilepsia provienen de corrientes cálcicas (excitadoras) dendríticas voltaje-dependientes. Schwindt y Crill<sup>18</sup> observaron estas corrientes a nivel de la médula espinal, en células capaces de generar descargas en trenes. Estos potenciales cálcicos gigantes pueden, entonces, ser otro marcador de neuronas epilépticas.

La tolerancia al GABA que encontramos en las células que estuvieron expuestas crónicamente al aminoácido puede deberse a una desensibilización de los receptores producida por la exposición prolongada al GABA, aunque no sabemos si esta se debe a una disminución en el número de receptores o en su afinidad por el GABA, o incluso a un aumento en los mecanismos de recaptación.<sup>19</sup> Otra posibilidad más sería que la tolerancia a los efectos del GABA estuviera relacionada con un aumento en la concentración intracelular de calcio, el cual podría disminuir la sensibilidad del receptor en forma directa<sup>20</sup> o a través de cambios en el estado de fosforilación del mismo, que también dependen en parte del calcio interno.<sup>21</sup>

### Farmacología del SAG

Aunque preliminares, los estudios farmacológicos realizados en el SAG muestran resultados sorprendentes. Ante todo, es necesario enfatizar que la responsividad del SAG a los diferentes fármacos anticonvulsivos, administrados por vía sistémica, varía de acuerdo al tiempo de evolución de la actividad paroxística. Así, hemos encontrado que el SAG es extraordinariamente resistente a los anticonvulsivos usados clínicamente (fenitoina, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepina, etc.) e incluso al fármaco de elección en casos de status epiléptico: el diazepam. Dosis que van hasta 15 mg/kg I.P. de esta benzodiazepina no han afectado la frecuencia de descarga del foco epiléptico, a pesar de que el animal se halle profundamente sedado. Incluso el pentobarbital a dosis anestésicas (35 mg/kg) no ha modificado significativamente la frecuencia del foco de descarga cortical. Así, nos encontramos ante un modelo de epilepsia intratable en el cual es posible ensayar nuevos fármacos anticonvulsivos.

A partir del segundo día del SAG la responsividad cambia, y se empiezan a observar efectos anticonvulsivos cuando se administran fármacos antagonistas del receptor al NMDA como la ketamina, el amino-fosfonoheptanoato (APH) y el MK-801, o benzodiazepinas como el clonazepam.

En estudios recientes, hemos ensayado un anticonvulsivo de síntesis nacional, la hidroxietil-propionamida o HEPP.<sup>22,23</sup> Este compuesto ha sido capaz de disminuir significativamente la frecuencia de descarga del foco epiléptico cuando se administra en la primera hora después del inicio de la actividad paroxística, más ha sido ineficaz cuando se administra en el

segundo o tercer día de iniciado el SAG. No se conoce hasta la fecha el o los mecanismos de acción de este compuesto.

En este contexto, es necesario mencionar que la actividad paroxística focal característica del SAG puede ser inhibida si la infusión local del aminoácido es reiniciada,<sup>24</sup> así sea en las fases iniciales del síndrome.

En estudios relacionados, mostramos que la taurina, otro aminoácido con efectos inhibidores sobre la actividad cortical,<sup>25</sup> no fue capaz de inducir fenómenos de abstinencia cuando se suspendió su infusión crónica intracortical, tampoco tenía efectos inhibitorios sobre el SAG.<sup>24</sup>

Concluimos diciendo que el SAG recuerda varios cuadros observados en la clínica:

- 1) un cuadro de status epiléptico focal (actividad paroxística continua),
- 2) un síndrome de epilepsia parcial continua (síndrome de Kojewnikow), caracterizado por descargas focales asociadas a mioclonos y a descargas epileptiformes lateralizadas periódicas (los llamados "PLEDS"),
- 3) un cuadro de epilepsia focal intratable (resistente a los anticonvulsivos usuales),
- 4) un síndrome de carencia o abstinencia semejante al que se observa después de suspender bruscamente la administración prolongada de sustancias como los barbitúricos, las benzodiazepinas o el alcohol, sustancias que se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica.

### Referencias

1. Brailowsky S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D and Naquet R. Anticonvulsant effects of intracortical chronic infusion of GABA in generalized epilepsy. En: Avoli M, Gloor, P, Kostopoulos, G, Naquet, R (eds). Generalized epilepsy: neurobiological approaches. Boston: Birkhauser, 1990;126.
2. Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C and Naquet R. Epileptogenic gamma-aminobutyric acid withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci Lett* 1987;74:75.
3. Brailowsky S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D and Naquet R. Effects of localized, chronic GABA infusions into different cortical areas of the photosensitive baboon *Papio papio*. *Electroenceph clin Neurophysiol* 1989;72: 147.
4. Gale K. Mechanisms of seizure control mediated by  $\gamma$ -aminobutyric acid: role of the substantia nigra. *Fred Proc* 1985;44:2414.
5. Fukuda H, Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Riche D and Naquet R. Anticonvulsant effects of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp Neurol* 1987;98:120.
6. Le Gal la Salle G, Brailowsky S, Menini C and Naquet R.

Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp Neurol* 1988;101:411.

7. Brailowsky S, Kunimoto M, Menini C, Silva-Barrat C and Naquet R. The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res* 1988;442:175.
8. Olney JW, Ho OL and Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 1971;14:61.
9. Collins RC and Olney JW. Focal cortical seizures cause distant thalamic lesions. *Science* 1982;218:177.
10. Clifford DB, Zorumski CF and Olney JW. Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures. *Exp Neurol* 1989;105:272.
11. Menini C, Mraovitch S, Calando Y, De la Sayette V, Silva-Barrat C, Brailowsky S and Seylaz J. Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat. *Neuroscience* 1991;41:607.
12. Silva-Barrat C, Champagnat J, Brailowsky S, Menini C and Naquet R. Tolerance to GABA<sub>A</sub> agonist may explain bursting properties of neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome. *Brain Res* 1989;289:498.
13. Matsumoto H and Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: ictal manifestation. *Exp Neurol* 1964;9:305.
14. Johnston D and Brown TH. The synaptic nature of the paroxysmal depolarizing shift in hippocampal neurons. *Ann Neurol* 1984;16:S65.
15. Johnston D and Brown TH. Control theory applied to neural networks illuminates synaptic basis of interictal epileptiform activity. En: Delgado-Escueta AV, Ward AA Jr, Woodbury DM and Porter RJ (eds). *Basic mechanisms of the epilepsies*. New York: Raven Press, 1986:263.
16. Prince DA and Connors BW. Mechanisms of interictal epileptogenesis. En: Delgado-Escueta AV, Ward AA Jr, Woodbury DM and Porter RJ (eds). *Basic mechanisms of the epilepsies*. New York: Raven Press, 1986:275.
17. Wong RKS, Traub RD and Miles R. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. En: Delgado-Escueta AV, Ward AA Jr, Woodbury DM and Porter RJ (eds). *Basic mechanisms of the epilepsies*. New York: Raven Press, 1986:583.
18. Schwindt PC and Crill WE. Role of persistent inward current in motoneuron bursting during spinal seizures. *J Neurophysiol* 1980;43:1296.
19. Krnjevic K. Some functional consequences of GABA uptake by brain cells. *Neurosci Lett* 1984;47:283.
20. Inoue M, Oomura Y, Yakushiji T and Akaike N. Intracellular calcium ions decrease the affinity of the GABA receptor. *Nature* 1986;324:156.
21. Stelzer A, Kay AR and Wong RKS. GABA<sub>A</sub> receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 1988;241:339.
22. Carvajal G, Russek M, Tapia R and Massieu G. Anticonvulsive action of substances designed as inhibitor

of  $\gamma$ -aminobutyric-a-ketoglutaric transaminase. *Biochem Pharmacol* 1964;13:1059.

23. Tapia R, Drucker-Colín RR, Meza-Ruiz G, Durán L and Levi G. Neurophysiological and neurochemical studies on the action of the anticonvulsant  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -ethyl,  $\gamma$ -phenylbutyramide. *Epilepsia* 1979;20:135.
24. Brailowsky S, Kunimoto M, Silva-Barrat C, Menini C and Naquet R. Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 1990;31:369.
25. Brailowsky S and Knight RT. Inhibitory modulation of cat somatosensory cortex: a pharmacological study. *Brain Res* 1984;310:322.

## IV. Modelos *in vitro* para el estudio de la actividad anticonvulsiva

RODOLFO RODRIGUEZ\*  
MIGUEL LUJAN  
RAFAEL RAMIREZ  
MARTHA MEDINA  
CECILIA CAPISTRAN

Desde 1937 Putnam y Merritt informaron que los fármacos potencialmente útiles en el control de la epilepsia pueden ser identificados por su habilidad para suprimir las convulsiones inducidas por la estimulación eléctrica en los animales de laboratorio.<sup>23</sup> Dicha observación se derivó del estudio sistemático de una larga serie de estructuras con grupos fenilo y del hallazgo de la difenilhidantoína, una molécula particularmente efectiva, poco tóxica, que fue introducida al uso clínico un año más tarde.<sup>17</sup> A partir de este reporte se desarrollaron numerosos modelos experimentales que emplean diversas especies animales y procedimientos convulsivos, que han sido de gran utilidad en el estudio de la epileptogénesis y en el análisis del mecanismo de acción de los fármacos (Cuadro I). Los modelos más comúnmente empleados para la selección y desarrollo de nuevos anticonvulsivos descansan en la capacidad que tienen los antiepileptícos conocidos para suprimir los efectos producidos por el electrochoque, especialmente la hiperextensión del tren posterior, y para elevar la dosis de metrazol requerida para inducir convulsiones tónico-clónicas;<sup>12</sup> efectos relativamente inespecíficos que se atribuyen esencialmente a su acción sobre la intensidad del estímulo

\* Académico titular.

Todos los autores. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

empleado y, en menor grado, a la naturaleza del estímulo o al tipo de convulsión inducida.<sup>5,21</sup> El valor de dichos modelos ha quedado plenamente establecido, baste recordar que la gran mayoría de los antiépilépticos en uso clínico fueron descubiertos por sus efectos sobre estos modelos experimentales de epilepsia. Sin embargo, es claro que ninguno de ellos se aproxima a la situación clínica ni cumple con cada uno de los requisitos formulados para un modelo ideal de epilepsia; en especial, el control experimental preciso sobre el desarrollo del fenómeno, la presencia de crisis convulsivas espontáneas y recurrentes, la permanencia y progreso de las mismas y la ausencia de daño tisular. El fenómeno de activación progresiva por estimulación eléctrica repetida de baja intensidad parece cumplir estos requerimientos.

**Cuadro I. METODOS PARA LA VALORACION DE ANTICONVULSIVOS**

1. Estimulación eléctrica	4. Estimulación química
a. Generalizada	a. Generalizada
i. Umbral (clónica)	i. Metrazol
ii. Máxima (extensión tónica)	- Umbral (clónica)
b. Local	- Máxima (extensión tónica)
i. Cortical, subcortical	ii. Otros agentes
ii. Médula espinal	-Estricnina
2. Estimulación sensorial	-Picrotoxina
i. Audiogénica	-Bicuculina
ii. Fótica	-Tiosemicarbazida
3. Alteraciones metabólicas	b. Local
i. Agua-electrolitos	i. Convulsivantes
ii. CO <sub>2</sub>	ii. Irritantes
iii. Hipertermia	-Penicilina
iv. Endocrinas	-Metales

Se ha demostrado que la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad, aplicada en áreas específicas del sistema nervioso central, especialmente el sistema límbico y áreas relacionadas, induce el desarrollo progresivo de alteraciones electroencefalográficas y conductuales características. Inicialmente, sólo se inducen postdescargas locales; con la repetición de los estímulos eléctricos, las postdescargas son más prolongadas, se propagan a los sistemas neurales interconectados y, eventualmente, se presentan convulsiones generalizadas. Las condiciones básicas para la inducción de estas alteraciones fueron inicialmente descritas por Goddard y cols.,<sup>7</sup> quienes acuñaron el término *kindling* para describir este fenómeno. Cuando la estimulación eléctrica se continúa por largos períodos las convulsiones se presentan espontáneamente y es posible observar un estado epiléptico.<sup>16,20</sup> Una de las características más significativas de este fenómeno es su

permanencia; una vez suspendido el proceso de inducción, la susceptibilidad aumentada al efecto convulsivo de la estimulación eléctrica persiste por varios meses. La ausencia de daño cerebral y la permanencia del efecto fisiológico es indicativo de alteraciones permanentes de la función neuronal inducida por la estimulación eléctrica epileptogénica. Por estas características, el *kindling* es considerado como un modelo singular para el estudio de la epileptogénesis y de la plasticidad neuronal, así como para la evaluación y análisis de la acción anticonvulsiva.

El *kindling* ofrece diversas ventajas para el ensayo farmacológico: 1) permite el empleo de manifestaciones conductuales y electroencefalográficas convencionales; estas pueden ser evocadas a voluntad, son estables y susceptibles de cuantificación. Por ello, es posible usar los mismos animales para el estudio de diversos fármacos y dosis; 2) ofrece la alternativa de usar un modelo focal o de un focal-generalizado de epilepsia, lo que facilita conocer el efecto diferencial de la acción farmacológica; y 3) ya que las convulsiones kindlicas pueden ser inducidas por la estimulación de diferentes estructuras cerebrales, es posible estudiar el efecto de los fármacos sobre crisis evocadas en diferentes sitios. Se han realizado avances considerables en el análisis del efecto de los fármacos sobre el *kindling*; sin embargo, los resultados reportados no son consistentes y algunos son contradictorios. Tales diferencias se atribuyen a la diversidad de especies y técnicas empleadas; además, en la mayoría de los estudios no se consideran los niveles plasmáticos necesarios para una acción efectiva.<sup>27</sup> Los estudios sistemáticos y comparativos, que emplean la misma especie animal, criterio y técnica experimental, revelan que los fármacos con un espectro anticonvulsivo amplio en otros modelos experimentales, como los barbitúricos y las benzodiazepinas, inhiben con mayor facilidad las manifestaciones generalizadas que la actividad focal.<sup>3</sup> La potencia relativa para inhibir las manifestaciones conductuales y la duración e intensidad de las postdescargas es, en ese orden, clonazepam > diazepam > carbamazepina > pentobarbital > fenobarbital > ácido valproico.<sup>1</sup> Lo anterior favorece la hipótesis de que la crisis kindlica generalizada es un modelo de epilepsia tónico-clónica;<sup>3</sup> sin embargo, la difenilhidantoína es inactiva.<sup>13</sup> El hecho de que las crisis focales, particularmente las amigdalinas, sean altamente resistentes al efecto de los anticonvulsivos ha permitido postular que dichas crisis pueden ser un equivalente de la epilepsia parcial compleja, que también suele ser refractaria a los antiépilépticos conocidos. Finalmente, cabe destacar que la acción de los anticonvulsivos sobre el proceso de adquisición del fenómeno también es muy limitada.<sup>2</sup>

Por otro lado, a partir del reporte de Goddard, un gran número de estudios han pretendido identificar los mecanismos

neuroquímicos subyacentes al *kindling*,<sup>10,19,24</sup> sin embargo, se tienen pocos avances al respecto. En general, se ha encontrado que las lesiones o los fármacos que disminuyen la influencia noradrenérgica,<sup>4,5</sup> serotoninérgica<sup>11,20</sup> y gabaérgica<sup>18</sup> facilitan el desarrollo del *kindling* y que su aumento lo retrasa. Asimismo, que los sistemas colinérgicos parecen jugar un papel proconvulsivo<sup>24</sup> y los opioides endógenos parecen disminuir la susceptibilidad cerebral a la actividad epileptogénica, ya que la naloxona, un antagonista de narcóticos, facilita el desarrollo y acentúa las manifestaciones del *kindling*.<sup>6,9</sup> Sin embargo, existen resultados contradictorios y las alteraciones bioquímicas descritas a la fecha son complejas y no pueden ser fácilmente interpretadas; por ello, el correlato bioquímico del *kindling* sigue siendo un problema sin resolver.<sup>13</sup>

Por lo anterior, se consideró que la reproducción del *kindling* en una estructura menos compleja que el sistema nervioso central (SNC) podría facilitar el diseño de las estrategias experimentales necesarias para diseccionar el fenómeno, visualizar con mayor claridad sus causas primarias y facilitar el análisis del mecanismo de acción farmacológica.

En 1986 reportamos que la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad aplicada al íleo aislado de cobayo produce cambios progresivos en la actividad basal que culminan con contracciones vigorosas y espontáneas que persisten por varias horas después de suspender la estimulación eléctrica.<sup>25</sup> Se encontró que, al igual que en el animal íntegro, la magnitud de estas alteraciones depende de los parámetros de estimulación, especialmente del número de estimulaciones eléctricas, de la frecuencia de estimulación y del intervalo entre estímulos. Estas características, la semejanza en el proceso de desarrollo y su susceptibilidad al efecto de los anticonvulsivos, permitieron proponer que tales alteraciones pueden ser análogas al fenómeno *kindling* que se produce en el animal íntegro.<sup>14,25</sup>

En estudios recientes se confirmaron y ampliaron estos hallazgos y se inició el análisis sistemático del efecto de los anticonvulsivos sobre el fenómeno intestinal. Estos resultados son motivo de la presente comunicación. La figura 1 muestra el registro continuo de la actividad intestinal durante el proceso de inducción del fenómeno, el cual se llevó a cabo mediante la aplicación de 15 estímulos eléctricos subumbrales (50% de la intensidad requerida para provocar una respuesta). Los estímulos consistieron en trenes de 10 seg de pulsos cuadrados monofásicos aplicados cada 20 min; cada pulso fue de 3 mseg de duración a 20 Hz. La actividad basal del intestino consiste en contracciones musculares espontáneas y rítmicas (3-8/min) y con una amplitud, que varía de un intestino a otro y durante el registro, de 0.2 a 1.0 g, la cual se sobrepone a un tono muscular continuo. Como puede apreciarse, a partir del 4o. estímulo se presentan descargas espontáneas y transitorias en las que aumenta el tono basal, la amplitud (1-2 g) y la

frecuencia de las contracciones (8-12/min), seguidas de una disminución del tono y desaparición temporal de las contracciones rítmicas. En general, a partir del 8o. estímulo aparecen espigas de magnitud variable (2-3 g), las cuales, después del estímulo 14 ó 15, alcanzan tensiones de 4 a 5 g. Este patrón de desarrollo se observa en la mayoría de los intestinos en que se induce el fenómeno. En otros casos dichas espigas se presentan en una etapa relativamente más temprana o más tardía del proceso de inducción. En la mayoría de los segmentos control, no estimulados y sujetos a perfusión continua, no se registran alteraciones significativas de la actividad basal; en algunos se observan espigas esporádicas de magnitud intermedia. Cabe destacar la permanencia del fenómeno; una vez suspendida la estimulación, las espigas continúan con el mismo o mayor grado de intensidad y frecuencia. La frecuencia y patrón de descarga varía considerablemente de un intestino a otro. Pueden presentarse en estallidos de tres a cinco contracciones sucesivas, con períodos de silencio de 3 a 7 min, hasta descargas rítmicas y regulares (1-2/min), con actividad basal mínima o nula (Figura 2). No se observa predominio claro de algunos de estos patrones.

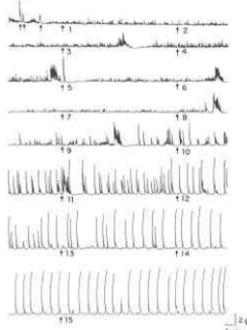


Fig. 1. Alteraciones de la actividad espontánea del íleo aislado de cobayo inducidas por la estimulación eléctrica de baja intensidad. La parte inicial del primer registro muestra la actividad basal del intestino y las flechas indican los ajustes en la intensidad del estímulo. Los números 1 a 15 señalan el momento de la aplicación del estímulo eléctrico. Cada estímulo consistió de trenes de 10 seg de pulsos cuadrados monofásicos, aplicados cada 20 min. Cada pulso fue de 3 mseg de duración, a 20 Hz y la intensidad ajustada a 50% de aquella capaz de evocar una respuesta. Los intestinos fueron continuamente perfundidos con solución de Krebs (10 ml/min), mantenida a 37°C y burbujada con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

En la primera etapa del proceso de la validación de este modelo *in vitro* para el estudio de la actividad anticonvulsiva, se observó el efecto de algunos anticonvulsivos sobre el fenómeno establecido. Se encontró que la adición a la cámara

de diversos anticonvulsivos suprime claramente las alteraciones establecidas (Figura 3). El efecto observado fue dependiente de la concentración del fármaco y, en general, el efecto fue aparente en concentraciones del orden de  $1 \times 10^{-7}$  M. Con las concentraciones más elevadas se logra una inhibición casi total ( $1 \times 10^{-5}$  M) o total ( $1 \times 10^{-4}$  M) del fenómeno. Cabe mencionar que la concentración más elevada ( $1 \times 10^{-4}$  M) de carbamazepina (CBZ), diazepam (DIA) y pentobarbital (PEN) inhibe la respuesta contractil del intestino estimulado a 0.1 Hz, lo que puede implicar que es inespecífico el efecto de esta concentración sobre el fenómeno intestinal.



Fig. 2. Alteraciones máximas de la actividad intestinal inducidas por la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad. Se muestra la actividad de cinco intestinos diferentes; los registros fueron tomados 120 min después de la palicación del último estímulo eléctrico. Otros detalles en Fig. 1.

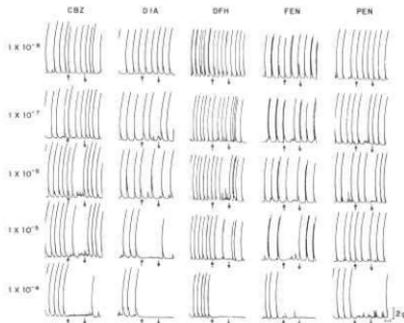


Fig. 3. Efecto de algunos anticonvulsivos sobre las alteraciones inducidas por la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad. En cada registro, el primer flecha (T) indica el momento en que se suspende la perfusión y se adiciona el fármaco correspondiente a la concentración señalada; la segunda flecha (D) muestra el momento en que se reinicia la perfusión. En todos los casos, el fármaco estuvo en contacto con el tejido durante 3 min.

La cuantificación del efecto observado reveló que la potencia relativa de la DFH, FEN, CBZ y DIA es relativamente semejante. Los resultados observados con FEN, CBZ y DIA son consistentes con la eficacia de estos fármacos para suprimir las crisis kindlicas totalmente desarrolladas.<sup>1</sup> Es de interés el efecto inhibitorio de la DFH, ya que, aparentemente, es ineficaz en el animal íntegro;<sup>1</sup> asimismo, que el PEN sólo es activo en concentraciones muy elevadas. Excepto en el caso del PEN, las concentraciones necesarias para inhibir claramente el fenómeno (> 50 %) son relativamente semejantes o inferiores a las concentraciones plasmáticas efectivas para el control de la epilepsia.<sup>22</sup> Por otro lado, la metuximida fue inactiva y la naloxona tiende a aumentar la frecuencia de las contracciones intestinales.

Estos resultados apoyan la idea de que las alteraciones intestinales aquí descritas pueden ser, en esencia, análogas al fenómeno *kindling*, que resulta de la estimulación de áreas específicas del SNC; particularmente si se acepta el concepto de que este fenómeno representa el aumento progresivo de la reactividad neural como consecuencia de la estimulación eléctrica de baja intensidad, convenientemente espaciada y repetida.<sup>24</sup> Por supuesto, falta mucho camino por recorrer antes de concluir que ambas alteraciones son equivalentes. Evidentemente, la identificación del correlato bioquímico del fenómeno intestinal es indispensable; además, es necesario precisar con mayor detalle ciertas características del mismo; especialmente las relativas al efecto de la estimulación repetida sobre el umbral de respuesta, a la participación muscular en el desarrollo del fenómeno y a la presencia o no de daño tisular.

Si tal analogía se fortalece, el plexo mientérico del ídeo de cobayo, que contiene menos neuronas y una organización más simplificada que la del SNC, puede facilitar el estudio del correlato bioquímico del *kindling*, ya que su neuroquímica tiene un paralelismo muy estrecho con el descrito para el SNC.<sup>5,28</sup>

Por otro lado, este sistema *in vitro* para la identificación y estudio de anticonvulsivos, además de su rapidez y economía, tiene la ventaja de que la concentración del fármaco puede ser controlada con alto grado de precisión, y de hecho, reduce la complicación relativa a la biodegradación de las substancias químicas. Las observaciones aquí reportadas sugieren una alta susceptibilidad del fenómeno intestinal a la acción farmacológica anticonvulsiva. De nuevo, la evidencia sobre su utilidad real no es suficiente. Queda aún por explorar su especificidad relativa y capacidad para distinguir diversos tipos de anticonvulsivos. Lo hasta ahora encontrado sólo es fundamento para continuar indagando la utilidad de este modelo para el estudio de la actividad anticonvulsiva. Se puede pensar que este tipo de modelos, a diferencia de los que comúnmente se emplean para la selección de nuevos

antiepilépticos, puede desempeñar un papel significativo en los esfuerzos para identificar al antiepiléptico verdadero, que no necesariamente tiene que ser anticonvulsivo en los modelos experimentales.

## Referencias

1. Albertson TE, Peterson SL, Stark LG. Anticonvulsant drugs and their antagonism of kindled amygdaloid seizures in the rat. *Neuropharmacol* 1980;19:643.
2. Albertson TE, Peterson SL, Stark LG. The anticonvulsant effects of diazepam and phenobarbital in prekindled and kindled seizures in rats. *Neuropharmacol* 1981;20:597.
3. Albright PS, Burham WM. Development of a new pharmacological seizure model: Effects of anticonvulsants on cortical and amygdala-kindled seizures in the rat. *Epilepsia* 1980;21:681.
4. Altman IM, Corcoran ME. Facilitation of neocortical kindling by depletion of forebrain noradrenaline. *Brain Res* 1983;270:174.
5. Costa M, Furness JB. Neuronal peptides in the intestine. *Brit Med Bull* 1982;38:247.
6. Fernández-Guardiola A, Calvo JM, Pellicer F. Long-term synaptic potentiation and burst response increment could be due to encephalergic disinhibition. Experiments on spinal cord and amygdaloid kindling. En: Wada JA (ed). *Kindling 3*. New York: Raven Press, 1986:157.
7. Goddard G, McIntyre D, Leech C. A permanent change in brain function resulting from electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25:295.
8. Goddard LS, Grewal MS, Brown WC, Swinyard EA. Comparison of maximal seizures evoked by pentylenetetrazol (Metrazol) and electroshock in mice, and their modification by anticonvulsants. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;108:168.
9. Hardy CH, Panksepp J, Rossi J, Zolovick AJ. Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res* 1980; 194:293.
10. Kalichman MW. Neurochemical correlates of the kindling model of epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 1982;6:165.
11. Kovacz DA, Zoll JG. Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in the rat. *Brain Res* 1974;70:165.
12. Krall RL, Penry JK, Kupferberg HJ, Swinyard EA. Antiepileptic drug development. I. History and a program for progress. *Epilepsia* 1978;19:393.
13. Lewis J, Westerberg V, Corcoran ME. Monoaminergic correlates of kindling. *Brain Res* 1987;403:205.
14. Lujan M, Rodríguez R, Capistrán C, Velasco F, Velasco M. Kindling-like convulsive activities in the isolated ileum of the guinea pig. *Exp Neurol* 1987;98:249.
15. McIntyre DC, Edson N. Facilitation of amygdala kindling after norepinephrine depletion with 6-hydroxydopamine in rats. *Exp Neurol* 1981; 74: 748.
16. McIntyre DC, Stokes KA, Edson N. Status epilepticus following stimulation of a kindled hippocampal focus in

intact and commissurotomy rats. *Exp Neurol* 1986;94: 554.

17. Merritt HH, Putnam TJ. Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. *JAMA* 1938;111: 1068.
18. Myslobodsky MS, Valenstein ES. Amygdaloid kindling and the GABA system. *Epilepsia* 1980;21:163.
19. Peterson SL, Albertson TE. Neurotransmitter and neuro-modulator function in the kindled seizure and state. *Prog Neurobiol* 1982;19:237.
20. Pinel JP. Spontaneous kindled motor seizures in rats. En: Wada JA (ed). *Kindling 2*. New York: Raven Press, 1981; 179.
21. Pirreda SG, Woodhead JH, Swinyard EA. Effect of stimulus intensity on the profile of anticonvulsant activity of phenytoin, ethosuximide, and valproate. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;222:741.
22. Porter RJ. How to use antiepileptic drugs. En: Levy R, Mattson R, Meldrum B, Penry JK, Dreifuss FE, (eds). *Antiepileptic Drugs*. New York: Raven Press, 1989;117.
23. Putnam TJ, Merritt HH. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science* 1937;85:525.
24. Racine JA. Kindling: The first decade. *Neurosurgery* 1978; 3:324.
25. Rodríguez R, Capistrán C, López E, Beltrán del Río L, Luján M. Kindling-like phenomenon in the isolated ileum of the guinea-pig. *Life Sci* 1986;39:1037.
26. Siegel J, Murphy GJ. Serotonergic inhibition of amygdala-kindled seizures in cats. *Brain Res* 1979;174:337.
27. Wada JA. Pharmacological prophylaxis in the kindling model of epilepsy. *Pharmacol Prophyl* 1977;34:389.
28. Wood JD. Physiology of the enteric nervous system. En: Johnson LR, (ed). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1981;1.

## V. Sueño y epilepsia experimental

JOSE MARIA CALVO\*

El estudio de la relación entre el sueño y la epilepsia comprende dos aspectos fundamentales: el efecto de las crisis convulsivas, focales o generalizadas, sobre la organización del sueño y la incidencia de las crisis según las diferentes fases de éste. Los resultados descritos hasta el presente señalan que ambos tipo de crisis, tiene un efecto deletéreo sobre las fases del sueño y principalmente sobre la fase de sueño paradójico (SP). Este

\* División de Investigaciones en Neurociencias, Departamento de Cronobiología. Instituto Mexicano de Psiquiatría.

efecto también ha sido encontrado experimentalmente al aplicar electrochoques y durante el desarrollo de crisis focales que culminan en crisis generalizadas, provocadas por la estimulación repetida de la amígdala del lóbulo temporal (*kindling* amigdalino; KA). Sin embargo, es de interés hacer notar que los pacientes epilépticos no manifiestan padecer trastornos del sueño.

En lo que concierne a la incidencia de crisis durante el dormir, los resultados obtenidos por numerosos autores coinciden en que el sueño de ondas lentas (SOL) facilita la ocurrencia de crisis focales y generalizadas y que durante el SP, solamente ocurren las focales y en menor número que durante la vigilia o el SOL. Esto último señala que el SP tiene un efecto inhibitorio sobre las crisis epilépticas ya establecidas, sin embargo, aún queda por determinar qué componentes (electrofisiológicos o humorales) de esta fase del sueño son los responsables de dicha inhibición.

En el laboratorio se ha analizado el efecto de la epileptogénesis inducida por el KA sobre la organización del sueño de gatos en preparación crónica, llevando a cabo estudios longitudinales mediante registros diarios de 23 horas. Nuestros resultados, a diferencia de los descritos en la literatura, muestran un desfase circádico del SP en relación a la ocurrencia de las crisis y no la disminución significativa de esta fase del sueño. Probablemente el carácter longitudinal del estudio y las condiciones experimentales de habituación de los animales, expliquen las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores.

Por otra parte, también se ha investigado la probable influencia inhibitoria del SP sobre el desarrollo del KA, aplicando los estímulos eléctricos durante una salva de los fenómenos físicos (potenciales ponto-genículo-occipitales y movimientos oculares rápidos) del SP. Los resultados muestran que el SP provoca el retraso significativo del proceso del KA, señalando que esta fase del sueño también tiene una influencia inhibitoria sobre la epileptogénesis y que probablemente sus fenómenos físicos jueguen un papel importante.

Existen evidencias de la participación de factores proteínicos en la instalación y mantenimiento del SP, que se acumulan durante la privación selectiva de esta fase del sueño. Con objeto de analizar si los componentes humorales del SP participan en la inhibición de las crisis, se analizó el desarrollo del KA en gatos sometidos a la privación de SP. Esta maniobra experimental provocó la inhibición del desarrollo del KA, lo que sugiere que la "presión" de SP provocada por la acumulación de sus factores inductores, participa de manera importante en la inhibición de la epileptogénesis.

## VI. Activación eléctrica progresiva del sistema límbico (Kindling)

AUGUSTO FERNANDEZ GUARDIOLA  
LUISA ROCHA  
ADRIAN MARTINEZ  
RODRIGO FERNANDEZ MAS  
RAFAEL GUTIERREZ

En los años 60, Graham V. Goddard (1967-1969) realizó experiencias para probar la hipótesis del papel del Sistema Límbico en los procesos de aprendizaje, para ello utilizó animales, ratas, con electrodos implantados en diversos lugares del cerebro anterior, principalmente en la amígdala del lóbulo temporal. Los animales eran sometidos a diversas pruebas de aprendizaje, mientras su cerebro era estimulado, durante unos segundos diariamente, con corrientes no polarizantes de baja intensidad. La hipótesis a comprobar era si un cambio periódico de excitabilidad en el sistema límbico se traducía en una alteración plástica que modificara el proceso de aprendizaje. En el curso de estos experimentos, se encontró que los animales de lento aprendizaje, que fueron estimulados por diez o más días comenzaban a mostrar signos de automatismos epilépticos que culminaban eventualmente en crisis convulsivas generalizadas. Tras varios años de búsqueda se estableció que el fenómeno no era una complicación debida a factores tales como infección, acción electrolítica de los iones metálicos de los electrodos, o defectos de los estimuladores. Goddard (1969) se abocó al estudio del fenómeno, encontrando zonas del cerebro positivas y negativas. Entre las primeras, las más excitables fueron la amígdala del lóbulo temporal, el septum, el área olfativa, las cortezas entorrinal y piriforme y el hipocampo y globus pallidum. Las segundas zonas que fueron estimuladas por más de cien días sin obtener respuesta, incluían al cerebelo, núcleo rojo, formación reticular mesencefálica, sustancia gris central, tectum y sustancia nigra. A estas áreas negativas (Fernández-Guardiola y col. 1981) se agregó al núcleo raquí dorsal, que estimulado por más de 300 días en el gato, no dio lugar al efecto *Kindling* a pesar de que se producía una respuesta local, de muy larga duración, de ondas rítmicas amplias y sinusoidales, pero que no se propagaban ni producían otro efecto conductual que un

moderado aumento del sueño MOR, con una disminución de la amplitud de las ondas ponto-genículo-occipitales (PGO), en las horas que seguían a la estimulación eléctrica del rañé dorsal.

Goddard llamó a este fenómeno del crecimiento progresivo de la postdescarga que culminaba en crisis convulsivas "el efecto *Kindling*" y buscando antecedentes lo encontró semejante y como formando parte de la "epileptogénesis secundaria" y "el foco en espejo" descritos por Frank Morrell (1960) años antes, utilizando modelos de activación local con agentes convulsivantes tópicos. También el grupo de J.M.R. Delgado en Yale (1961) había estimulado repetidamente la amígdala y el hipocampo en gatos con electrodos implantados y observado un efecto semejante. También Gastaut y col (1959) y Gloor (1957) habían generado un modelo de epilepsia experimental amigdalina con crema de alúmina o estimulación eléctrica. Pero ninguno de estos autores utilizó las corrientes débiles y repetidas que utilizó Goddard. Sus procedimientos fueron muy diferentes y provocaban las crisis inmediatamente o con muy corta latencia y además producían lesiones muy extensas. Lo mismo sucedió con el empleo de Cobalto (Kopeloff, 1960; Dow y col. 1962). Además, y esto es quizá lo más importante, los modelos de epilepsia focal con convulsivantes tópicos son evanescentes, desaparecen en pocos días y dejan una lesión neurológica no epileptica. El *Kindling*, por el contrario, se establece lentamente, pero el cambio plástico que induce es de muy larga duración y modifica en forma permanente el umbral convulsivo. De hecho es, hasta ahora, el único modelo de epilepsia experimental que lo hace, en todas las especies de mamíferos en que se ha explorado.

¿A qué se debe este cambio de plasticidad sináptica y trans-sináptica? La electrofisiología celular del fenómeno, ha revelado tres cambios fundamentales, y al parecer independientes, que dieron lugar a hipótesis sobre los mecanismos del *Kindling*, estos son: a) una potenciación sináptica de larga duración (*long term potentiation*, LTP); b) la comprobación de mecanismos de desinhibición Gabaérgica y Encefalinérgica, y c) Un cambio en la característica de respuesta de las neuronas, que muestran "desviaciones despolarizantes" con descargas de alta frecuencia -neuronas epilépticas, Ward (1969)- que se ponen en evidencia en la generación de espigas interictales, durante el desarrollo del *Kindling*.

Cuando se encontró la LTP desde los primeros días de estimulación, se pensó que ésta podía explicar el mecanismo del *Kindling*. En efecto, los potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) aumentan significativamente. Lo mismo sucede con la población de células que responden al estímulo, que se mide por el incremento en el número de espigas en registros multiunitarios. Pero varios hechos nos hacen pensar ahora que si bien la LTP puede ser necesaria para el inicio o instalación del *Kindling*, no lo es para su mantenimiento, pues la LTP, por una parte se instala con gran rapidez y no

evoluciona como las postdescargas EEG y, por la otra, desaparece cuando se suspenden las estimulaciones, a pesar de que el umbral para las convulsiones persista muy por abajo del control. Ahora bien, el aumento de la población de células que responden parece ser independiente de la magnitud del PPSE de campo, es más puede persistir aunque este último decrezca. La conclusión sería que la LTP es tal vez necesaria para la instalación del *Kindling*, pero no para su mantenimiento, el cual dependería más bien del número de células que responden.

Otra hipótesis basada en la alteración de las respuestas sinápticas es la que sostiene que la hiperexcitabilidad neuronal puede ser el resultado de una desinhibición al suprimirse la acción de un neurotransmisor inhibitorio. El principal candidato es el GABA. Los potenciales de campo, registrados en animales con electrodos a permanencia han permitido el estudio de la desinhibición, especialmente cuando se estimula la vía perforante y se registran las células granulosas del *gyrus dentatus* del hipocampo. Si el estímulo es lo suficientemente fuerte como para provocar una respuesta de las células granulosas, pueden provocarse varios tipos de inhibición. El primero es la inhibición recorrente mediada por GABA, debida a una conductancia aumentada al Cl<sup>-</sup> y que dura unos 100 msec; el segundo componente inhibitorio se expresa como una hiperpolarización de larga duración (hasta un segundo), producida por un incremento en la conductancia al K<sup>+</sup>, debida a su vez a la activación de la entrada de Ca<sup>++</sup> o a una anteaactivación sináptica de los receptores GABAB en las dendritas (o a ambas cosas). A pesar de que estos procesos inhibitorios se pueden medir con bastante exactitud, no se han encontrado cambios consistentes durante el *kindling*.

Otro de los cambios, que mencionábamos, revelado por la electrofisiología celular, es el modo de "descarga paroxística" adoptado por las neuronas en un foco epiléptico. Consiste en que, en forma espontánea o como respuesta a una estimulación, las neuronas exhiben desviaciones, de larga duración, de su potencial de membrana hacia la despolarización, sobre la que aparecen potenciales de acción con una frecuencia mucho más alta que la de reposo en una neurona no epileptizada. Este mecanismo fue comprobado en el caso del *Kindling* del hipocampo utilizando las espigas llamadas inter-ictales que tienen lugar en los periodos alejados de la estimulación, persistiendo después del estadio 6 de crisis convulsivas generalizadas. Racine demostró con registros extracelulares de las células de CA1, que éstas presentaban en forma progresiva esta depolarización paroxística interictal espontánea.

En los procesos epilépticos en general, llama la atención la latencia entre la causa (trauma, accidente perinatal, accidente vascular, etc) y el efecto convulsivo, que puede ser focal o generalizado, de un sólo foco o de focos múltiples, más o menos propagado y cuya expresión crítica es de una duración

variable. Todos estos procesos nos hablan de un control cerebral de la propagación y la inhibición de la actividad convulsiva, a través del cual, estructuras que normalmente modifican la excitabilidad, sobre todo cortical, regularían la "permeabilidad" sináptica. Tales estructuras pueden ser las responsables de mantener un tono particular, como sucede con la Formación Reticular Mesencefálica en los procesos de atención y cuya desaparición da lugar a la somnolencia y al sueño. Esto plantea inmediatamente la pregunta de que cuál es el neurotransmisor químico involucrado en este posible control de la actividad convulsiva. A responder a esta pregunta, se ha dedicado una gran cantidad de trabajo experimental. Por fortuna existe en el cerebro una cierta sistematización nuclear en cuanto a la síntesis y liberación de los neurotransmisores, así podemos estimular el *locus caeruleus* o el complejo nuclear del *rafé*, por ejemplo, e inducir un aumento en la NE o 5HT. Obien depletar estos niveles con fármacos específicos.

### Aminas biogénicas

Los primeros resultados mostrando una importante reducción de las catecolaminas centrales Norepinefrina (NE) y Dopamina (DA) en el *Kindling* límbico fueron reportados por Sato y Nakashima (1975). Engel y col (1977) demostraron una reducción de larga duración de la dopamina en la amígdala del lóbulo temporal, como consecuencia del *Kindling*. Pero, en general los estudios de recambio y niveles de catecolaminas en el *Kindling* han sido poco consistentes.

Cuando se ha intervenido con fármacos sobre el metabolismo de estas sustancias los resultados han sido un poco más alentadores. Arnold y col. (1973) demostraron que la velocidad del *Kindling* amigdalino se aceleraba notablemente al administrar a las ratas reserpina o 6-hydroxy-dopamina (6-OHDA). Estudios posteriores parecen indicar que es sobretudo la disminución de NE la que facilita el proceso, pero todavía no se ha descartado que también la DA lo haga.

### Péptidos opioides

Aunque la exploración del papel de los péptidos opioides ha sido menos estudiado, por ser el descubrimiento de estos pépticos y sus receptores más recientes, parecen jugar también un papel en los cambios de excitabilidad del *Kindling*. Repetidamente se ha descrito acciones de estos opioides en relación con la epileptogénesis. Los trabajos tratan, en general, de tres aspectos: a) acciones de la morfina y otros opiáceos exógenos; b) acciones de los opioides endógenos, principalmente beta-endorfina, dinorfinas y leu y met encefalinas y c) acciones de los antagonistas, principalmente Naloxona y Naltrexona. El interés por estos fármacos en la epileptogénesis secundaria tipo

*Kindling*, se inició por el hallazgo, en nuestro laboratorio, de un incremento en los niveles de leu y met-encefalina en el cerebro de ratas sometidas al *Kindling* amigdalino (Vindrola y col, 1981). Más tarde (Vindrola y col, 2o) se demostró que el incremento era diferencial, es decir, que la leu-encefalina comenzaba a aumentar desde el inicio del *Kindling*, pero la Metencefalina lo hacía solamente al final de la fase o estadio conductual 5, cuando ya la rata había presentado varias crisis convulsivas. Posteriormente, Iadarola y col (1986) y Naranjo y col (1986) confirmaron y ampliaron estos resultados encontrando un aumento en el mRNA de proencefalina, Met5-encefalina-Arg6-Gly7-Leu8 y colecistokinina, en el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal, núcleo accumbens, corteza frontal y sustancia nigra, durante el *Kindling*. Nuestra búsqueda de opioides endógenos en las áreas sometidas a epileptogénesis primaria se originó por los hallazgos en la médula espinal, en la que pudimos demostrar la facilitación progresiva de reflejos polisinápticos, cuando se estimulaban los aferentes con las mismas características eléctricas que las empleadas en el *Kindling* amigdalino. Además en estos experimentos iniciales, encontramos que la naloxona, antagonista de los opioides, potenciaba *per se* y en una forma notable esta facilitación de los reflejos espinales (Fernández-Guardiola y col. 1982). El paso siguiente se basó en la hipótesis de que los opioides endógenos pudiesen incrementarse en los procesos epilépticos, precisamente para inhibir la epileptogénesis secundaria. Para ello, realizamos experimentos de *Kindling* en la preparación "encefalo aislado" de gato, en la que se probó el efecto de dosis repetidas de naloxona (2, 4, 8, mg/kg). El *kindling* compactado se llevó a cabo con un intervalo interestimulo de 15 minutos, tanto en situación control, como bajo la administración endovenosa de naloxona, 5 minutos antes de la estimulación amigdalina. Se encontró que es posible completar el proceso de *kindling* amigdalino en la preparación de "encefalo aislado", alcanzando el estado final de crisis electrográficas generalizadas tónico-clónicas. El aumento de la duración, frecuencia y propagación de la posdescarga fue acentuado por la naloxona en forma dosis-respuesta. El antagonista también aumentó la amplitud del primer potencial evocado por el tétanos. El número de ensayos necesarios para llegar a las crisis generalizadas también fue reducido por el fármaco. Estos experimentos constituyen una prueba más del posible papel inhibitor de los opioides endógenos en el *Kindling*.

### Aminoácidos excitadores

En los últimos años han aparecido un gran número de trabajos relacionando al *Kindling* con los aminoácidos excitadores y sus receptores. Pruebas muy recientes sugieren que los receptores al N-metil-D-aspartato (NMDA) participan en las des-

cargas epileptiformes de las "rebandas" de hipocampo, en condiciones favorables para su activación, precisamente ante patrones de estimulación como los que generan el proceso de *Kindling*.

Holmes y col (1990), encontraron resultados con antagonistas, que sugieren que los receptores NMDA están involucrados principalmente en el desarrollo del *Kindling* y no tanto en su mantenimiento. Pero otros autores (Trommer, Pasternak, 1990) utilizando animales de pocos días y antagonistas como la Ketamina y el MK-801, encontraron un efecto inhibitorio mucho más marcado, abarcando en período de crisis ya establecidas.

Como ya hemos señalado, el *Kindling* induce una potenciación significativa de los PPsE (47%) y de la población de células que responde (49%). En los animales tratados con el antagonista MK-801 no se encontró estos aumentos en los componentes del potencial de campo, aunque, sin embargo, estos animales sí desarrollaron el estado de *Kindling*. De esto se concluye que a pesar de que la potenciación mediada por los receptores al NMDA facilita la instauración del *Kindling*, la potenciación sináptica no aparece como un componente crítico para su maduración. Una vez más se fortalece la idea de que el aumento progresivo de la posdescarga de alta frecuencia es el fenómeno fisiológico crítico para el desarrollo del *Kindling*.

#### Genes inmediatos tempranos y proteínas ligandos de DNA

En la búsqueda de algún cambio a nivel molecular que explique el *Kindling* se ha pensado en la modificación de alguna proteína o, incluso, en la producción de una nueva, específica de este proceso y que podría ser un receptor, una enzima o una proteína estructural. De todas formas, la síntesis y recambio de proteínas es un proceso rápido, de horas, lo que no explicaría la permanencia del "estado" *Kindling*, en ausencia de crisis reforzante. Dragunow y col (1989), pensaron en la posibilidad de que las posdescargas repetidas indujeran un cambio en la expresión genética, manteniéndose así el cambio necesario para el mantenimiento del estado de bajo umbral convulsivo. Trabajos muy recientes sobre una clase de genes denominados "genes inmediatos-tempranos" o "genes de competencia", han arrojado luz sobre como las señales convergen en el genoma de las células excitables. Ejemplos de estos elementos (que se conocen también como "terceros mensajeros" o proto-oncogenes nucleares) son *C-FOS*, *C-JUN*, *C-MYC*, etc.

Hipóticamente la secuencia sería neurotransmisor → receptor → de flujo  $Ca^{++}$  → segundo mensajero (calmodulina) → Proteína Quinasa → IEGmRNA → C-FOS

o JUN → proteínas estructurales permanentes → *Kindling*. Aunque esto es por ahora altamente especulativo, se comienzan a acumular más y más pruebas (Aumentos de Proteína quinasa y de C-FOS y C-JUN), examinadas a dilucidar este posible mecanismo de la permanente alteración de la excitabilidad celular que representa el *Kindling*.

#### Referencias

1. Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 1967; 214: 295.
2. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295.
3. Fernández-Guardiola A, Condés-Lara M, Calvo JM. Synaptic changes induced by optic chiasm low intensity repetitive electrical stimulation (The Kindling effect). En: Tapia R, Cotman C (eds). *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*. New York: Plenum Press 1981; 331.
4. Morrel F. Secondary epileptogenic lesions. *Epilepsia*. 1960; 1: 538.
5. Delgado JRM, Sevillano -M. Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol* 1961; 13: 722.
6. Gastaut H, Naquet R, Meyer A, Cavamagh JB, Beck E. Experimental psychomotor epilepsy in the cat. *J Neuropathol Exper Neurol* 1959; 18: 270.
7. Gloor P. The pattern of conduction of amygdaloid seizure discharge. *Arch Neurol Psychiat* 1957; 77: 247.
8. Kopeloff LM. Experimental epilepsy in the mouse. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1960; 194: 500.
9. Dow RS, Fernández-Guardiola A, Manni E. The production of experimental cobalt epilepsy in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1962; 14: 399.
10. Ward AA Jr. The epileptic neuron: Chronic foci an animal and man. En: Jasper HH, Ward AA Jr. Pope A (eds). *Basic mechanism of the epilepsy*. Boston: Little Brown and Co, 1969; 263.
11. Sato M, Nakashima T. Kindling: secondary epileptogenesis, sleep and catecholamines. *Can J Neurol Sci* 1975; 2: 439.
12. Engel J, Sharpless NS. Long-lasting depletion of dopamine in the rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Res* 1977; 136: 381.
13. Arnold PS, Racine RJ, Wise RA. Effect of atropine, reserpine, 6-hydroxy-dopamine, and handling on seizure development in the rat. *Exp Neurol* 1973; 40: 475.
14. Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández-Guardiola A. Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett* 1981; 21-39.
15. Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández-Guardiola A. Brain content of leu- and met5-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. *Neurosci Lett* 1981; 26: 125.

16. Iadarola MJ, Shin y C y col. Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res* 1986; 365: 185.
17. Naranjo JR, Iadarola MJ, Costa E. Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling. *J Neurosci Res* 1986; 16: 75.
18. Fernández-Guardiola A, Calvo JM, Barragán LA, y col. Kindling in thye spinal cord: differential effects con mono- and polysynaptic reflexes and its modifications by atropine and naloxone. *Electroenceph Clin Neurophysiol Suppl* 1982; 36: 257.
19. Holmes KH, Bilkey DK, Lavery R, Goddard GV. The N-methyl-D-aspartate antagonists aminophosphonate and carboxypiperazinephosphonate retard the development and expression of kindled seizures. *Brain Res* 1990; 506: 227.
20. Trommer BL, Pasternak JF. NMDA receptor antagonists inhibit kindling epileptogenesis and seizure expression in developing rats. *Develop. Brain Res* 1990; 53: 248.
21. Dragunow M, Currie RW, Faull RLM y col. Immediate early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci & Behav Rev* 1989; 13: 301.

