

2000-B

093645847

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**PARTICIPACIÓN DEL GLUTAMATO EN LA PROPAGACIÓN
DE LAS CRISIS EPILEPTIFORMES INDUCIDAS POR LA
4-AMINOPIRIDINA EN EL CIRCUITO
CORTEZA ENTORRINAL – HIPOCAMPO DE RATAS**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A:
JUSTO MURGUÍA CASTILLO**

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, FEBRERO del 2002.

186639/022020
B739

W
W



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JUSTO MURGUÍA CASTILLO
P R E S E N T E .**

Manifiesto a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título **"PARTICIPACIÓN DEL GLUTAMATO EN LA PROPAGACIÓN DE LAS CRISIS EPILEPTIFORMES INDUCIDAS POR LA 4-AMINOPYRIDINA EN EL CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO DE RATAS"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA** y como asesor al **DR. ALBERTO MORALES VILLAGRÁN**.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 26 de septiembre del 2001

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Leticia Hernández López
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA.-DIRECTORA DEL TRABAJO.**
c.c.p. **DR. ALBERTO MORALES VILLAGRÁN.-ASESOR DEL TRABAJO.**
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó él (la) pasante:

JUSTO MURGUÍA CASTILLO

con el título:

Participación del Glutamato en la Propagación de las Crisis Epileptiformes Inducidas por la 4-aminopiridina en el Circuito Corteza Entorrinal – Hipocampo de Ratas

Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva a brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 18 de Febrero del 2002

EL DIRECTOR DE TESIS

NOMBRE Y FIRMA

DRA. LAURA MEDINA CEJA



**COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

SINODALES

**1. DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA
NOMBRE COMPLETO**

**2. DRA. GRACIELA GUDIÑO CABRERA
NOMBRE COMPLETO**

**3.M. EN C. MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO
NOMBRE COMPLETO**

EL ASESOR

NOMBRE Y FIRMA

**DR. ALBERTO MORALES
VILLAGRÁN**

FIRMA

FIRMA

FIRMA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. en Ciencias Laura Guadalupe Medina Ceja y la asesoría del Dr. en Ciencias Alberto Morales Villagrán.

A quien amo:

Graciela León Montes por todo su apoyo y amor.

A mi madre Nicolasa Castillo por todo su cariño y apoyo que me ha dado

A Citlali Murguía a quien quiero como a una hija

A quienes padecen la terrible enfermedad de la epilepsia,
que con la esperanza en que llegue el día en que no haga falta
escribir algo como esto.

Dedicada especialmente a quién en vida llevó el nombre de

Justo Murguía Figueroa

quien me enseñó a ser hombre
y que siempre anheló este momento,
te agradeceré toda mi vida
lo que me brindaste con tú ejemplo y esfuerzo
y que con orgullo llevo tú nombre.

En cualquier punto del universo en que te encuentres

"GRACIAS"

PAPÁ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara y en especial al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por haberme formado profesional y humanísticamente.

A la Dra. en Ciencias Laura Guadalupe Medina Ceja por todo su gran apoyo y paciencia en la dirección de este trabajo.

No existen las palabras adecuadas para manifestar el agradecimiento de manera muy especial al Dr. en Ciencias Alberto Morales Villagrán, por su amistad y por todo el apoyo que me ha brindado en esta etapa de mi formación.

A la M. en C. Mónica Elisa Ureña Guerrero a quién aprecio y estimo mucho, agradeciéndole especialmente todo su apoyo y paciencia que me ha brindado en mi formación.

A los Doctores en Ciencias: Jacinto Bañuelos, Graciela Gudiño, Mónica Ureña y Alfonso Islas, por todos sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

A mi Gran amigo el Ing. Alejandro Gutiérrez Martínez a quien le debo parte de mi formación profesional y personal.

A todos mis hermanos, en especial a Leobardo y José, quienes me han apoyado siempre durante toda mi carrera.

A mis amigos que encontré en la carrera que siempre me han apoyado.

A la familia Cázares Ortega y en especial a la Lic. Cecilia Cázares por su gran amistad y apoyo otorgado.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Lista de abreviaturas	4
II. Resumen	7
III. Introducción	9
3.1 Epilepsia	10
3.2 Modelos de epilepsia experimental	12
3.3 Glutamato, GABA y Epilepsia	14
IV. Antecedentes	22
4.1 Modelo de crisis por 4-AP	22
4.1.1 Modelo de crisis convulsivas	22
4.1.2 Mecanismo de acción de la 4-AP	24
4.1.3 Efecto de la 4-AP sobre la liberación de Neurotransmisores	25
4.2 Circuito corteza entorrinal – hipocampo	29
4.2.1 La formación hipocámpica	29
4.2.2 Circuito corteza entorrinal – hipocampo	35
V. Planteamiento del problema	39
VI. Hipótesis	41
VII. Objetivos	42
VIII. Materiales y Métodos	43
IX. Resultados	47
9.1 Observaciones conductuales	47

9.2	Registro EEG	47
9.3	Niveles extracelulares de los aminoácidos	48
X.	Discusión	54
XI.	Conclusiones	59
XII.	Bibliografía	60

LISTA DE ABREVIATURAS

A-P	Anteroposterior
ADP	Difosfato de adenosina
Ala	Alanina
AMPA	α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-4-propionato
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análisis de varianza
Asp	Aspartato o ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosín fosfatasa
BAS	Bioanalytical systems
CA1, CA2, CA3	Campos de Ammon o <i>Cornus ammonis</i>
CA3a, b, c	Subcampos de CA3
CA4	Capa polimórfica o Hilus del GD
Ca ⁺⁺ ATPasa	Adenosín fosfatasa dependiente de calcio
Ca ⁺⁺ HVA	Corrientes de calcio de umbral alto de activación
CE	Corteza entorrinal
4-AP	4-aminopiridina
EEG	Electroencefalográfico
EPSP	Potencial postsináptico excitador
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A y B	Receptores de GABA tipo A y B
GABA-T	4-aminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa

GAD	Descarboxilasa de ácido glutámico
GAT1, 2, 3	Transportadores de GABA tipo 1, 2, 3
GD	Giro dentado
G _i	Proteína G tipo i
G _o	Proteína G tipo o
Gln	Glutamina
Glu	L-glutamato o ácido glutámico
GLUR1-4	Subunidades de los receptores tipo AMPA
GLUR5-7	Subunidades de los receptores tipo kainato
Gly	Glicina
GMP	Monofosfato de Guanosina
GMPc	Monofosfato de Guanosina cíclico
HP	Hipocampo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
I _A	Corriente de potasio tipo A
i.c.	Intracerebral
I _D	Corriente de potasio de inactivación lenta tipo D
i.p.	Intraperitoneal
IP3	1, 4, 5-inositol trifosfato
IPSP	Potencial postsináptico inhibitor
KA	Ácido kainico o Kainato
L	Lateral
LTD	Depresión de largo término
LTP	Potenciación de largo término

Ca ⁺⁺ LVA	Corrientes de Ca ⁺⁺ de umbral bajo de activación
M1-4	Dominios transmembranales de las subunidades polipeptídicas de los receptores ionotrópicos a Glu
mGLUR1-8	Receptores metabotrópicos a Glu tipo 1-8
μl/min	Microlitros por minuto
mM	Milimolar
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa	Adenosin trifosfatasa dependiente de sodio y potasio (bomba sodio y potasio)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NR1, NR2A-D	Subtipos de subunidades del receptor tipo NMDA
orn-t	Ornitina aminotransferasa
PCP	Fenciclidina
P5C	Δ ¹ -Ácido pirrolino-5-carboxílico
R-AMPA	Receptor glutamatérgico tipo AMPA
R-KA	Receptor glutamatérgico tipo kainato
R-NMDA	Receptor glutamatérgico tipo NMDA
SNC	Sistema Nervioso Central
Tau	Taurina
THIP	4,5,6,7-tetrahidroisoxazol[4,5-c]piridin-3-ol
TPI	4,5,6,7-tetrahidroisoxazol-piridinol
V	Ventral

RESUMEN

La 4-Aminopiridina (4-AP) promueve la liberación generalizada de neurotransmisores, tanto en la unión neuromuscular, como en rebanadas de cerebro y sinaptosomas. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la 4-AP bloquea la corriente transitoria de K^+ (I_A) y la de inactivación lenta (I_D), fenómeno que conduce a una prolongación del potencial de acción a través de un retardo en la fase de repolarización, lo que mantiene los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje abiertos y estimula la liberación de neurotransmisores. Por otro lado el Glutamato (Glu) es uno de los neurotransmisores de mayor importancia en la fisiología del circuito corteza entorrinal-hipocampo, su liberación excesiva, así como su interacción con sus receptores juega un papel crítico en el inicio y mantenimiento de la crisis epilépticas.

Para poder estudiar la participación del Glu en el HP durante la propagación del proceso convulsivo inducido a través de la inyección de la 4-AP (250 nmol/2 μ L/min) en la CE, se utilizó la técnica de microdiálisis y registro simultáneo de la actividad eléctrica en ratas en libre movimiento y anestesiadas. Los resultados obtenidos muestran que la 4-AP elevó los niveles extracelulares de Glu, tanto en el grupo anestesiado (299%) como en libre movimiento (1241%). Además, la 4-AP también incrementa significativamente los niveles extracelulares de glutamina, glicina, taurina, alanina y GABA. Particularmente en el caso del GABA se encontró un aumento mucho mayor en el grupo anestesiado que en el grupo en libre movimiento. El registro electroencefalográfico mostró en la CE actividad epileptiforme intensa en ambos grupos, que se caracterizó por complejos espiga-onda y poli-espigas de frecuencia alta. Esta actividad se propagó de manera inmediata a la región de proyección (HP), además

de presentarse el *status epilepticus* en ambos grupos a diferentes tiempos. Estos resultados sugieren que el aumento en la función sináptica glutamatérgica en el circuito corteza entorrinal-hipocampo está involucrado en la propagación de las crisis convulsivas inducidas por la administración de la 4-AP.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas, mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno (López - Antúnez, 1996). De dicha adecuación depende la posibilidad de adaptación al medio ambiente y por tanto, la supervivencia.

El sistema nervioso, comúnmente se divide en: **Sistema Nervioso Central (SNC)** y **Sistema Nervioso Periférico (SNP)**. El SNC, está constituido por el encéfalo contenido en el cráneo y la médula espinal, alojada en el conducto raquídeo, este sistema representa el nivel integrativo de la información. El SNP comprende los nervios espinales y craneales conformados por prolongaciones neuronales aferentes y eferentes. Las primeras constituyen el nivel de aferencia y las segundas, el nivel de eferencia. Cada uno de estos tipos de neuronas se subdivide en somáticas y viscerales. Los nervios espinales contienen fibras aferentes y eferentes tanto somáticas como viscerales. Los nervios craneales tienen una organización muy variable en cuanto a las fibras que los forman. Los componentes viscerales del sistema nervioso periférico y los ganglios paravertebrales, prevertebrales y paraviscerales asociados, constituyen el **sistema nervioso neurovegetativo** que se subdivide en **parasimpático** y **simpático**, que regulan la actividad de las vísceras (López - Antúnez, 1996).

Con respecto a los estímulos que recibe el SN, consisten en cambios de energía que ocurren en el medio y pueden ser de diferente tipo: físicos (térmicos, mecánicos, electromagnéticos) o químicos; y constituyen la información que el organismo recibe y a la cual debe responder. Así, los organismos multicelulares cuentan con estructuras

especializadas en el registro de dichos cambios, los receptores sensoriales, cuya función es traducir los diferentes tipos de energía, parte esencial de los impulsos nerviosos (López - Antúnez, 1996). Cuando ocurre una disfunción en el procesamiento de dicha información, esta puede traer consigo diferentes tipos de daños, manifestándose como desórdenes neurológicos o neuropatologías como lo es la epilepsia (López - Antúnez, 1996).

3.1 EPILEPSIA

La palabra **epilepsia** se deriva del verbo griego *Epilambanein* (*epilamvanein*) "Ser apoderado", "Ser poseído" o "Ser atacado". La epilepsia se define como un síndrome de disfunción cerebral, de carácter recurrente que se caracteriza por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales (foco epileptógeno) (Zielinski, 1988). Dichas descargas se asocian con manifestaciones conductuales que van a depender del tipo y localización de las neuronas involucradas (Wasterlain, 1989). Estas descargas se representan en un registro electroencefalográfico (EEG), el cual puede presentar un cambio súbito en lo que respecta a la frecuencia y amplitud lo que se denomina fenómeno paroxístico, caracterizado por su forma de punta, punta-onda, polipunta u onda (Liga Central Contra la Epilepsia, 1998).

Las crisis epilépticas pueden presentarse como una complicación de accidentes infecciosos, traumáticos, tumorales, alteraciones sistémicas, desórdenes metabólicos, toxicidad por fármacos o como parte de síndromes hereditarios (Engel y Pendley, 1998). La epilepsia se caracteriza por una tendencia a la hiperexcitabilidad a

desarrollarse en una u otra región del SNC (Engel y Pendley, 1998; Wasterlain, 1989), dicho estado hiperexcitable es la base de varias formas de epilepsia (Dichter, 1998).

En la epilepsia podemos hablar de dos eventos importantes que la propician: 1) la excitabilidad celular que se refiere a los procesos que regulan la despolarización y la repolarización de la membrana; y 2) el desarrollo aberrante de la integración neuronal por anomalías en la sincronización de las poblaciones neuronales y la propagación de las descargas epilépticas, dentro de la vía neuronal. Ambos eventos pueden presentarse antes de que las crisis lleguen a ocurrir (Engel y Pendley, 1998).

Desde el punto de vista de la neurotransmisión sináptica, la epilepsia ha sido considerada tanto como un trastorno de la inhibición (por deficiencia), como de la excitación (por exceso); la complejidad de la epilepsia incluye ambos fenómenos (Lloyd et al., 1986; Olsen et al., 1985). Respecto a los neurotransmisores inhibitorios, el ácido γ -aminobutírico (GABA) es uno de los principalmente involucrados en el fenómeno paroxístico; la disminución de los niveles de este aminoácido o de su síntesis se asocia a la presencia de focos epileptogénicos (Lloyd et al., 1986; Olsen et al., 1985). Además, los fármacos que aumentan la concentración de GABA en el SNC presentan propiedades anticonvulsivas (Lloyd et al., 1986; Olsen et al., 1985). Por otro lado, dentro de los neurotransmisores excitadores, el glutamato (Glu) y el aspartato (Asp), a través de la activación de sus diferentes tipos de receptores, ejercen un papel importante sobre la transmisión excitadora rápida en el SNC, en condiciones normales y patológicas como la epilepsia (Engelsen, 1986; Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984). Además, diversas evidencias experimentales los han relacionado con los mecanismos

de iniciación de las crisis epilépticas (Faingold et al., 1992; Geddes et al., 1990; Piredda y Gale, 1986).

La clasificación de la epilepsia es compleja y se puede basar en la etiología, la patología, la edad de inicio, las crisis clínicas, los hallazgos electroencefalográficos o el pronóstico. La epilepsia puede dividirse principalmente por la localización de las crisis, en generalizada o focal. Asimismo, se puede dividir en: sintomática, idiopática o criptogénica dependiendo si se conoce o no la etiología (Zielinski, 1988).

3.2 MODELOS DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL

La mayoría del conocimiento acerca de los mecanismos celulares y moleculares de los eventos epileptiformes específicos y de la terapia con fármacos anticonvulsivantes proviene de estudios con modelos de epilepsia experimental (Dichter, 1989). Dichos modelos presentan algunas de las manifestaciones de la epilepsia humana. En la mayoría de los modelos de epilepsia focal se utiliza la aplicación de sustancias convulsivas en la corteza cerebral o en el sistema límbico tanto *in vivo* como *in vitro* (Turski et al., 1983; Yamamoto, 1972). En el caso de las epilepsias generalizadas se utiliza la aplicación sistémica de convulsivantes como el pentilentetrazol, la picrotoxina, la bicuculina y el ácido kaínico, o bien la aplicación de trenes de corriente eléctrica, en el modelo de electroshock máximo (Gloor y Oliver, 1982). El kindling de amígdala e hipocampo se ha empleado para generar crisis parciales complejas con gran éxito (Gloor y Oliver, 1982). En tanto que los modelos de predisposición genética se utilizan organismos genéticamente modificados (Tabla 1) (Gloor y Oliver, 1982; Krauss et al., 1989).

TABLA 1. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

1. EPILEPSIA PARCIAL O FOCAL

1.1. SIMPLE

- Aplicación tópica de convulsivantes
- Postdescargas focales (Electroshock directo)
- Congelación focal
- Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

1.2. COMPLEJA

- Kindling
- Ácido kaínico
- Toxina tetánica

2. EPILEPSIA GENERALIZADA

2.1 TÓNICO-CLÓNICAS

- Modelo de 4-AP
- Electroshock máximo
- Aplicación sistémica de convulsivantes (estimulantes de la excitación o bloqueadores de la inhibición)
- Crisis inducidas por estimulación fótica a monos fotosensibles (*Papio papio*)
- Roedores con predisposición genética

2.2 TIPO AUSENCIA

- Modelos genéticos en roedores
- Penicilina sistémica
- THIP 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol[4,5-c]piridin-3-ol (agonista a receptores GABA_A)
- Gama-hidroxibutirato

Modificado de Fisher, R. S., 1991

3.3 GLUTAMATO, GABA Y EPILEPSIA

GLUTAMATO

El Glu es el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos (Giraldez y Girardi, 2000; Mateu et al., 2000; Palmer et al., 1994; Zilkha et al., 1995; Miele et al., 1996) y es uno de los neurotransmisores de mayor importancia en la fisiología de la formación hipocámpica (Vizi y Kiss., 1998; Wasterlain, 1989). Se sintetiza a partir de la glucosa y otros precursores, a través de varias rutas bioquímicas dentro del cerebro. Así, puede producirse: a) por la transaminación del α -cetoglutarato; b) a partir de la glutamina (Gln) por acción de la enzima glutaminasa; c) a partir de α -cetoglutarato por acción reversa de la enzima deshidrogenasa del ácido glutámico; y d) por acción de la ornitín-aminotransferasa a partir de ornitina por la enzima aminotransferasa. El papel preciso del Glu formado por cada una de estas rutas es poco conocido (Wasterlain, 1989).

El Glu se libera de una manera dependiente de Ca^{++} , tiene un sistema de recaptura de afinidad alta en las terminales nerviosas (Wasterlain, 1989), y ejerce sus efectos a través de la activación de dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Dentro de los receptores ionotrópicos se encuentran los receptores sensibles a: N-metil-D-aspartato (R-NMDA), α -Amino-3-hidroxi-5-4-isoxasol-4-propionato (R-AMPA) y kainato (R-KA). Estos receptores actúan como canales iónicos activados por ligando y permiten la entrada de Na^+ y Ca^{++} , favoreciendo la despolarización rápida de la célula nerviosa (Foster y Fagg, 1984; Watkins y Olverman, 1987; Lipton y Rosenberg, 1994). Estructuralmente, los receptores ionotrópicos son complejos macromoleculares oligoméricos formados por 5 subunidades polipeptídicas,

cada una con cuatro dominios hidrofóbicos, conocidos como M1-4, de los cuales M1, M3 y M4 atraviesan la membrana, mientras que M2 entra a la membrana pero no regresa al lado citoplasmático. Cada subunidad presenta el grupo amino terminal en la parte extracelular y su respectivo grupo carboxilo terminal en la parte intracelular (Nakanishi, 1992; Barinaga, 1995). El R-NMDA, esta formado por las subunidades NR1 y NR2A-D (Kutsuwada et al., 1992, Meguro et al., 1992; Monyer y Seeburg, 1992) y se caracteriza por su dependencia de voltaje, su alta permeabilidad al Ca^{++} y sus sitios múltiples de regulación farmacológica, además de presentar un sitio sensible a cambios de óxido-reducción (Lipton y Rosenberg, 1994; Mayer y Westbrook, 1987; Cotman y Monaghan, 1988). Los R-AMPA y R-KA son independientes de voltaje y tienen una mayor permeabilidad al Na^+ . El R-AMPA, puede estar formado por las subunidades GLUR1-4 (Monaghan et al., 1989; Bettler y Mülle, 1995) y el R-KA por las subunidades GLUR5-7 (Monaghan et al., 1989; Henley, 1994). Por otro lado, la activación de los receptores metabotrópicos implica una cascada de segundos mensajeros, a través de su interacción con proteínas G. Dichos receptores se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana con siete dominios transmembranales y dos porciones largas de aminoácidos hidrofílicos, una en el medio extracelular con el extremo amino y otro en el interior celular con el extremo carboxilo (Schoepp y Conn, 1993), además existen al menos 8 proteínas que son mGLUR1-8 (Schoepp y Conn, 1993).

Una vez liberado de la neurona presináptica, el Glu puede interactuar con sus receptores, o ser transportado por un mecanismo de afinidad alta dependiente de Na^+ hacia las células gliales (Logan y Snyder, 1972), dentro de las cuales se degrada metabólicamente a Gln por la acción de la sintetasa de glutamina (Fig. 1) (Takagaki y Konagaya, 1985).

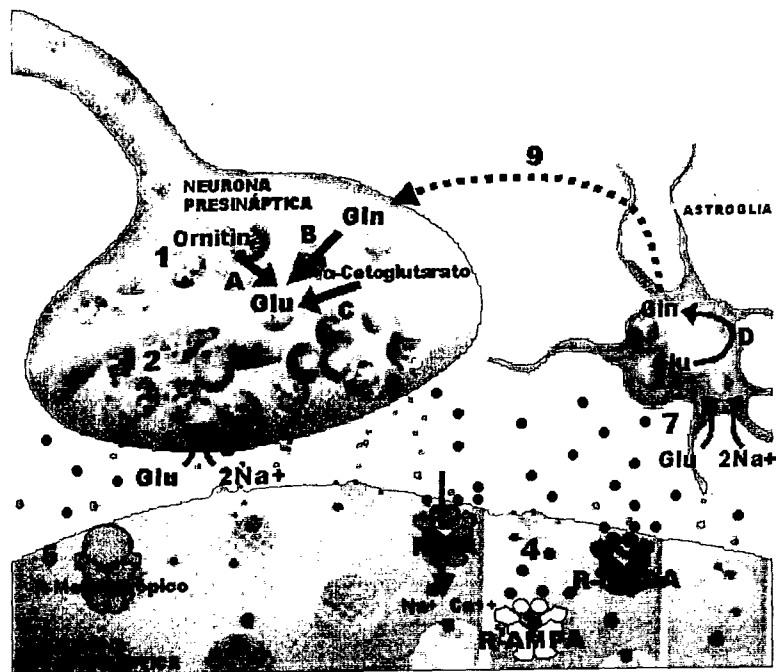


FIGURA 1. Sinapsis Glutamatérgica. 1) Síntesis del Glu (A. Ornitin aminotransferasa; B. Glutaminasa; y C. Deshidrogenasa del Glu); 2) Transporte del Glu hacia las vesículas sinápticas; 3) Liberación exocítica del Glu; 4) Interacción del Glu con receptores ionotrópicos; 5) Interacción del Glu con receptores metabotrópicos; 6) Captura neuronal del Glu; 7) Captura astrogliar del Glu; 8) Degradación metabólica del Glu dentro de la astrogliar (D. Glutamina sintetasa); y 9) Transporte de la Gln desde la astrogliar hacia la terminal glutamatérgica (Wasterlain, 1989).

La liberación excesiva del Glu y su interacción con sus receptores juega un papel crítico en el inicio y mantenimiento de las crisis epilépticas (Walker et al., 1995; Giraldez y Girardi, 2000; Millan et al., 1991; Musshoff et al., 2000). A este respecto, Morales y Tapia (1995) demostraron a través de la técnica de microdiálisis, que la 4-aminopiridina (4-AP) estimula preferencialmente la liberación de Glu en el estriado y que esta liberación se correlaciona con una actividad convulsiva intensa. Además, las alteraciones motoras producidas por la 4-AP fueron bloqueadas por antagonistas del receptor a Glu tipo NMDA (Morales-Villagrán et al., 1996). Asimismo, trabajos recientes, en los que se ha utilizado la técnica de microdiálisis dual y registro electroencefalográfico simultáneo en el circuito corteza entorrinal-hipocampo, demostraron que la infusión de 4-AP a través de la cánula de microdiálisis en la corteza entorrinal produce actividad epileptiforme y conductual en las ratas despiertas, así como un aumento en la concentración extracelular de Glu en las zonas de infusión de la 4-AP (Medina-Ceja et al., 2000). Sin embargo, a pesar de que la actividad epileptiforme se propagó a la zona de proyección, no se observaron cambios significativos en la concentración extracelular de Glu, debido probablemente a que el sistema de detección utilizado (detección con fluorescencia) en la cromatografía no es lo suficientemente sensible.

GABA

El **GABA** es el principal neurotransmisor inhibitor del SNC (Wasterlain, 1989), se sintetiza a partir del ácido glutámico por acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15), la cual remueve el grupo α -carboxilo del Glu para producir GABA y CO_2 . La GAD requiere de fosfato de piridoxal como cofactor y su reacción es

irreversible bajo condiciones fisiológicas. El GABA puede ser sintetizado por otras vías, a partir de la ornitina y la putresina (Caron et al., 1987; Wasterlain, 1989; Daune y Séiler, 1988). La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo por la actividad de la transaminasa del GABA (4-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa; GABA-T; EC 2.6.1.19), enzima que también requiere de fosfato de piridoxal como cofactor y que cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al ácido α -cetoglutarato, dando como productos el semialdehído succínico y el Glu. El semialdehído succínico posteriormente es oxidado a ácido succínico por la deshidrogenasa del semialdehído succínico, esta vía metabólica constituye un corto circuito en el ciclo de Krebs (Wasterlain, 1989; Daune y Séiler, 1988).

El GABA presenta dos tipos de receptores: GABA_A y GABA_B (Vizi y Kiss, 1998). El GABA_A es una proteína hetero-oligomérica compuesta por una combinación de 4 a 5 subunidades (α , β , γ , δ y ρ) (Vizi y Kiss, 1998; Taguchi y Kuriyama, 1984), es un receptor-canal permeable a Cl⁻. El resultado de la entrada de Cl⁻ conduce a la hiperpolarización de la membrana neuronal, produciendo una inhibición en la neurona postsináptica. En base a lo anterior se ha postulado que el GABA juega un papel particularmente importante en la inhibición de las crisis y tiene un efecto anticonvulsivo (Olsen y Venter, 1986). Este receptor es sensible al GABA, siendo el principal mediador de la acción inhibitoria postsináptica, así como a sus análogos estructurales como el muscimol, la isoguvacina y el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol-piridinol (TPI) (Vizi y Kiss, 1998; Ticku, 1991). Su efecto se bloquea por antagonistas de este receptor como la bicuculina y la picrotoxina, que reducen la corriente de cloro generada por la activación del receptor. Asimismo, esta corriente se ve aumentada por compuestos que modulan al

receptor, como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los esteroides (Olsen, 1981; 1987). El canal iónico asociado al receptor GABA_A es selectivo para aniones (en particular el Cl⁻) y la selectividad es suministrada por la colocación estratégica de aminoácidos cargados positivamente cerca del final del canal iónico (Bormann y Fiegenspan, 1995). El receptor GABA_B es una proteína de aproximadamente 80 Kd que esta acoplada a canales iónicos de Ca⁺⁺, por medio de las proteínas que unen GTP, como G_i o G_o. Presinápticamente, la activación de este receptor inhibe la liberación de GABA por un mecanismo que activa las conductancias de K⁺ y disminuye las conductancias de Ca⁺⁺. Postsinápticamente, la activación del receptor GABA_B produce hiperpolarización lenta potencial postsináptico inhibitorio (IPSP) lento, debido a la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje y a un aumento en la conductancia de potasio, lo cual resulta en la generación de IPSPs lentos, este efecto *inhibe la liberación de neurotransmisores* (Holz et al., 1986).

La mayor parte del GABA se libera a través de exocitosis de las vesículas sinápticas, mediante un proceso que implica la entrada de Ca⁺⁺ a la terminal nerviosa. Otra parte del GABA se libera por medio de la activación inversa de los transportadores de GABA por la presencia de Na⁺ extracelular (Bormann, 1988). Cuando el GABA es liberado interacciona con sus respectivos receptores postsinápticos o es removido de la hendidura sináptica por su captura en las células gliales, para posteriormente ser degradado por la GABA-T a Glu y ser transformado a Gln por la acción de la glutamina sintetasa, de esta manera la Gln se transporta a la neurona presináptica, donde por acción de la GAD es convertido a GABA, cerrando así el ciclo (Fig. 2).

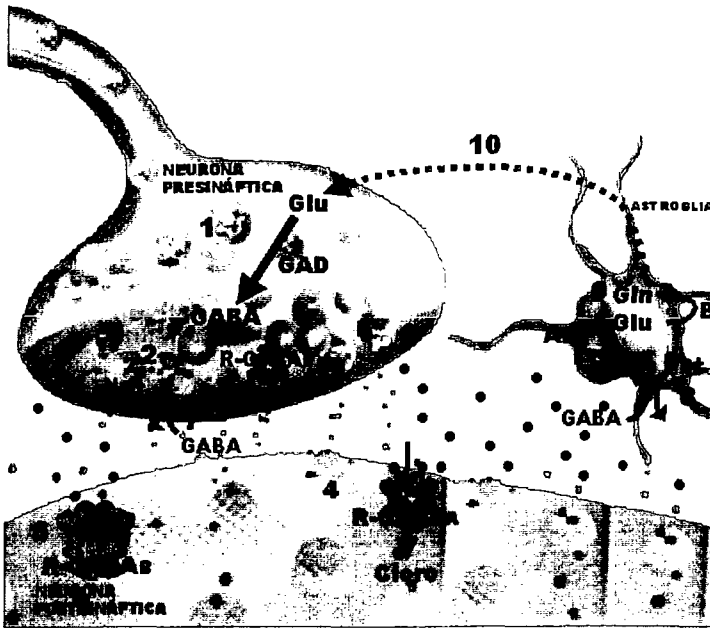


FIGURA 2. Sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis del GABA; 2) Transporte del GABA hacia las vesículas sinápticas; 3) Liberación exocítica del GABA; 4) Interacción del GABA con el receptor GABA_A; 5) y 6) Interacción del GABA con el receptor GABA_B pre- y postsináptico, respectivamente; 7) Captura neuronal del GABA; 8) Captura astrogliar del GABA; 9) Degradación metabólica del GABA dentro de la astrocita (A. GABA-T, B. Glutamina sintetasa); y 10) Transporte de la Gln desde la astrocita hacia la neurona presináptica (Wasterlain, 1989).

En varios modelos de epilepsia experimental, existe evidencia de alteraciones en la transmisión mediada por el GABA. Entre los parámetros neuroquímicos asociados a la epilepsia, se encuentra una disminución en la actividad de la GAD en interneuronas (Ito, 1994). Sin embargo, existen evidencias que muestran resultados contradictorios como en el caso de pollos y el gerbil con susceptibilidad a crisis, donde se ha encontrado un aumento en la concentración de GABA y en las neuronas que expresan a la GAD, lo que pudiera considerarse como un proceso adaptativo a las crisis espontáneas o al déficit de los mecanismos post-sinápticos (Faingold, 1988; Jonson y Tucek, 1987). Por otro lado, se ha observado que los antagonistas al receptor GABA_A, como la bicuculina y picrotoxina, así como los que influyen en el sitio de unión a las benzodiazepinas, como el pentilentetrazol y el metil-6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato y pentilinetetrazol incrementan la excitabilidad en algunas poblaciones de neuronas e inducen crisis epilépticas (Wasterlain, 1989).

ANTECEDENTES

4.1 MODELO DE CRISIS POR 4-AMINOPIRIDINA

4.1.1 MODELO DE CRISIS CONVULSIVAS

La 4-AP es una droga que cuando se administra por vía intraperitoneal (i.p.) o intracerebral (i.c.) es capaz de inducir crisis convulsivas en diferentes especies animales (Spyker et al. 1980; Glover, 1982; Morales et al., 1995; Fragoso-Veloz et al., 1990). El patrón de crisis inducidas por la 4-AP se caracteriza por la aparición de un periodo convulsivo largo, con una etapa inicial de hiperexcitabilidad, seguido de convulsiones clónicas, tónico clónicas y muerte durante una convulsión tónica en algunos casos, mientras que los animales que sobreviven presentan movimientos clónicos alternados frecuentemente con contracciones tónicas de mediana intensidad (Fragoso-Veloz et al., 1990).

Los estudios *in vitro* han demostrado que el efecto convulsivo de la 4-AP tiene que ver con la liberación de espectro amplio de neurotransmisores, independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (Thesleff, 1980), es decir, la 4-AP estimula la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores (Morales et al., 1995; Peña y Tapia, 1999, 2000; Medina-Ceja et al., 2000; Tapia et al., 1999). Estudios electrofisiológicos han demostrado que la 4-AP bloquea las corrientes: transitoria (I_A) y de inactivación lenta (I_D) de potasio, lo cual favorece una prolongación del potencial de acción a través de un retardo en la fase de repolarización membranal, fenómeno que mantiene los canales de Ca^{++} sensibles al voltaje abiertos (Rogawski y Barker, 1983) y promueve la liberación de neurotransmisores.

Trabajos previos han demostrado que la administración de la 4-AP en el ventrículo lateral y la corteza motora de la rata inducen actividad epileptiforme intensa y que las alteraciones motoras producidas por la 4-AP son bloqueadas por antagonistas del receptor a Glu tipo NMDA, lo cual muestra que la 4-AP estimula la liberación de Glu *in vivo* y que los R-NMDA están implicados en las crisis inducidas por la 4-AP (Morales et al., 1996). Además, Morales y Tapia (1995) observaron que la 4-AP eleva preferencialmente la concentración extracelular de Glu con respecto a los demás aminoácidos en el estriado de ratas en libre movimiento.

Recientemente, se demostró una correlación entre el aumento extracelular de Glu, las crisis epileptiformes y la neurodegeneración producida en CA1 y CA3 del hipocampo (HP) de ratas perfundidas con 4-AP. Los autores sugieren que la neurodegeneración es probablemente producida por una sobreactivación de receptores a Glu, al incrementarse la concentración extracelular del mismo (Peña y Tapia, 1999). En este sentido, Peña y Tapia (2000) han demostrado que la administración de antagonistas glutamatérgicos tipo R-NMDA (MK801 y CPP) y no-NMDA (NBQX), reducen la intensidad y duración de las crisis y protegen contra la neurodegeneración de CA1 y CA3 del HP. En este mismo trabajo, la tetrodotoxina (TTX, bloqueador de canales de Na⁺ sensibles a voltaje) protege contra los efectos de la 4-AP en el HP y la ω -conotoxina (bloqueador de canales de Ca⁺⁺ tipo N) disminuyen la liberación de Glu y protegen contra la neurodegeneración. Estos datos sugieren que el efecto del aumento en la concentración extracelular de Glu es en la terminal sináptica y la participación de los canales de Ca⁺⁺ tipo N en este modelo. Asimismo, Medina-Ceja et al. (2000) han demostrado un aumento en la concentración extracelular de Glu en la corteza entorrinal

(CE) e HP de ratas en libre movimiento, después de la administración de 4-AP en estas regiones, estableciéndose una correlación con el inicio de las descargas epileptiformes. Sin embargo, a pesar de que las descargas se propagaron a las regiones de proyección (HP y CE), no se observaron aumentos en la concentración extracelular de Glu en estas regiones.

4.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA 4-AP

La 4-AP bloquea los canales de K^+ activados por voltaje en una gran variedad de células, incluyendo las neuronas, el músculo cardíaco, el músculo esquelético y el músculo liso (Gillespie y Hunter, 1975; Kenyon y Gibbons, 1979; Morales et al., 1999; Hara et al., 1980). La actividad del canal de K^+ participa en el control de la liberación del neurotransmisor de las terminales nerviosas determinando el curso temporal de la repolarización. El bloqueo de los canales de K^+ puede prolongar la duración de los potenciales de acción, lo que favorece el retardo en el cierre de los canales de Ca^{++} , incrementando la entrada de este catión y la liberación del neurotransmisor (Choquet y Korn, 1992; Kirsch y Narahashi, 1983).

La 4-AP atraviesa la membrana en su forma no cargada y se asocia con un protón en el citoplasma (Choquet y Korn, 1992; Kirsch y Narahashi, 1983), dentro del citoplasma la 4-AP se une a los canales de K^+ (Kirsch y Drewe, 1993). A este respecto, Kirsch y col., (1993) han demostrado que la 4-AP se une preferentemente a los canales rectificadores de K^+ en estado abierto. Una vez que la 4-AP atraviesa la membrana y se carga, mueve aproximadamente el 20% del potencial de membrana eléctrico para alcanzar su sitio de unión y la profundidad a la cual la 4-AP se une al canal de K^+ aumenta cuando la concentración de la 4-AP se incrementa (Bouchard y Fedida, 1995).

Los canales de K^+ censan el gradiente de voltaje local a través de la membrana y la forma activa de la 4-AP (catiónica), por lo que es probable que la 4-AP se una a las cargas negativas fijas localizadas en la superficie interna de la membrana o en el vestíbulo del poro, ya que el sitio de unión de la 4-AP parece estar cercano a las cargas negativas asociadas con las regiones 5'S5 o 3'S6 en la cara interna del poro del canal de K^+ (Fig. 3) (Shieh y Kirsch, 1994).

4.1.3 EFECTO DE LA 4-AP SOBRE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Las aminopiridinas tienen un efecto estimulador sobre la liberación espontánea del neurotransmisor, lo que depende de la presencia de Ca^{++} extracelular (Tapia y Sitges, 1982) y de otros depósitos de calcio, así como de otros iones (Huang et al., 1989; Tapia y Sitges, 1982). Las aminopiridinas causan corrientes entrantes de Ca^{++} , sin embargo, las concentraciones requeridas para estos efectos ($>1\text{mM}$) son mucho más altas que las requeridas para inducir actividad convulsiva (Segal y Baker, 1986; Ahnert-Hilger y Habermann, 1981). Otros estudios postulan que la 4-AP facilita el acoplamiento entre el Ca^{++} intracelular y la liberación del neurotransmisor en la membrana presináptica, debido a que la droga es capaz de inducir la liberación del neurotransmisor sin el estímulo despolarizante (Agoston et al., 1983; Freedman et al., 1984; Tapia et al., 1985). En este sentido, Tibbs y col., (1989) propusieron que la 4-AP induce potenciales de acción repetitivos que permiten abrir transitoriamente los canales de Ca^{++} .

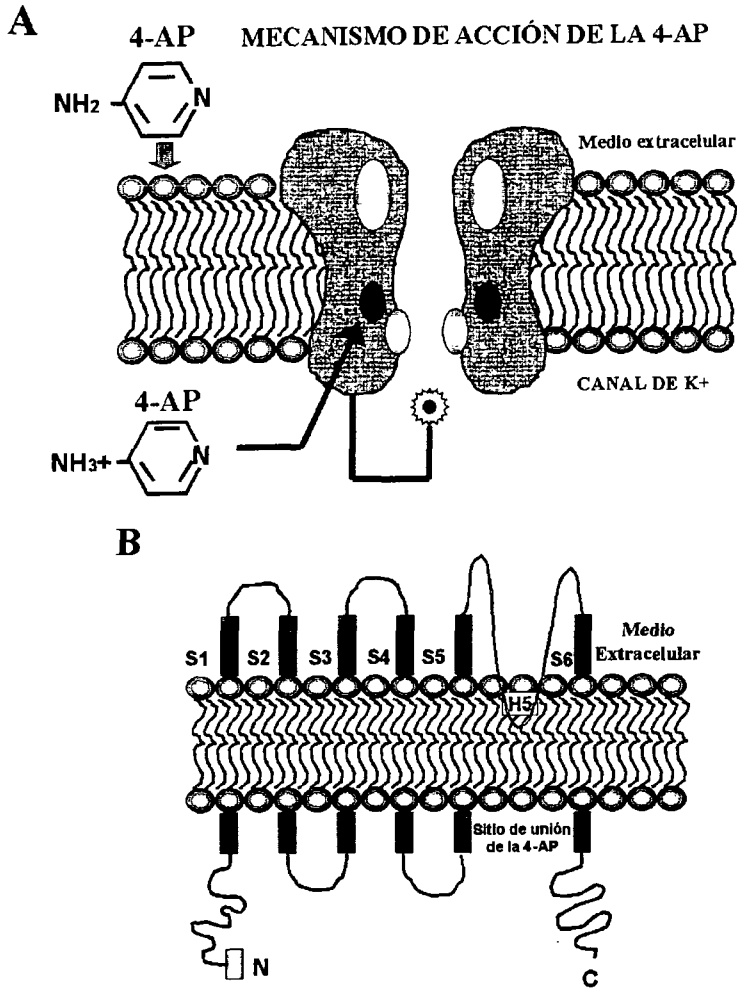


FIGURA 3. Los esquemas A y B representan el mecanismo posible del bloqueo de los canales de K^+ por la 4-AP. A) La 4-AP atraviesa la membrana plasmática en su forma no cargada y una vez en el citoplasma de la célula se asocia con un protón. La forma activa de la 4-AP se une a la región cargada negativamente del canal. B) estructura molecular de una de las subunidades del canal de K^+ donde se muestra el sitio de unión de la 4-AP activada (5'S5 o 3'S6) (Shieh y Kirsch, 1994).

Asimismo, algunos trabajos han observado la posibilidad de la participación de los canales tipo N- en la entrada de Ca^{++} inducida por la 4-AP en sinaptosomas (Nayler, 1988; Nowycky et al., 1985; Turner et al., 1993) y ratas (*in vivo*) (Peña y Tapia, 2000).

Las diferencias en la sensibilidad de los neurotransmisores a la influencia de la 4-AP pudiera ser un reflejo de las diferencias en las poblaciones de canales de Ca^{++} presentes en las terminales o en la cinética de la entrada de Ca^{++} entre las terminales catecolaminérgicas y aminoacidérgicas (Verhage et al., 1991). Al respecto, se ha encontrado que el efecto sobre la liberación del Glu, con tres agentes despolarizantes (K^+ alto, 4-AP y veratrina) presenta variaciones regionales en la liberación del Glu, debido a sus mecanismos diferentes para inducir el efecto despolarizante y al proceso de transporte del Glu (Patterson et al., 1995). Así la liberación del Glu y su captura parecen variar grandemente de región en región debido a la presencia de estos mecanismos.

Los eventos biofísicos relevantes de la 4-AP incluyen los siguientes pasos, en el caso de las preparaciones *in vitro*: a) Bloqueo de las corrientes transitorias de K^+ en la membrana postsináptica soma-dendrita, incluyendo la corriente tipo A rápida y la corriente lenta tipo D; b) Un incremento en la excitabilidad de los axones y las terminales presinápticas causadas por la 4-AP, aumenta la liberación de neurotransmisores en respuesta a los potenciales de acción presinápticos, como en los potenciales de acción espontáneos originados en las terminales o en los axones (Fig. 4) (Kocsis et al., 1983; Bucle y Haas, 1982; Flores-Hernández et al., 1994).

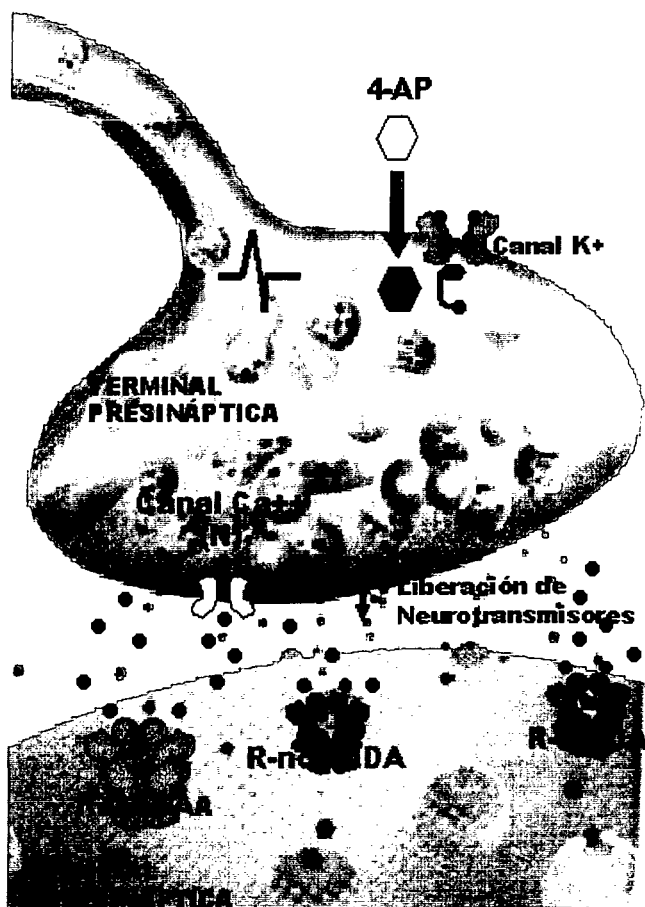


FIGURA 4. Efecto de la 4-AP sobre la liberación de algunos neurotransmisores en la terminal presináptica. El bloqueo de los canales de K⁺ por la 4-AP puede prolongar la duración del potencial de acción, lo que favorece el retardo en el cierre de los canales de calcio incrementando la entrada de este ión y facilitando el acoplamiento para la liberación de neurotransmisores (Turner et al., 1993).

4.2 CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL – HIPOCAMPO

La participación del circuito corteza entorrinal-hipocampo en las crisis convulsivas ha sido estudiada mediante diversas técnicas y por diferentes autores, ya que se le considera uno de los principales circuitos en la iniciación y propagación del fenómeno paroxístico (Amaral y Witter, 1995; Vizi y Kiss, 1998).

4.2.1 LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

La **Formación Hipocámpica** forma parte del asta inferior del ventrículo lateral (Martín, 1998), es una estructura elongada, cuyo eje longitudinal se extiende en forma de "C" y corre rostralmente del núcleo septal hasta caudoventralmente en el lóbulo temporal. La formación hipocámpica comprende seis regiones citoarquitectónicas distintas: Giro Dentado (GD), Hipocampo (HP), Corteza Entorrinal (CE), Subículo, Presubículo y Parasubículo. La formación hipocámpica presenta cuatro haces de fibras que contienen tanto aferencias como eferencias, las cuales son: Alveus, Fimbria, Fómix y Haz Angular. El **alveus** se origina en las células piramidales del HP y subículo, estas fibras se dirigen hacia sitios subcorticales o a la misma formación hipocámpica contralateral; la **fimbria** se localiza en el extremo lateral del HP, cuando sus fibras salen del HP y descienden al prosencéfalo, son referidas como las columnas del **fórnix**, estas fibras se dirigen hacia el núcleo septal y a otras estructuras del prosencéfalo basal y diencéfalo; el **haz angular** atraviesa la línea media del esplenio del cuerpo calloso y contiene fibras que se originan desde o proyectan a el presubículo, parasubículo y la CE (Fig. 5) (Amaral y Witter, 1995).

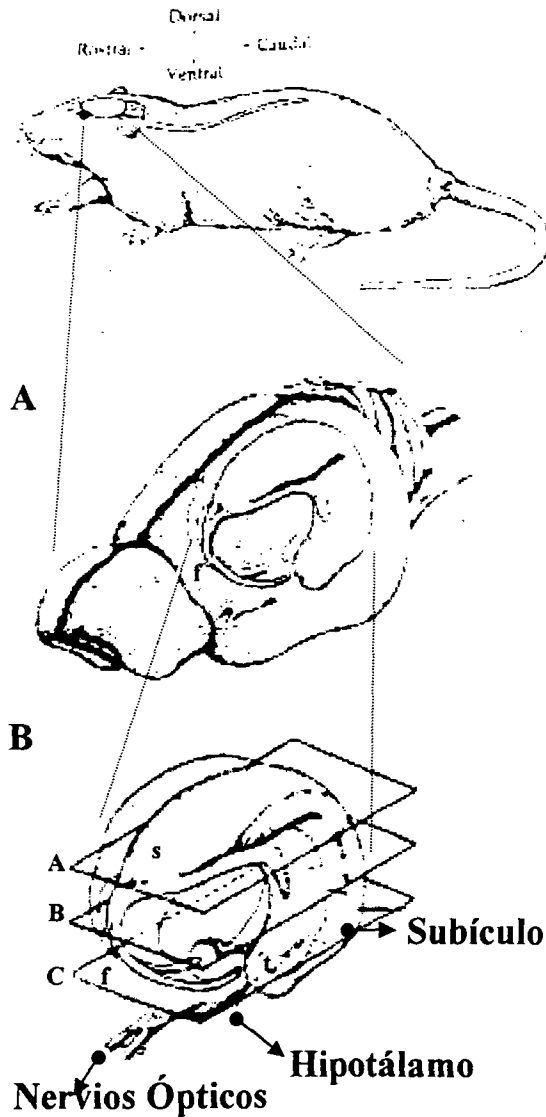


FIGURA 5. Organización anatómica y tridimensional de la formación hipocámpica en el cerebro de la rata. A) Muestra la forma en C del hipocampo y su posición en el cerebro de la rata. Las columnas del fórnix (f) descienden al polo septal (s) del hipocampo. B) Muestra tres secciones horizontales (A, B, C) a diferentes niveles dorsoventrales de la formación hipocámpica, la corteza entorrinal se localiza en los niveles medios y ventrales de la formación hipocámpica. Polo temporal (t) (Martín, 1998; Amaral y Witter, 1995).

El **Giro Dentado** presenta tres capas celulares: la capa molecular, la capa granular y la capa polimórfica. La capa molecular esta ocupada principalmente por las dendritas de las células granulares, células en canasta y varias células polimórficas, así como un tipo celular en la porción profunda de esta capa cuyo axón contribuye al plexo en canasta dentro de la capa de las células granulares, es otro tipo de célula en canasta (Amaral et al., 1990; Boss et al., 1985; West et al., 1988). Otro tipo celular presente es la célula axo-axónica o "chandelier" cuyo axón termina en los segmentos iniciales del axón de las células granulares, esta célula es GABAérgica y se le considera el segundo controlador inhibitor de las células granulares. Esta capa es convencionalmente dividida en tres: la parte interna que es el foco de entrada septal, de asociación y comisural; la parte media, la cual recibe entradas de la CE; y la parte externa, que recibe entradas de la CE lateral (Amaral, 1978). La capa granular tiene como tipo celular principal a la célula granular, que es glutamatérgica. En la porción profunda de esta capa se encuentran las células en canasta, la mayoría de las cuales son GABAérgicas. Otros tipos celulares son las multipolares o fusiformes, que contribuyen con sus axones al plexo en canasta en la capa de células granulares. En estudios recientes se ha observado que las células granulares son relativamente resistentes al daño asociado a las crisis (Sloviter, 1994), además los axones de la células granulares muestran un grado alto de plasticidad en el cerebro epiléptico (Cavazos et al., 1991). Las células granulares son reguladas en parte por esteroides adrenales (Gould et al., 1992), asimismo, se les ha llamado "no excitables" porque estas mantienen un potencial de reposo muy negativo (Mody et al., 1988). La capa polimórfica (a la que también se le ha llamado Hilus o CA4) tiene como tipo celular principal a la célula musgosa, que es de tipo glutamatérgica; sus dendritas proximales

presentan espinas complejas denominadas excrecencias que son los sitios de terminación de los axones de las fibras musgosas. Otros tipos celulares en esta capa, son las células fusiformes y multipolares que dan origen a un plexo estrellado y son GABAérgicas (Amaral et al., 1990; Boss et al., 1985; West et al., 1988).

El **Hipocampo** se divide en tres campos (**cornu ammonis, CA**) CA3, CA2 y CA1. La organización laminar es generalmente similar para todos los campos a excepción de CA3, el cual presenta una zona acelular justo por debajo de la capa de células piramidales y está ocupada por los axones de las fibras musgosas del GD, se le denomina **estrato lucidum**. El resto de los campos presenta la siguiente organización laminar: el **estrato oriens**, que es una capa relativamente libre de células ocupada por el árbol dendrítico de las células piramidales; la **capa de células piramidales**, cuyo principal tipo celular es la célula piramidal, además presenta las células en canasta que forman un plexo en canasta que inerva los cuerpos celulares de las células piramidales; el **estrato radiatum** donde se localizan las conexiones de asociación CA3-CA3 y las colaterales de Shaffer de CA3 a CA1; el **estrato lacunoso molecular** donde las fibras de la vía perforante que vienen de la CE terminan. Existe una vasta mayoría de células no piramidales inmunoreactivas a GABA las cuales se considera, forman circuitos locales en el estrato oriens, el estrato radiatum y el estrato lacunoso molecular del HP (Scharzkroin y McIntyre, 1998, Seress y Ribak, 1984; Amaral y Witter, 1995).

La región CA3 está compuesta por células piramidales largas e interneuronas asociadas, es la estructura de entrada de las fibras musgosas de las células granulares del GD (Wong y Traub, 1983). La región CA3 se divide convencionalmente en tres capas: CA3a, CA3b y CA3c (Amaral, 1993). Asimismo, se ha observado que CA3 es

más sensible a la actividad de ráfagas rítmicas y sincrónicas, asociadas a la actividad epileptiforme interictal. Esta propiedad de la población es producto de las propiedades intrínsecas de las células piramidales de CA3 y su grado alto de conectividad colateral excitadora (Engel et al., 1998). Las células piramidales en esta región tienen como propiedad las ráfagas, aparentemente debido a una densidad alta de canales de calcio en sus dendritas proximales (Fisher et al., 1990; Wong y Prince, 1978).

La región CA2 o zona de transición, es identificada como sector de resistencia al daño morfológico provocado por las crisis convulsivas en modelos de epilepsia del lóbulo temporal (Engel et al., 1998).

La región CA1 lo forman células piramidales heterogéneas y comprende la primera ruta de salida de la formación hipocámpica (Soltesz y Jones, 1995). Las células piramidales de CA1 también reciben entradas inhibitorias de las interneuronas (Lacaille et al., 1989), este efecto inhibitor es menor que en el GD y CA3, por lo que son más vulnerables al daño excitotóxico. Una variedad de canales iónicos dependientes de voltaje han sido caracterizados en la membrana de las células piramidales de CA1, incluyendo corrientes de calcio de umbral alto (Spruston y Johnston, 1992), así como un gran número de corrientes de potasio y de sodio.

La **Corteza Entorrinal** se localiza en la porción más caudal del manto cortical, se extiende ventromedialmente para bordear con el parasubiculo, la corteza piniforme y el complejo amigdaloides y dorsolateralmente con el surco rinal. La corteza entorrinal se divide en seis capas: I. Capa molecular o plexiforme, la cual contiene neuronas GABAérgicas, así como células estrelladas y horizontales que proyectan al GD e HP, y neuronas que terminan en las dendritas de las células de la capa II que proyectan al GD (Caballero-Bleda y Witter, 1993). II. Presenta células estrelladas que contribuyen

principalmente a las fibras de la vía perforante que proyectan al GD y a CA3 del HP, también hay células piramidales, multipolares y horizontales que contribuyen a las fibras de la vía perforante (Köhler, 1985, 1986; Lingenhohl y Finch, 1991). III. Es una capa heterogénea que presenta principalmente células piramidales que proyectan a los campos CA1 y al subículo, sus colaterales axónicas se dirigen a las capas III y I. Además se han encontrado células multipolares, estrelladas, fusiformes, horizontales y bipolares que parece contribuyen con la vía perforante. IV. Capa que también recibe el nombre de lámina *dissecans* se localiza entre la capa III y V. Cercana al surco rinal, particularmente a nivel caudal de la CE. V. Esta capa se ha dividido en dos: Va. La cual tiene neuronas piramidales cuyas dendritas apicales se dirigen a las capas superficiales (I y II), también presenta neuronas pequeñas que se han caracterizado como horizontales, estrelladas y multipolares; Vb. Es una capa que presenta una pérdida de células piramidales pequeñas y polimórficas. VI. Esta capa contiene una población heterogénea de células que se han dividido en tres categorías: células que influyen a las células de la capa Vb o VI, células cuyos axones se dirigen hacia las áreas profundas de la materia blanca, muchas de ellas contribuyen a la porción que va al GD y el HP (Köhler, 1985, 1986; Lingenhohl y Finch, 1991). En todas las capas se han encontrado interneuronas GABAérgicas (Germroth et al., 1989).

El **Complejo Subicular** está formado por el *subículo, presubículo y parasubículo* (Amaral y Witter, 1995). La principal capa celular es una población de neuronas piramidales. Se ha sugerido que las células de proyección subicular son similares a las células piramidales hipocámpales en CA1 y CA3. Las células piramidales del complejo subicular parecen estar agrupadas dentro de dos categorías; la que comprende células que normalmente producen descargas en ráfagas (similares a CA3) y la otra categoría

que consiste en células de disparo regular (propias de las células CA1). Ambos tipos reciben entradas de CA1 y proyectan a la CE. Las neuronas del complejo subicular están dotadas con la habilidad de soportar la hiperexcitabilidad generada por las descargas asociadas a ráfagas dentro del HP anormal (Fig. 6) (Schwartzkroin y McIntyre, 1998).

4.2.2 CIRCUITO CORTEZA- ENTORRINAL-HIPOCAMPO

El proceso de información a través del circuito corteza entorrinal-hipocampo está dado principalmente a través del denominado circuito trisináptico. Este inicia en las células piramidales de la CE las cuales envían sus axones a las células granulares del GD, conformando la vía perforante. Las células granulares envían sus axones a las células piramidales de la región CA3 del HP para constituir las fibras musgosas. Las células piramidales de CA3 envían colaterales axónicas a las células piramidales de CA1 para constituir las colaterales de Schaffer y finalmente las células piramidales de CA1 envían sus proyecciones a través del complejo subicular a la CE, cerrando así el circuito (Fig. 7) (Martín, 1998; Schwartzkroin y McIntyre, 1998; Amaral y Witter, 1995).

AFERENCIAS:

La formación hipocámpica recibe aferencias subcorticales que se originan en el núcleo septal medio y la banda diagonal de Broca (Wyss, et al., 1979). Esta vía es acetilcolinérgica (Lewis y Shute, 1967) y GABAérgica (Freud y Antal, 1988). La región CA3 recibe aferencias del locus cerúleos y núcleo de rafe que son monoaminérgicos, así como CA2 recibe una inervación de las partes posteriores del hipotálamo, en particular del área supramamilar (Haglund et al., 1984) y del núcleo tuberomamilar (Köhler, 1985).

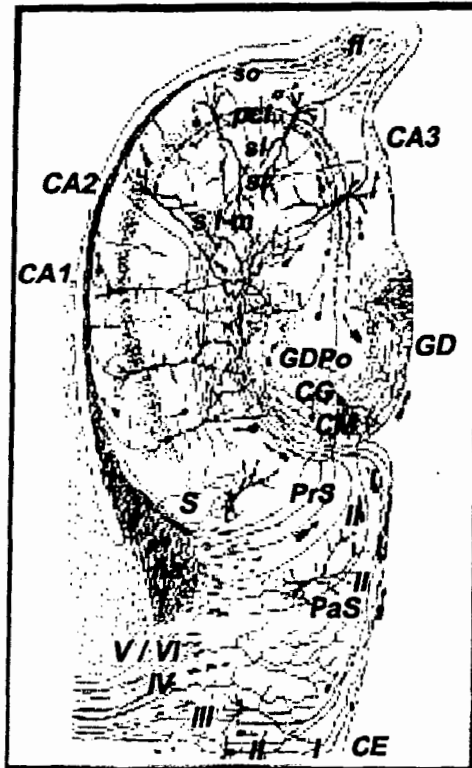


FIGURA 6. Esquema que muestra la posición de varias regiones, capas y vías de la formación hipocámpica de la rata. Haz angular (ha); parasubiculo (PaS); presubiculo (PrS); subículo (S); GDpo, CG, CM, capa polimórfica, capa granular y capa molecular del giro dentado (GD), respectivamente; estrato oriens (os); estrato piramidal (sp); estrato lucidum (sl); estrato radiatum (sr); estrato lacunoso-molecular (sl-m) de CA1, CA2 y CA3 del hipocampo; fimbria (fi); corteza entorrinal (CE) (Scharzkroin y McIntyre, 1998, Seress y Ribak, 1984; Amaral y Witter, 1995).

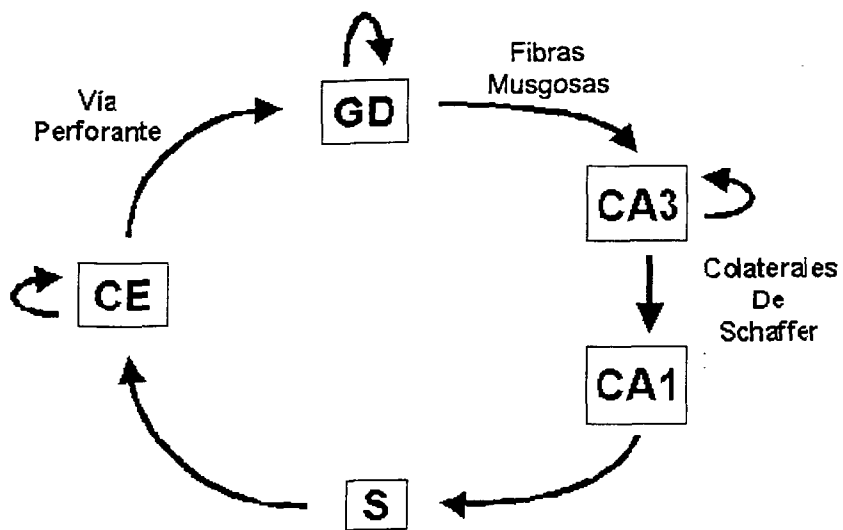


FIGURA 7. Esquema que representa el proceso de la información a través del circuito trisináptico. Este inicia en las células piramidales de la CE y se dirigen hacia el GD, CA3 y CA1, para finalmente regresar a la CE a través del complejo subicular (Martín, 1998; Schwartzkroin y McIntyre, 1998; Amaral y Witter, 1995).

CA1 recibe una proyección del septum y del complejo amigdalóide (Nyakas et al., 1987; Krettek y Price, 1977), así como del núcleo reuniens del tálamo (Van Groen y Wyss, 1990).

La CE recibe aferencias corticales principalmente de estructuras olfatorias del telencéfalo (bulbo olfatorio, núcleo anterior olfatorio y corteza piriforme), la corteza piririnal, la región límbica y paralímbica (Haberly, 1985; Lopes da Silva et al., 1990). Las aferencias subcorticales provienen del septum que envía fibras colinérgicas (Alonso y Llinas, 1989; Alonso y Köhler, 1984;) y del tallo cerebral, originadas en el núcleo de rafe (aferencias serotoninérgicas) y el locus cerúleos (noradrenérgicas) (Köhler y Steinbush, 1982; Moore et al., 1978). Finalmente la CE recibe proyecciones del tálamo (Bayer, 1985).

EFERENCIAS:

Las eferencias corticales se originan de las capas II, III y Va de la CE y se dirigen a las áreas olfatorias, la corteza infralímbica y la corteza peririnal (DeOlmos et al., 1978; Lopes da Silva et al., 1990). Estudios *in vivo* han demostrado que la CE proyecta a partes limitadas de la corteza temporal (Kosel et al., 1982). Las eferencias subcorticales se dirigen a la región septal, amígdala y a la porción ventral del estriado (Swanson y Cowan, 1977; Ottersen, 1982; Turner et al., 1980; Phillipson y Griffiths, 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo de crisis inducido por la administración de 4-AP es similar a la epilepsia generalizada que se presenta en el humano, este convulsivante no es específico para algún sistema de neurotransmisión en particular, ya que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio. En la epilepsia no se puede hablar de algún sistema de neurotransmisión específico, sino de un conjunto de éstos que inicie, mantenga y propague el fenómeno paroxístico. Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes descritos previamente, el Glu participa de manera importante en las crisis convulsivas inducidas por la 4-AP.

La técnica de microdiálisis dual y registro EEG simultáneo, que hasta la fecha se ha utilizado en el laboratorio de Neurobiología con el modelo de crisis por 4-AP, nos plantea la posibilidad de indagar con mayor detalle la participación del Glu y algunos otros aminoácidos sobre los mecanismos posibles de iniciación y propagación de las crisis en circuitos anatómicos que sean relevantes para el surgimiento del fenómeno paroxístico como es el caso del circuito corteza entorrinal-hipocampo, ya que se tiene la posibilidad de establecer correlación conductual, EEG y bioquímica *in vivo*, durante el desarrollo de las crisis convulsivas. Sin embargo, en estos primeros trabajos, no se pudo demostrar la participación del glutamato en la propagación de las crisis epileptiformes, probablemente por los sistemas de detección utilizados. Mediante la modificación de las técnicas electroquímicas en el laboratorio, se ha logrado cuantificar los aminoácidos con una mayor sensibilidad, con lo cual podemos determinar la concentración de éstos en dializados de cerebro de rata en periodos más cortos, lo cual nos permite determinar mejor la participación del glutamato en la propagación de las crisis epileptiformes

HIPÓTESIS

El ácido glutámico participa en la propagación de las crisis epileptiformes inducidas por la inyección intracerebral de la 4-AP en el circuito corteza entorrinal-hipocampo de ratas anestesiadas y en libre movimiento.

OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes descritos y con el propósito de evaluar la participación del Glu en la propagación de las crisis epileptiformes inducidas por la administración de 4-AP en el circuito anatómico corteza entorrinal-hipocampo, se plantearon los siguientes objetivos:

GENERAL:

Determinar la participación del Glu en la propagación de las crisis epileptiformes inducidas por la administración intracerebral de la 4-AP en el circuito corteza entorrinal-hipocampo de ratas anestesiadas y en libre movimiento.

ESPECIFICO:

Cuantificar los niveles de Glu y otros aminoácidos en la región del HP mediante el uso de las técnicas de microdiálisis y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), así como la actividad electroencefalográfica (EEG) de manera simultánea a la evaluación bioquímica en ratas anestesiadas y en libre movimiento.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron nueve ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g de peso) mantenidas en condiciones de bioterio, a las cuales se les anestesió con halotano y se sujetaron a un aparato estereotáxico con la barra de los incisivos posicionada a -3.3 mm con respecto a la línea interaural. Posteriormente se realizaron cuatro orificios en el cráneo, en los cuales se colocaron 2 tornillos y dos cánulas guía de acero inoxidable (0.5 mm de diámetro interno), los orificios de las cánulas guía se realizaron de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas para el HP y la CE, se sujetaron con material acrílico dental y posteriormente la sonda de microdiálisis (2 mm de longitud, de la marca BAS) previamente lavada con agua destilada por 10 min a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ se colocó en la cánula guía y se sujetó a ésta por medio de un cordón elástico al soporte de acrílico dental utilizado también para fijar el conector eléctrico al cráneo. Las coordenadas estereotáxicas para la punta de la sonda de microdiálisis en el HP fueron, **A-P** -4.0 mm, **L** -2.5 mm a bregma y **V** 4.0 mm de dura, para la punta de la jeringa de inyección en la CE fue, **A-P** -8.0 mm, **L** -4.6 mm a bregma y **V** 5.4 mm de dura (Paxinos y Watson, 1986). La localización de la sonda de microdiálisis y de la jeringa de inyección se verificó después de terminado el experimento por examen visual de la trayectoria de ambas para cada región. Se descartaron aquellos animales que presentaron una localización errónea.

Los animales se dividieron en dos grupos: libre movimiento y anestesiados. Para ambos grupos el registro EEG se llevó a cabo con un alambre de cobre (125 μm de diámetro) pegado longitudinalmente a la sonda de microdiálisis, así como a la aguja de inyección. La punta libre del alambre se localiza cerca de la terminal distal de la

membrana de diálisis para funcionar como electrodo de registro monopolar. Las terminaciones de los dos alambres se soldaron a un conector que se fijó al cráneo de la rata con material acrílico dental.

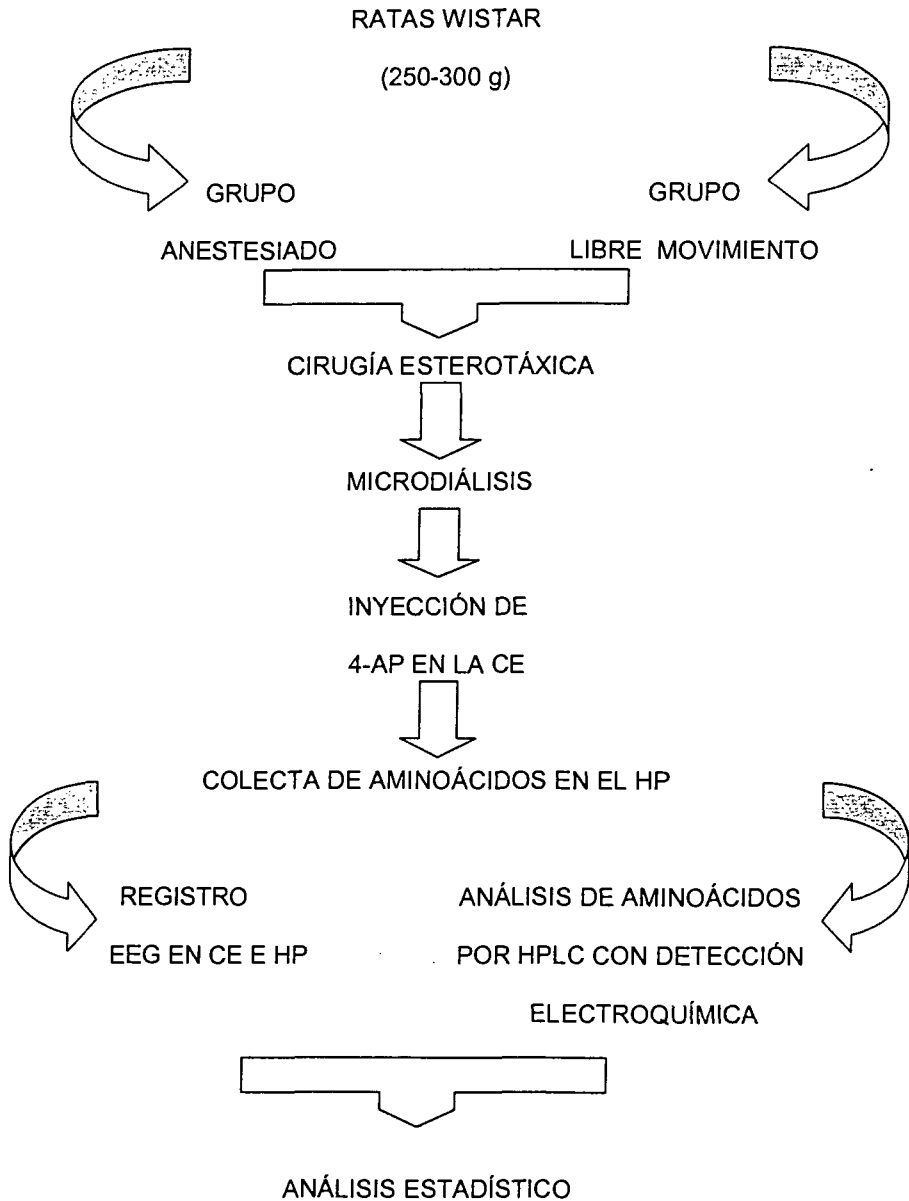
Protocolo experimental para el grupo en libre movimiento (n=4): Una vez retirada la anestesia y con las ratas despiertas, se perfundió la sonda implantada en el HP con un medio Krebs-Ringer con la composición siguiente (en mM): NaCl 118, KH_2PO_4 1.25, KCl 4.0, MgSO_4 1.17, NaHCO_3 25, CaCl_2 2.2, glucosa 10, pH 7.4. El flujo de la perfusión fue de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, para lo cual se utilizó una microjeringa montada en una bomba de microinyección de BAS. Después de un período de equilibrio de 180 min, se colectaron continuamente fracciones del perfusado cada minuto. Después de seis fracciones consecutivas, que se utilizaron para determinar los niveles basales de los aminoácidos en el HP, se inyectó la 4-AP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) en la CE (250 nmol/2 μL diluida en medio Krebs-Ringer), por un tiempo de un minuto, la concentración de NaCl se redujo para mantener la iso-osmolaridad. Se continuó la colecta de fracciones hasta el final del experimento en el HP (40 min).

Protocolo experimental para el grupo anestesiado (n=5): Estos animales permanecieron con anestesia durante todo el experimento, sólo al inicio de la administración de la 4-AP en la CE, se les bajó el nivel de anestesia para mantenerlos así hasta el final del experimento, esto debido a que el halotano bloquea ambos receptores a Glu, NMDA y no-NMDA y se ha encontrado que cuando a las ratas se les anestesia totalmente, se puede reducir el periodo paroxístico, delimitando así la posibilidad de encontrar actividad epileptiforme en el registro EEG, el umbral y el periodo convulsivo. El

resto del protocolo se llevó a cabo de igual manera que para el grupo anterior.

El contenido de los aminoácidos de las fracciones fue determinado por HPLC (medio acetonitrilo al 18%, columnas de microboro 100 x 1mm, 3 μ C18, de la marca BAS) con detección electroquímica después de la derivatización con o-phtaldialdehido (Joseph y Marsden, 1987). La derivatización se utiliza para la detección y cuantificación de aminoácidos y proteínas que no presentan características electroactivas, siendo los reactivos derivatizantes los que interactúan con el grupo amino produciendo dicha reacción química para que los aminoácidos puedan ser detectados mediante amperometría (Joseph y Marsden, 1987). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para las concentraciones extracelulares de Glu, Gln, Gly, taurina (Tau), alanina (Ala) y GABA, así como la comparación de los grupos por la prueba *t de Student*.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

9.1 Observaciones Conductuales.

Grupo en libre movimiento: los animales mostraron síntomas preconvulsivos 5 min posteriores a la inyección de 4-AP en la CE. Estos síntomas se caracterizaron por hiperexcitabilidad, temblor, salivación e incremento en la actividad motora, seguido por sacudidas de cabeza, movimientos de las vibrisas, movimientos masticatorios y sacudidas de perro mojado. Aproximadamente 20 min posteriores a la inyección de 4-AP en la CE, todos los animales mostraron comportamiento convulsivo intenso el cual se caracterizó por sacudidas y convulsiones tónico-clónicas, las cuales se presentaron durante todo el experimento. Durante los episodios de crisis se tuvo que sujetar a la rata. Al final del experimento la rata fue sacrificada, el cerebro removido con la finalidad de determinar visualmente la posición exacta de la sonda y el sitio de la inyección.

9.2 Registro EEG.

En el grupo en libre movimiento se induce actividad epileptiforme intensa en la CE y el HP 1 a 2 min posteriores a la inyección de 4-AP en la CE, dicha actividad se caracterizó por complejos espiga-onda y poli-espigas de alta frecuencia, con un rango de amplitud (CE/HP) 0.45 a 1.25 y 0.5 a 1.25 mV. Las descargas se propagaron casi de manera inmediata a la zona de proyección (HP). Una vez iniciada la actividad epileptiforme, las descargas se presentaron de manera continua durante todo el experimento, llamando a este fenómeno "*status epilepticus*", el cual se presentó a los 4 min de inyectada la 4-AP.

En el grupo anestesiado la actividad epileptiforme inició de 7 a 9 min después de

la inyección de la 4-AP en la CE, la amplitud más alta de las descargas en la CE varió de 0.87 a 1.87 mV y en el HP de 0.62 a 1.5 mV. Dichas descargas en general fueron más grandes o similares en la CE que las encontradas en el HP. Los patrones de descargas fueron similares a los presentados en el grupo en libre movimiento, mientras que el "status epilepticus" apareció a los 9 min después de inyectada la 4-AP, a excepción de una rata que se presentó a los 18 min. Dicho *status* se mantuvo durante todo el experimento.

9.3 Niveles extracelulares de los aminoácidos.

Los niveles basales de los aminoácidos fueron obtenidos de las primeras 6 fracciones colectadas antes de la inyección de la 4-AP, dichos valores basales fueron considerados como el 100% para cada aminoácido (Tabla 2). La inyección de la 4-AP en la CE produjo descargas EEG, tanto en esta área como en el HP, las cuales se correlacionaron con el incremento en el nivel extracelular del Glu observado en el HP. Para el grupo en libre movimiento se registró un incremento máximo de $1241\% \pm 102.50$ con respecto al valor basal. El grupo anestesiado, registró un incremento máximo del $299\% \pm 31.89$ con respecto al valor basal. En ambos grupos se encontraron de 3 a 5 niveles pico en la concentración extracelular de Glu durante todo el experimento. Para los demás aminoácidos, se observaron los siguientes valores máximos (grupo anestesiado; grupo en libre movimiento): para la Gln $287\% \pm 31.45$; $1365\% \pm 82.35$; la Gly $238\% \pm 25.13$; $540\% \pm 61.32$; la Tau $177\% \pm 17.00$; $492\% \pm 111.20$; la Ala $549\% \pm 39.38$; $363\% \pm 60.73$ y el GABA $324\% \pm 74.85$; $107\% \pm 9.43$ todos con respecto al valor basal (Fig. 8, 9, 10 y 11).

TABLA 2. NIVELES BÁSALES DE LOS AMINOÁCIDOS EN EL DIALIZADO DE

HP

AMINOÁCIDO	GRUPO ANESTESIADO (μM)	GRUPO EN LIBRE MOVIMIENTO (μM)
GLUTAMATO	2.06 ± 0.07	1.95 ± 0.12
GLUTAMINA	1.65 ± 0.06	0.86 ± 0.04
GLICINA	1.2 ± 0.16	1.2 ± 0.14
TAURINA	1.69 ± 0.14	1.03 ± 0.15
ALANINA	0.40 ± 0.04	0.65 ± 0.07
GABA	1.15 ± 0.1	1.36 ± 0.02

Inyección de 4-AP en Ctx. Entorrinal (Grupo Anestesiado) Hipocampo

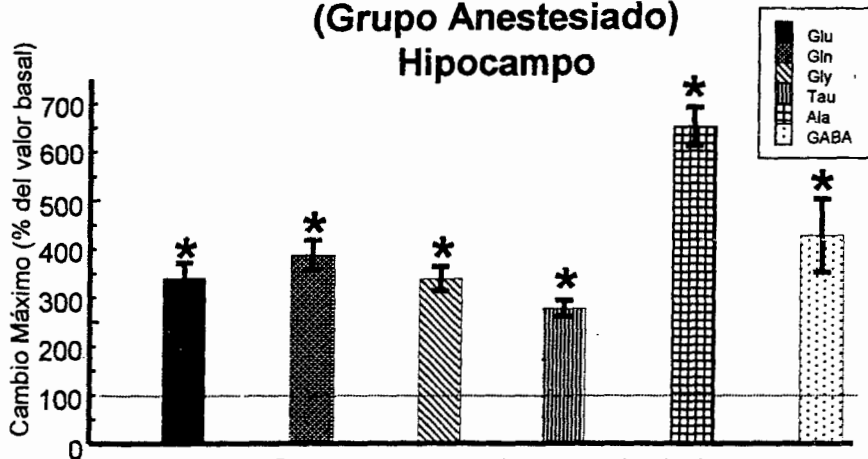


Fig. 8. La figura representa el porcentaje de incremento con respecto al valor basal de los niveles extracelulares de los aminoácidos en el hipocampo, después de la inyección de la 4-AP (250 pmoles/2 μ L) en la corteza entorrinal. La línea punteada corresponde al valor basal y las barras representan los valores obtenidos de los aminoácidos después de la inyección de la 4-AP. El Hipocampo fue infundido con medio normal durante todo el experimento. Promedio \pm SEM (n=5) (*t de student* * $p < 0.0001$ con respecto del valor basal).

Inyección de 4-AP en Ctx. Entorrinal (Grupo Libre Movimiento) Hipocampo

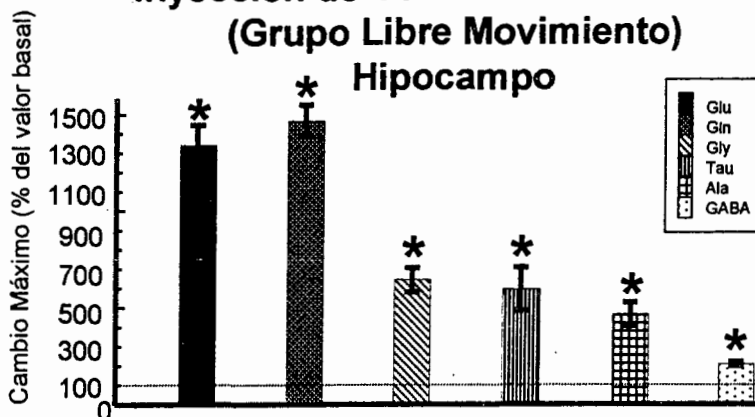
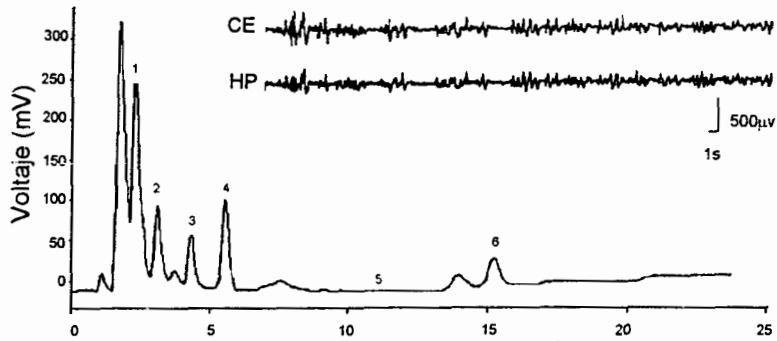


Fig. 9. La figura representa el porcentaje de incremento con respecto al valor basal de los niveles extracelulares de los aminoácidos en el hipocampo, después de la inyección de la 4-AP (250 pmoles/2 μ L) en la corteza entorrinal. La línea punteada corresponde al valor basal y las barras representan los valores obtenidos de los aminoácidos después de la inyección de la 4-AP. El Hipocampo fue infundido con medio normal durante todo el experimento. Promedio \pm SEM (n=4) (*t de student* *p<0.0001 con respecto del valor basal).

A.



B.

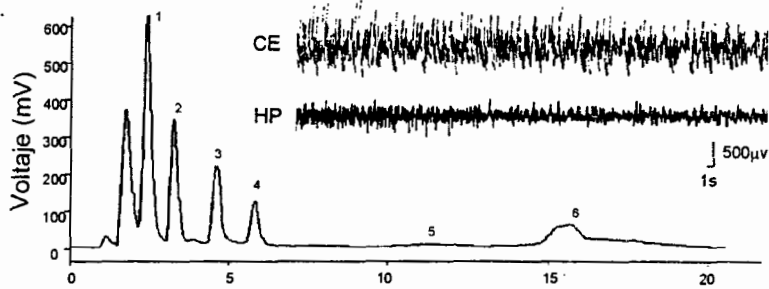
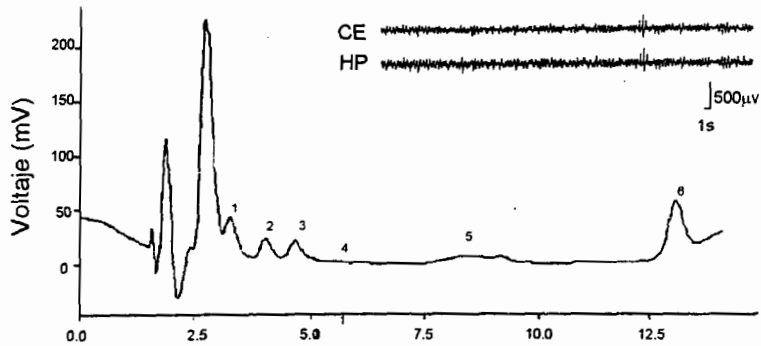


Figura 10. La figura muestra los cromatogramas y registros EEG obtenidos para el grupo anestesiado. **A.** se muestra el cromatograma representativo de una rata antes de la inyección de la 4- AP y su registro EEG. **B.** Se muestra el cromatograma posterior a la inyección de la 4- AP y su registro EEG. Las características del cromatograma son las siguientes: 1. Glu, 2. Gln, 3. Gly, 4. Tau, 5. Ala, 6. GABA.

A.



B.

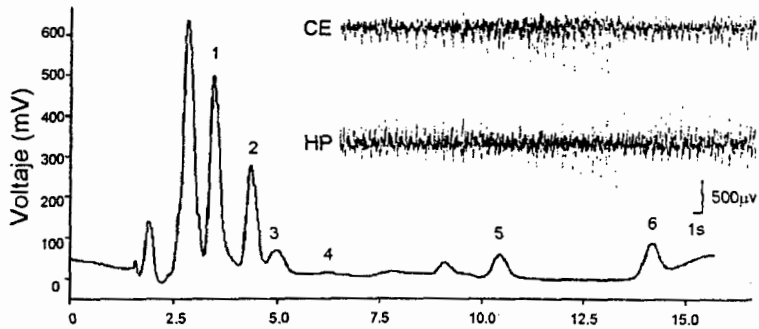


Figura 11. La figura muestra los cromatogramas y registros EEG obtenidos para el grupo en libre movimiento. **A.** Se muestra el cromatograma representativo de una rata antes de la inyección de la 4-AP y su registro EEG. **B.** Se muestra el cromatograma posterior a la inyección de la 4-AP y su registro EEG. Las características del cromatograma son las siguientes: 1. Glu, 2. Gln, 3. Gly, 4. Tau, 5. Ala, 6. GABA.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinaron los efectos de la inyección de la 4-AP en la CE sobre la liberación de los aminoácidos neurotransmisores en el HP, así como su correlación con el registro EEG. La actividad epileptiforme inducida por la 4-AP en ambas regiones se caracterizó por la presencia de descargas de frecuencia y amplitud altas, las cuales se propagaron casi inmediatamente a la región de proyección (HP). Estas descargas son similares a las observadas previamente con infusiones de 4-AP a través de cánulas de microdiálisis en el circuito CE – HP (Medina-Ceja et al., 2000), en el estriado (Morales-Villagrán et al., 1995), en el HP (Peña y Tapia, 1999) y en la corteza motora (Morales-Villagrán et al., 1999).

Los resultados del registro EEG muestran que dicha actividad inicia de manera casi inmediata (1 a 2 min) en el grupo en libre movimiento, y en el caso del grupo anestesiado inicia tiempo después (7 a 9 min), aunque la propagación al HP se da de manera simultánea al inicio de las ráfagas en la CE en ambos grupos experimentales, para posteriormente presentarse *status epilepticus* aproximadamente 4 min después de la inyección de la 4-AP en el grupo en libre movimiento. Estos resultados se correlacionan con los datos encontrados por Medina-Ceja y col. (2000) en el registro EEG del mismo circuito con una infusión de 40 mM de 4-AP en la CE. En caso del grupo anestesiado el *status epilepticus* se presentó a los 9 min después de inyectada la 4-AP, esto nos lleva a pensar que las condiciones experimentales marcan estas diferencias en los dos grupos, al respecto Peña y Tapia (1999) han encontrado patrones EEG similares en el HP izquierdo de ratas anestesiadas, con infusiones de 4-AP a una concentración de 70 mM. Las diferencias presentes en ambos grupos

experimentales sobre el registro EEG, en lo que respecta al tiempo de aparición de dicha actividad, así como en la intensidad, el rango de amplitud y el establecimiento del *status epilepticus* sugiere una posible participación del anestésico sobre la actividad registrada, ya que la intensidad de la anestesia parece afectar dicha actividad (Nisnikawa y Maciver, 2000).

En lo que respecta a las concentraciones extracelulares de los aminoácidos en el HP, particularmente la del Glu, se incrementó en 1241% con respecto al valor basal, lo cual se correlacionó con un aumento en la actividad epileptiforme, estos hallazgos difieren de los datos encontrados por Medina-Ceja y col. (2000), en los cuales no se encontraron diferencias significativas en la región de proyección en el circuito CE-HP, esto probablemente se deba a que en este estudio el análisis de los aminoácidos se realizó con una técnica diferente y con una colecta de la muestra de 15 min por lo cual no fue posible detectar los cambios observados en este trabajo. En el caso del grupo anestesiado se encontró un aumento en la concentración extracelular de Glu del 299%, este incremento es significativamente menor al encontrado en el grupo en libre movimiento, lo cual nos sugiere una posible participación del halotano en las diferencias encontradas. Al respecto, Kirson y col. (1998) han observado que el halotano inhibe la transmisión glutamatérgica mediante el bloqueo del receptor a Glu tipo AMPA, así como por la inhibición presináptica de su liberación. Trabajos previos han observado que el halotano disminuye la amplitud de los EPSP y deprime la transmisión excitadora e incrementa la amplitud de los IPSP registrados en las células piramidales de CA1 del HP (Nisnikawa y Maciver, 2000), lo cual se correlaciona con la actividad EEG encontrada en este estudio, en donde se observó una latencia mayor en la aparición de las descargas y del *status epilepticus* en el grupo anestesiado, así como una menor

amplitud de las descargas.

Por otro lado, trabajos previos (Peña y Tapia, 2000, 1999; Medina-Ceja et al., 2000; Morales-Villagrán et al., 1996, 1995) han demostrado que la 4-AP eleva la concentración extracelular de Glu y se ha sugerido que el Glu se libera de la terminal nerviosa, este hecho se apoya en los estudios realizados por Peña y Tapia (2000) donde se observó en este mismo modelo que la administración del bloqueador del canal de Na^+ tetrodotoxina (TTX, relacionado con la liberación de neurotransmisores de terminales nerviosas) disminuye tanto la liberación del Glu, así como la intensidad y duración de la actividad epileptiforme; en este mismo trabajo se encontró que el bloqueador del canal de Ca^{++} tipo N disminuye la liberación del Glu y tiene un efecto protector contra la neurodegeneración del HP. Asimismo se postula que una sobreactivación de receptores a Glu, principalmente del tipo NMDA, esta involucrada en la generación de la actividad epileptiforme y en la neurodegeneración producida por la infusión de la 4-AP. En este sentido, se ha observado que las corrientes de Ca^{++} de umbral alto son abundantes en la terminal nerviosa y en mayor proporción en el HP y en el GD tanto en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, como en modelos de epilepsia (Beck et al., 1998), lo cual apoya fuertemente que la liberación masiva del Glu, produce una sobreactivación de los receptores de Glu, un aumento en la excitabilidad y como consecuencia la neurodegeneración de las células CA1 y CA3 del HP de la rata (Peña y Tapia, 2000).

Los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que el Glu tiene un papel importante en el inicio y la propagación de la actividad convulsiva en el circuito CE – HP de la rata. Los niveles altos de Glu encontrados en el HP, inducidos por la inyección de 4-AP en la CE en ambos grupos experimentales, se correlacionaron

con la propagación de las crisis al HP. Dichos incrementos en las concentraciones extracelulares de Glu no fueron continuos a través de todo el experimento, ya que se observaron oscilaciones que fueron correlacionadas con un aumento de amplitud de las descargas epilépticas o con la iniciación del *status epilepticus*, lo cual nos lleva a sugerir que estos incrementos pudieran reforzar el fenómeno epiléptico.

En este estudio se encontró un aumento en la concentración extracelular de la Gln, casi en la misma proporción que el Glu en ambos grupos, considerando que este aminoácido es el precursor del Glu se podría esperar que su concentración alta fuera una consecuencia del recambio Glu – Gln, sin embargo no podemos dar una explicación clara sobre este hecho. Para los aminoácidos Gly y Tau en la región de proyección (HP) tuvieron aumentos significativos, pero en mayor proporción en el grupo en libre movimiento, en estudios previos se ha demostrado un aumento en la concentración extracelular de estos aminoácidos con la administración de 4-AP (Morales-Villagrán y Tapia, 1995; Peña y Tapia, 1999). Asimismo, se ha encontrado que la concentración extracelular de la Tau se aumenta con una variedad de estímulos, particularmente cuando se altera la osmolaridad (Dutton, 1993; Martín, 1992; Wade et al., 1988). En el caso de los aminoácidos Ala y GABA el aumento fue mayor en el grupo anestesiado. En este sentido, trabajos previos han demostrado aumentos en la concentración extracelular de Gly, Tau, Ala y GABA en ratas anestesiadas (Peña y Tapia, 1999). El aumento en la concentración extracelular de GABA aquí encontrado, se debe probablemente a que el halotano aumenta la amplitud de los IPSP y por lo tanto incrementa la liberación del mismo (Nisnikawa y Maciver, 2000). Asimismo, se puede sugerir que este aumento en el GABA se deba a un mecanismo de compensación para tratar de evitar las crisis.

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan evidencia de que el Glu participa en la propagación de las crisis epileptiformes inducidas por la inyección de 4-AP en el circuito CE-HP.

CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente trabajo indican que los incrementos en la concentración extracelular del glutamato inducidos por la 4-AP, están implicados en la iniciación y propagación de la actividad epileptiforme.

2. El aumento en los niveles de glutamato fue oscilante, lo cual se correlaciona con el aumento en la amplitud de las descargas epilépticas y es por lo que podemos concluir que dichos incrementos pueden reforzar el fenómeno epileptógeno en el circuito corteza entorrinal-hipocampo de ratas anestesiadas y en libre movimiento.

3. Las diferencias en la concentración extracelular de los aminoácidos, presentadas en ambos grupos experimentales sugieren que el grupo en libre movimiento es el más apropiado para el análisis de los eventos que se suscitan en el fenómeno paroxístico inducido por la 4-AP en el circuito corteza entorrinal – hipocampo de ratas, debido a los efectos del anestésico sobre los receptores a Glu, así como la observación de las manifestaciones conductuales que se presentan durante el fenómeno convulsivo.

BIBLIOGRAFÍA

Agoston D., Hargittal P. y Nagy A. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium movements and changes of membrane potential in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* **41**: 745-751.

Ahnert-Hilger G. y Habermann E. (1981). Increase of cGMP accumulation of Ca^{2+} evoked by drugs acting on sodium or potassium channels. *European Journal of Pharmacology*, **70**: 301-310.

Alonso A. y Köhler C. (1984). A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, **225**: 327-343.

Alonso A. y Llinas R. (1989). Subthreshold Na^{+} -dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature*, **342**: 175-177.

Amaral D. G. (1978). Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **182**: 851-914.

Amaral D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology*, **3**: 225-229.

Amaral D. G. y Witter M. P. (1995). Hippocampal formation. En: *The rat nervous system*. G., Paxinos, ed. Academic Press, San Diego, California, pp 443-494.

Amaral D. G., Ishizuka N. y Claiborne Y. B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. En: *Progress in brain research: understanding the brain through the hippocampus: the hippocampal region as a model for studying structure and function*. J. Storm-Mathisen, J. Zimmer y O. Pottersen, eds. Academic Press, San Diego, California, pp 1-11.

- Barinaga M. (1995). A new face for the glutamate receptor. *Science*, **267**: 177-178.
- Bayer S. A. (1985). Hippocampal region. En: *The Rat Nervous System: Forebrain and Midbrain*. G., Paxinos, ed., Academic Press, New York, U.S.A., pp 335-352.
- Beck H., Steffens R., Elger C. E. y Heinemann U. (1998). Voltage-dependent Ca^{2+} currents in epilepsy. *Epilepsy Research*, **32**: 321-332.
- Bettler B. y Mülle C. (1995). Review: Neurotransmitter receptors II. AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology*, **34**: 123-139.
- Bormann J. (1988). Electrophysiology of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor subtypes. *Trends in Neuroscience*, **11**: 112-116.
- Bormann J. y Fiegespan A. (1995). $GABA_A$ receptor. *Trends in Neuroscience*, **18**: 515-519.
- Boss B. D., Peterson G. M. y Cowan W. M. (1985). On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Research*, **338**: 144-150.
- Bouchard R. y Fedida D. (1995). Closed-and open-state binding of 4-aminopyridine to the cloned human potassium channel Kv 1.5. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **275**: 864-876.
- Buckle P. J. y Hass H. L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *Journal of Physiology*, **326**: 109-122.
- Caballero-Bleda M. y Witter M. P. (1993). Regional and laminar organization of projections from the presubiculum y parasubiculum to the entorhinal cortex: an anterograde tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **328**: 115-129.
- Caron P. C., Kremzner L. T. y Cote L. J. (1987). GABA and its relationship to putrescine metabolism in the rat brain and pancreas. *Neurochemistry International*,

10: 219-229.

Cavazos J. E., Golarai G. y Sutula T. P. (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *Journal of Neuroscience*, **11**: 2795-2803.

Choquet D. y Korn H. (1992). Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *Journal of Genetics Physiology*, **99**: 217-240.

Cotman C. W. y Monaghan D. T. (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annals Review Neuroscience*, **11**: 61-80.

Daune G. y Seiler N. (1988). Interrelationships between ornithine, glutamate, and GABA. II. Consequences of inhibition of GABA-T and ornithine aminotransferase in brain. *Neurochemistry Research*, **13**: 69-75.

DeOlmos J., Jardy H. y Heimer L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formation in the rat: an experimental HPR study. *Journal of Comparative Neurology*, **181**: 213-244.

Dichter M. A. (1989). Cellular Mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* **30**: S0-S12.

Dichter M. A. (1998). The neurobiology of epilepsy. En: *Epilepsy*. Engel J. y Pedley T. A. eds. Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A., pp 4943-4949.

Dutton G. R. (1993). Astrocyte aminoacids: evidence for release and possible interactions with neurons. En: *Astrocytes. Pharmacology and Function*. Murphy S. ed. Academic, Press, San Diego, pp 173-191.

Engel J. y Pendley T. A. (1998). What is Epilepsy?. En: Epilepsy. Engel J. y Pedley T. A., eds. Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A., pp 4732-4949

Engelsen B. (1986). Neurotransmitter glutamate: its clinical importance. Acta of Neurology Science, **74**: 337-355.

Fagg G. E. y Foster A. C. (1983). Amino-acid neurotransmitter and their pathways in the mammalian central nervous system. Neuroscience, **9**: 701-719.

Faingold C. L. (1988). The genetically epilepsy-prone rat. Genetics in Pharmacology, **19**: 331-338.

Faingold C. L., Naritoku D.K., Copley C. A., Ryal M. E., Riaz A., Yersen C. A. y Arneric S.P. (1992). Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. Epilepsy Research, **13**: 95-105.

Fisher R. S. (1991). Clinical overview of epilepsy. Neurotransmitters and epilepsy. En: Frontiers of clinical neuroscience vol. II. Fisher R. S. y Coyle J. T., eds. Wiley-Liss, U. S. A., pp 61-76.

Fisher R. E., Gray R. y Johnston D. (1990). Properties and distribution of single voltage-gated calcium channels in adult hippocampal neurons. Journal of Neurophysiology, **64**: 91-104.

Flores-Hernández J., Galárraga E., Pineda J. C. y Bargas J. (1994). Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. Journal of Neurophysiology, **72**: 2246-2256.

Fonnum F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. Journal of Neurochemistry, **42**: 1-11.

Foster A. C. y Fagg G. E. (1984). Acidic amino binding sites in mammalian

neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Research Review*, **7**: 103-164.

Fragoso-Veloz., Massieu L., Alvarado R. y Tapia R. (1990). Seizures and wet dogs shakes induced by 4-Aminopyridine and their potentiation by nifedipine. *European Journal of Pharmacology*, **178**: 275-284.

Freedman S. B., Dawson G., Villareal M. L. y Miller R. J. (1984). Identification and characterization of voltage-sensitive calcium channels in neuronal clonal cell lines. *Journal of Neuroscience*, **4**: 1453-1467.

Freund T. F. y Antal M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, **336**: 170-173.

Geddes J. W., Cahan L. D., Cooper S. M., Kim R. C., Choi B. H. y Cotman, C. W. (1990). Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, **108**: 214-220.

Germroth P., Schwerdtfeger W. K. y Buhl E. H. (1989). Gabaergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus. *Brain Research*, **494**: 187-192.

Gillespie J. I. y Hunter O. F. (1975). The action of 4-Aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, **252**: 70-71.

Giraldez L. y Girardi E. (2000). Effects of an adenosine in an experimental model of epilepsy. *Neurochemistry International*, **36**: 243-247.

Gloor P. y Oliver A. (1982). The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, **12**: 129-144.

Glover W. E. (1982). The aminopyridines. *Genetics Pharmacology*, **13**: 259-474.

Gould E., Cameron H. A, Daniels D. C., Woolley C. S. y McEwen B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *Journal of*

Neuroscience, **12**: 3642-3650.

Haberly L. B. (1985). Neuronal circuit in olfactory cortex: anatomy and functional implications. *Chemistry Senses*, **10**: 219-238.

Haglund L., Swanson L. W. y Köhler C., (1984). The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **229**: 171-185.

Hara Y., Kitamura K. y Kuriyama H. (1980). Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, **68**: 99-106.

Henley J.M. (1994). Kainate -binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends in Pharmacological Science*, **15**: 182-190.

Holz G. G., Rane S. G. y Dunlap K. (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **319**: 670-672.

Huang H. Y., Hertting G., Allgaier C. y Jackisch R. (1989). 3-4-diaminopyridine-induced noradrenaline release from CNS tissue as a model for action potential-evoked transmitter release: effects of phorbol esters. *European Journal of Pharmacology*, **169**:115-123.

Ito M. (1994). *Neurochemical Approach to Epilepsy*. No To Hattatsu, **26**: 101-110.

Johnson D. D. y Tucek J. M. (1987). The epileptic chickens. En: *Neurotransmitters and epilepsy*. Jobe P. C. y Laird H. E., eds. Humana press, New Jersey, U.S.A., pp 95-114.

Joseph M. H. y Marsden C. A. (1987). Amino acids and small peptides. En: *HPLC*

of small molecules a practical approach. Lim C. K. ed. Irl Press, pp 13-28.

Kenyon J. L. y Gibbons W. R. (1979). 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibres. *Journal of General Physiology*, **73**: 139-157.

Kirsch G. E. y Drewe J. A. (1993). Gating-dependent mechanisms of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *Journal of General Physiology*, **102**: 797-816.

Kirsch G. E. y Narahashi T. (1983). Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **226**: 174-179.

Kirsch G. E., Vener D. F., Drewe J. A. y Brown A. M. (1993). Modulation of 4-aminopyridine block by mutation of deep pore residues in delayed rectifier K⁺ channels. *Biophysical Journal*, **64**: A226.

Kirson E. D., Yaari Y. y Perovansky M. (1998). Presynaptic and postsynaptic actions of halothane at glutamatergic synapses in the mouse hippocampus. *Brain Journal of Pharmacology*, **124**: 1607-1614.

Kocsis C. (1983). Maturation of mammalian myelinated fibers: changes in action-potential characteristics following 4-aminopyridine application. *Journal of Neurophysiology*, **50**: 449-463.

Köhler C. (1985). A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neuroscience Letters*, **56**: 131-190.

Köhler C. (1986). Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *Journal of Comparative Neurology*, **246**: 149-169.

Köhler C. y Steinbush H. (1982). Identification of serotonin and nonserotonin-containing-neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the

hippocampal formation: a combined immunohistochemical and fluorescent tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, **7**: 951-975.

Kosel K. C., Van Hoesen G. W. y Roseen D. L. (1982). Non-hippocampal cortical projections from the entorhinal cortex in the rat and *Rhesus* monkey. *Brain Research*, **244**: 201-213.

Krauss G. L., Kaplan P. y Fisher R. S. (1989). Parenteral magnesium sulfate fails to control electroshock and pentylenetetrazole seizures in mice. *Epilepsy Research* **4**: 201-206.

Krettek J. E. y Price J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, **172**: 723-752.

Kutsuwada T., Kashiwabushi N., Mori H., Sakimiura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumanishi T. y Arakawa M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, **55**: 523-536.

Lacaille J-C., Kunkel D. D. y Schwartzkroin P. A. (1989). Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. En: *The Hippocampus – New Visitas*. Chan-Palay V, Kohler Köhler C, eds. New York: Alan R. Liss, Inc., U.S.A., 287-305.

Lewis P. R. y Shute C. C. D. (1967). The cholinergic limbic system: projections to the hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain*, **90**: 521-542.

Liga Central Contra la Epilepsia, (1998). WWW. epilepsia.org.

Lingenhohl K. y Finch D. (1991). Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Experimental Brain*

Research, **84**: 57-74.

Lipton S. A. y Rosenberg P. A. (1994). Excitatory aminoacids a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal Medical*, **330**: 613-622.

Logan W. J. y Snyder S. H. (1972). High-affinity uptake systems for glycine, glutamate and aspartate in rat CNS synaptosomes. *Brain Research*, **42**: 413-431.

López-Antúnez L. (1996). Introducción al sistema nervioso. En: *Anatomía funcional del sistema nervioso*. Limusa, México, p.p. 5-8.

Lopes da Silva F. H., Witter M. P., Boeijinga P. H. y Lohman A. H. M. (1990). Anatomical organization and physiology of the limbic cortex. *Physiological Review*, **70**: 453-511.

Lloyd K. G., Scatton B., Voltz C., Valin A., Bryere P. y Naquet R. (1986). Amino acid and monoamine metabolite levels in the CSF of *Papio papio*. Correlation with degree of photosensitive. *Brain Research*, **363**: 390-394.

Martín D. L. (1992). Síntesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia*, **5**: 81-94.

Martín J. H. (1998). El sistema límbico. En: *Neuroanatomía*. Prentice May, Madrid, pp. 447-478.

Mateu G., Privat A., Thibault J. y Vignon J. (2000). Modulation of glutamate in primary cultures by the presence of striatal target cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **18**: 607-613.

Mayer M. L. y Westbrook G. L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology*, **28**: 197-276.

Medina-Ceja L., Morales-Villagrán A. y Tapia R. (2000). Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis

and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Research Bulletin*, **53**: 255-262.

Meguro H., Mori H., Araki K., Kushiya E., Kutsuwada T., Yamazaki M., Kumanishi T., Arakawa M., Sakimura K. y Mishina M., (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*, **357**: 70-74.

Miele M., Berners M., Boutelle M. G., Kusakabe H. y Fillenz M. (1996). The determination of the extracellular concentration of brain glutamate using quantitative microdialysis. *Brain Research*, **707**: 131-133

Millan M. H., Obrenovitch T. P., Sarna G.S., Lok S. Y., Lindsay S. y Meldrum B. (1991). Changes in rat brain extracellular concentration during seizures induced by systemic picotroxin or focal bicuculline injection: an in vivo dialysis study wiht on-line enzymatic detection. *Epilepsy Research*, **9**: 86-91.

Mody I., Stanton P.K. y Heinemann U. (1988). Activation of N-methyl-d-aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate gyrus granule cells after kindling. *Journal of Neurophysiology*, **59**: 1033-1054.

Monaghan T. D., Bridges J. R. y Cotman C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. **29**: 365-402.

Monyer H. Seeburg P. (1992). Developmental expression of NMDA receptor subtypes. *Society of Neuroscience*, **18**: 172-181.

Moore R. Y., Ziegler B. y Bayer S. A. (1978). Monoamine neuron innervation of the hippocampal formation: Alteration by neonatal irradiation. *Experimental Neurology*, **60**: 318-326.

Morales-Villagrán A. y Tapia R. (1995). Preferential stimulation of glutamate

release by 4-Aminopyridine in rats striatum *in vivo*. *Neurochemistry International*, **28**: 35-40.

Morales-Villagrán A., Ureña-Guerrero M. E. y Tapia R. (1996). Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *European Journal of Pharmacology*, **305**: 87-93.

Morales-Villagrán A., López-Pérez S. J., Medina-Ceja L. y Tapia R. (1999). Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-Aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis electrical recording technique. *Neuroscience Letters*, **275**: 133-136.

Musshoff U., Schünke U., Köhling R. y Speckmann E. J. (2000). Alternative splicing of the NMDAR1 glutamate receptor subunit in human temporal lobe epilepsy. *Molecular Brain Research*, **76**: 377-384.

Nakanishi S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science*, **258**: 597-603.

Nayler W. G. (1988). Calcium antagonist, Academic Press, London pp 232-249.

Nisnikawa K. y Maciver M. B. (2000). Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *Journal of Neuroscience*, **20**: 5915-5923.

Nowicky H. C., Fox A. P. y Tsien R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**: 440-443.

Nyakas C., Luiten P. G. M., Spencer D. G. y Traber J. (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Research Bulletin*, **18**: 533-545.

Olsen R. W. (1981). GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *Journal of Neurochemistry*, **37**: 1-13.

Olsen R. W., Wamsley J. K., McCabe R. T., Lee R. J. y Lomax P. (1985). Benzodiazepine / γ -aminobutyric acid receptor deficit in the midbrain of the seizure-susceptible gerbil. *Proceedings of National Academic Sciences (U. S. A.)*, **82**: 6701-6705.

Olsen R. W. y Venter J. (1986). Benzodiazepine/ GABA receptors and chloride channels: structural and fuctional properties. En: *Receptor Biochemistry and Metodology*. Olsen R. W. and Venter J., eds. Alan R. Liss, New York, U. S. A., pp 257-271.

Olsen R. W. (1987). The γ -aminobutyric acid/ benzodiazepine / barbiturate receptor chloride ion channel complex of mammalian brain, in synaptic fuction. En: *Synaptic Function*. Edelman G. M., Gall W. E. y Cowan W. M., eds. Neuroscience Research Foundation / John Wiley and Sons, U. S. A., pp 257-271.

Ottersen O. P. (1982). Connections of the amygdala of the rat. IV. Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, **205**: 30-48.

Palmer A. M., Robichaud P. J. y Reiter C. T. (1994). The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiology of Aging*, **15**: 103-111.

Patterson T. A., Kim E. K., Meldrum M. J. y Dawson R. Jr. (1995) Glutamate efflux from rat brain slices and cultures: A comparison of the depolarizing agents potassium, 4-aminopyridine and veratrine. *Neurochemical Research*, **20**: 225-232.

Paxinos G. y Watson C. (1986). The rat brain. En: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2^o edición. G., Paxinos y Watson C. eds. Academic Press. San Diego California.

Peña F. y Tapia R. (1999). Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-Aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *Journal of Neurochemistry*, **72**: 2006-2014.

Peña F. y Tapia R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-Aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate – and GABA – mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*, **101**: 547-561.

Phillipson O. T. y Griffiths A. C. (1985). The topographic order of inputs to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, **16**: 275-296.

Piredda S. y Gale K. (1986). Role of excitatory amino acid transmission in the genesis of seizures elicited from the deep prepiriform cortex. *Brain Research*, **377**: 205-210.

Rogawski M. A. y Barker J. L. (1983). Effects of 4-Aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Research*, **280**: 180-185.

Schoepp D. D. y Conn P. J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacological Science*, **14**: 13-20.

Schwartzkroin P. A. y McIntyre D. C. (1998). Limbic Anatomy and Physiology. En: *Epilepsy*. Engel J. y Pedley T. A., eds. Lippincott Williams & Wilkins, U. S. A., pp 4949-4997.

Segal M. y Barker J. L. (1986). Rat hippocampal neurons in culture: Ca^{++} and Ca^{++} dependent K^{+} conductance. *Journal of Neurophysiology*, **55**: 751-770.

Seres I. y Ribak C. E. (1984). Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: anatomical evidence for feed-forward inhibition. *Journal of Neurocytology*, **13**: 215-225.

Shieh C. C. y Kirsch G. E. (1994). Mutation analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K^{+} channels. *Biophysical Journal*, **67**: 2316-1325.

Sloviter R. S. (1994). On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus*, **4**: 250-253.

Soltész I. y Jones R. S. G. (1995). The direct perforant path input to CA1: excitatory or inhibitory?. *Hippocampus*, **5**: 101-103.

Spruston N y Johnston D. (1992). Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, **67**: 508-529.

Spyker D. A., Linch C., Shabanowitz J. y Jinn J. (1980). Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clinical Toxicology*, **16**: 487-497.

Swanson I. W. y Cowan W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **172**: 49-84.

Taguchi J. y Kuriyama K. (1984). Purification of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor from rat brain by affinity column chromatography using a new benzodiazepine,

1012-s, as an immobilized ligand. *Brain Research*, **323**: 219-226.

Takagaki G. y Konagaya H. (1985). Properties of the uptake and release of neurotransmitter glutamate in cerebral cortical tissue of guinea pigs. *Neurochemistry Research*, **10**: 1059-1069.

Tapia R., Medina-Ceja L. y Peña F. (1999). On relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochemistry International*, **34**: 23-31.

Tapia R. y Sitges M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes, *Brain Research*, **250**: 291-299.

Tapia R., Sitges M. y Morales E. (1985). Mechanisms of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Research*, **361**: 373-382.

Thesleff S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*, **5**: 1413-1419.

Tibbs G. R., Dolly J. O. y Nicholls D. G. (1989). Dendrotoxin, 4-aminopyridine and α -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca^{2+} -dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, **52**: 201-206.

Ticku M. K. (1991). Drug modulation of GABA_A-mediated transmission. *Seminars in Neuroscience*, **3**: 211-218.

Turner T. J., Adams M. E. y Dunlap K. (1993). Multiple Ca^{2+} channel subtypes coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proceeding of National Academic of Science U. S. A.*, **90**: 9518-9522.

Turner B. H., Mishkin M. y Knapp M. (1980). Organization of the amygdaloseptal projections from modality-specific cortical association areas in the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, **191**: 515-543.

Turski W. A., Cruczwar S. J., Kleinrok Z. y Turski L. (1983). Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*, **39**: 1408-1411.

Van Groen Y. y Wyss J. M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical and bilateral hippocampal formation projections. *Journal of Comparative Neurology*, **302**: 515-528.

Verhage M., McMahon H. T., Ghijsen W. E. J. M., Boomsma F., Scholten G., Wiegant V. M. y Nicholls D. G. (1991). Differential release of amino acids, neuropeptides and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, **6**: 517-524.

Vizi E. S. y Kiss J. P. (1998). Neurochemistry and Pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, **8**: 566-607.

Wade J. V., Olson J. P., Samson F. E., Nelson S. R. y Pazdernik T. L. (1988). A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *Journal of Neurochemistry*, **51**: 740-745.

Walker M. C., Galley P. T., Errington L. M., Shorvon S. D. y Jefferys G. R. (1995). Ascorbate and glutamate release in the rat hippocampus after perforant path stimulation: a dialysis electrode study. *Journal of Neurochemistry*, **65**: 725-731.

Wasterlain C. (1989). Amino acids neurotransmitters. En: *Basic Neurochemistry* 4ta. edición. Siegel G., Agranoff B., Albers R. W. y Molinoff P., eds. Raven Press. New York, pp 797-825.

Watkins J.C. y Olverman H. (1987). Agonists and antagonists for excitatory

amino acid receptors. *Trends in Neuroscience*, **10**: 265-272.

West M. J., Coleman P. D. y Flood D. G. (1988). Estimating the number of granule cells in the gyrus with the dissector. *Brain Research*, **448**: 167-172.

Wong R. K. S. y Prince D. A. (1978). Participation of calcium spikes during intrinsic burst firing in hippocampal neurons. *Brain Research*, **159**: 385-390.

Wong R. K. S. y Traub R. D. (1983). Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2-CA3 region. *Journal Neurophysiology*, **49**: 442-458.

Wyss J. M., Swanson L. W. y Cowan W. M. (1979). A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, **4**: 463-476.

Yamamoto C. (1972). Intracellular study of seizure-like after discharges elicited in thin hippocampal sections in vitro. *Experimental Neurology*, **35**: 154-164.

Zielinski F. F. (1988). Epidemiología. En: *A textbook of epilepsy*. J. Laidlaw, A. Richens y J. Oxley, eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 21-48.

Zilkha E., Obrenovitch T. P., Koshy A., Kusakabe H. y Bennetto H. P. (1995). Extracellular glutamate: on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, **60**: 1-9.