

2004-B

394395097

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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



EVALUACIÓN DE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AMINOPIRIDINA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GLUTAMATO MONOSÓDICO.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

NELA MONASTERIO RAMÍREZ

Las Agujas, Zapopan, Jal., Agosto de 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. NELA MONASTERIO RAMÍREZ
PRESENTE.**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título **"EVALUACIÓN DE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AMINOPIRIDINA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GLUTAMATO MONOSÓDICO"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **M.C. MÓNICA E. UREÑA GUERRERO**.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 1º de abril del 2004


DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. MÓNICA E. UREÑA GUERRERO.- Director del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

FORMA C

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación modalidad TESIS con el título: **EVALUACIÓN DE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AMINOPIRIDINA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GLUTAMATO MONOSÓICO**. Que realizó la pasante **NELA MONASTERIO RAMÍREZ** con número de código 394395097 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y, en su caso, programación del examen respectivo.

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

ATENTAMENTE

Las agujas, Zapopan, Jal., a 23 de agosto del 2004

EL DIRECTOR DEL TRABAJO

M en C. *Mónica E. Urrea Guerrero*
Mónica E. URREA GUERRERO



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

SINODALES

DRA. GRACIELA GUDIÑO CABRERA
DRA. MARISELA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
DR. ALBERTO MORALES VILLAGRÁN
DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

Mora 24/03/04
Marisela 25/03/04
Alberto 25/08/04
Jacinto 24/08/04

A CLAUDIA M. COLLINS

POR HABERME CONTAGIADO CON TU
GENEROSIDAD Y CORAJE, POR
ENSEÑARME QUE SÓLO LAS
SITUACIONES QUE NOS TRAEN
FELICIDAD SON AQUELLAS POR LAS
QUE VALE LA PENA LUCHAR.

NO TENGO PALABRAS QUE EXPRESEN EL AGRADECIMIENTO QUE SIENTO HACIA MIS PADRES POR DARMÉ LAS OPORTUNIDADES PARA REALIZAR CUALQUIERA DE MIS SUEÑOS, INCLUSO CUANDO NO LOS ENTENDÍAN.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A MÓNICA UREÑA POR EL TODO EL TIEMPO Y LA DEDICACIÓN QUE HA PUESTO PARA MEJORAR MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

GRACIAS A TODAS LAS PERSONAS QUE HAN COMPARTIDO SU CARIÑO Y SABIDURÍA CONMIGO, HAN ENRIQUECIDO MI VIDA CON SU PRESENCIA.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Ambientales (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la M. en C. Mónica E. Ureña Guerrero.

ÍNDICE

I.	Abreviaturas	iv
II.	Resumen	vi
III.	Introducción	1
IV.	Antecedentes	19
V.	Justificación	27
VI.	Hipótesis	28
VII.	Objetivos	29
VIII.	Materiales y métodos	30
IX.	Diagrama experimental	34
X.	Resultados	35
XI.	Discusión	60
XII.	Conclusiones	66
XIII.	Bibliografía	67

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Sinapsis GABAérgica	6
Figura 2. Sinapsis Glutamatérgica	10
Cuadro 1. Modelos experimentales de epilepsia	16
Figura 3. Efecto de la liberación excesiva de Glu	23
Figura 4. Conductas observadas después de la administración ICV de 4-AP	37
Figura 5. Latencia del primer tren de descargas EEG inducidas por la administración ICV de 4-AP	38
Cuadro 2. Características del primer tren de descarga	40
Figura 6. Efecto de la administración ICV de 1nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas intactas	41
Figura 7. Efecto de la administración ICV de 1nmol de 4-AP sobre el registro EEG tratadas con GMS	43
Figura 8. Efecto de la administración ICV de 2nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas intactas	45
Figura 9. Efecto de la administración ICV de 2nmol de 4-AP sobre el registro EEG tratadas con GMS	47
Figura 10. Efecto de la administración ICV de 3nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas intactas	49
Figura 11. Efecto de la administración ICV de 3nmol de 4-AP sobre el registro EEG tratadas con GMS	51
Figura 12. Efecto de la administración ICV de 4nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas intactas	53
Figura 13. Efecto de la administración ICV de 4nmol de 4-AP sobre el registro EEG tratadas con GMS	55
Figura 14. Efecto de la administración ICV de 5nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas intactas	57
Figura 15. Efecto de la administración ICV de 5nmol de 4-AP sobre el registro EEG tratadas con GMS	59

ABREVIATURAS

[³ H]-GABA	Ácido γ -aminobutírico tritiado
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AP	Anteroposterior
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ⁺⁺	Ión Calcio
Cl ⁻	Ión Cloro
EEG	Registro electroencefalográfico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-T	Transaminasa del GABA
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
GMS	Glutamato monosódico
ICV	Intra-cerebro-ventricular
Int	Grupo Intacto
IPSP	Potencial inhibitor postsináptico
K ⁺	Ión Potasio
KA	Ácido Kainico
L	Lateral
Mg ⁺⁺	Ión magnesio
Na ⁺	Ión Sodio
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PP	Fosfato de piridoxal
R-AMPA	Receptor glutamatérgico para AMPA

R-KA	Receptor glutamatérgico para Kainato
R-NMDA	Receptor glutamatérgico para NMDA
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
V	Ventral
VLD	Ventrículo Lateral Derecho

RESUMEN

La neurotransmisión excitadora mediada por ácido glutámico (Glu) participa en diferentes procesos de plasticidad neuronal. Sin embargo, cuando la concentración extracelular de Glu se eleva excesivamente, los receptores glutamatérgicos se sobre-activan, la concentración citosólica de Ca^{++} se incrementa y se produce la muerte neuronal excitotóxica. Padecimientos como el trauma cráneo-encefálico y la hipoxia-isquemia cerebral generan un proceso excitotóxico después del cual, el umbral convulsivo disminuye y la probabilidad de presentar crisis convulsivas aumenta. La administración sistémica de glutamato monosódico (GMS) a animales recién nacidos es un modelo de excitotoxicidad ampliamente utilizado. Así, en el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad convulsiva después de la administración sistémica de GMS a animales recién nacidos. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar. El GMS se administró vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 de edad. Entre los 60 y 70 días de edad posnatal, los animales se sometieron a una cirugía estereotóxica para la implantación de 1 guía de infusión y 4 electrodos monopolares. Tres horas después de la cirugía, se infundió el convulsionante 4-Aminopiridina (4-AP) y se registró la actividad electroencefalográfica. Las dosis evaluadas del convulsionante fueron: 1, 2, 3, 4 y 5 nmol/5 μ l/5min. El tratamiento con GMS redujo la latencia de aparición de las descargas epileptiformes, incremento la duración de las descargas epileptiformes y la severidad de las crisis convulsivas, respecto al grupo intacto. Los resultados indican que el tratamiento con GMS facilita la generación de crisis convulsivas inducidas por 4-AP, debido probablemente a una disminución en la función inhibitoria de la neurotransmisión GABAérgica. En este sentido se ha demostrado que el tratamiento neonatal con GMS modifica la actividad de la enzima sintetizadora del GABA en diferentes regiones cerebrales durante el desarrollo postnatal de la rata. El conocimiento sobre estos mecanismos podría mejorar el manejo clínico-farmacológico de las neuropatologías asociadas con la excitotoxicidad, particularmente, para evitar el desarrollo de crisis convulsivas.

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 (39, 56).

Desde un punto de vista estructural o anatómico, el sistema nervioso se divide en: Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal, mientras que el SNP comprende los nervios, ganglios y receptores especializados (39). Las funciones del SNC están dadas principalmente por las propiedades de excitabilidad de las células nerviosas o neuronas (36).

Las neuronas, igual que todas las células, poseen una membrana citoplasmática selectivamente permeable a iones, los cuales pueden ser transportados activamente, a través de bombas iónicas o de manera pasiva, a través de canales que se abren por voltaje o ligando (4). Las bombas iónicas crean y mantienen el potencial de membrana, el prerrequisito para la excitación celular (39); mientras que las corrientes iónicas fluyendo a través de los canales producen cambios en el estado de excitación (4). El potencial de membrana neuronal se encuentra altamente polarizado, sin embargo, cuando la neurona recibe las señales sinápticas adecuadas, ya sea a nivel

del soma o las dendritas, puede generar un potencial de acción, el cual se propaga desde la base del axón hacia la terminal sináptica para favorecer la liberación de neurotransmisores ⁽³⁹⁾. Las conductancias iónicas de Na^+ y Ca^{++} activadas por voltaje favorecen la generación y propagación de potenciales acción; y la propagación de potenciales sinápticos excitadores, respectivamente ⁽³⁵⁾. Por el contrario, las conductancias de K^+ activadas por voltaje o activadas por calcio detienen la propagación de los potenciales de acción, repolarizan las neuronas hasta la hiperpolarización ⁽¹⁷⁾.

A partir de los cambios en el potencial de membrana, se desencadenan señales que trascienden a neurona y que promueven el establecimiento de la comunicación interneuronal, mejor conocida como sinapsis y de la que en términos generales, se distinguen dos tipos: eléctrica y química. En el primer caso, se habla de una comunicación entre neuronas mediada por corrientes iónicas, en donde la conducción del impulso nervioso y, por lo tanto, de la excitabilidad es casi instantánea. Las sinapsis eléctricas se llevan a cabo a través de uniones comunicantes o *nexus* que conectan el contenido citoplasmático de las neuronas y transmiten el impulso en sentido bidireccional. En el segundo caso, la comunicación depende de una señal química, a través de una sustancia conocida como neurotransmisor, que se libera de la terminal presináptica, difunde a través del espacio intersináptico e interactúa con receptores de la célula postsináptica modificando su función ⁽³⁹⁾.

Actualmente se conocen más de 50 sustancias que actúan como neurotransmisores, que de acuerdo a su estructura se clasifican en: aminas biogénicas, aminoácidos, nucleótidos o nucleósidos y numerosos neuropéptidos ⁽³⁹⁾. La gran mayoría de la comunicación entre las neuronas del SNC se realiza por neurotransmisores aminoácidos, de todos ellos, los más abundantes y fisiológicamente más importantes, son el ácido glutámico y el ácido γ -aminobutírico.

Neurotransmisión GABAérgica

Dentro del SNC de mamíferos, el ácido γ -amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio, está presente en altas concentraciones y se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones cerebrales, localizado principalmente en interneuronas de axones cortos ⁽⁸¹⁾. Durante el desarrollo, el GABA puede influenciar el crecimiento de las neuritas, la ramificación dendrítica, la formación de sinapsis y la división celular ^(83, 85). El resto de la vida, el GABA es responsable de mantener el tono inhibitorio que conserva el equilibrio funcional con la neurotransmisión excitadora ⁽⁸¹⁾.

El GABA se sintetiza dentro de las neuronas GABAérgicas, a partir del ácido glutámico (Glu) mediante la intervención específica de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), enzima que es dependiente de fosfato de piridoxal (PP) ^(71, 82). La actividad de la GAD es, por tanto el mejor indicador de la presencia de GABA en el tejido neuronal ⁽⁸¹⁾. La biosíntesis de GABA

se inicia desde el ácido α -cetoglutárico, que por acción de una aminotransferasa se transforma en Glu, posteriormente, la GAD en presencia del cofactor PP, remueve el grupo carboxilo del Glu para producir GABA y CO_2 libre ^(4, 71, 82). El GABA también puede ser sintetizado por otras vías, a partir de ornitina o putresina ^(56, 81). Después de la síntesis, el GABA se almacena en vesículas sinápticas, hasta que un estímulo adecuado genera la despolarización de la membrana presináptica y produce la liberación del GABA hacia la hendidura sináptica ⁽⁸¹⁾. La mayor parte del GABA, se libera a través de la exocitosis de vesículas sinápticas mediante un proceso que implica la entrada de Ca^{++} a la terminal nerviosa ⁽³⁸⁾. Otra parte del GABA puede liberarse por medio de la activación inversa de los transportadores de GABA de manera dependiente de la concentración extracelular de Na^+ ⁽⁵⁶⁾. La acumulación de GABA en la hendidura sináptica garantiza la activación de los receptores GABAérgicos, sin embargo, la concentración extracelular alcanzada por el neurotransmisor también promueve la activación de transportadores para GABA, que preferentemente lo transportan hacia el astrocito ^(56, 81, 82), donde por acción de la transaminasa del GABA (GABA-T) se forma Glu, que posteriormente por acción de la glutamina sintetasa se transforma en glutamina (Gln), la cual finalmente se transporta a la neurona presináptica donde puede utilizarse nuevamente para la síntesis de GABA (Figura 1) ^(39, 56).

El GABA ejerce su efecto inhibitor a través de dos tipos de receptores bien caracterizados: el GABA_A y el GABA_B. Sin embargo, se ha reportado la existencia de un tercer tipo de receptor, el GABA_C, del cual se desconoce con certeza su actividad fisiológica ^(4, 17, 21, 81). El receptor GABA_A es postsináptico y tiene una estructura pentamérica compleja, que incluye un sitio de reconocimiento para GABA, un sitio sensible a benzodiazepinas y un canal iónico para cloro (Cl⁻), así como un sitio de enlace para la proteína GABA-modulina, entre sus estructuras principales ^(28, 78). La GABA-modulina bloquea el sitio de reconocimiento a GABA y a benzodiazepinas evitando la activación del receptor; cuando esta proteína deja de actuar, la activación de ambos sitios se complementa, se abre el canal y el Cl⁻ entra a la neurona ^(28, 81). El receptor GABA_A se considera el principal mediador de la acción inhibitora de GABA y al bloquearse pueden inducirse crisis convulsivas rápidamente, tal y como sucede en presencia de bicuculina y picrotoxina, antagonistas que actuando por mecanismos diferentes, reducen la corriente de Cl⁻ generada por la activación del receptor GABA_A ^(17, 28, 45). Por otro lado, las benzodiazepinas pueden modular positivamente al receptor GABA_A al elevar la corriente de Cl⁻. El canal iónico asociado al receptor GABA_A es selectivo para aniones (particularmente para Cl⁻) y la selectividad es suministrada por la posición estratégica de aminoácidos cargados positivamente alrededor del canal iónico ⁽³⁹⁾. Muchos agonistas del receptor GABA_A se emplean como anticonvulsivos, antidepresivos e incluso analgésicos ^(4, 17, 60).

Los receptores GABA_B son monoméricos, de baja afinidad y están ligados a la ciclasa de monofosfato de adenosina ^(39, 56). Presinápticamente, la activación de este receptor inhibe la liberación de GABA ^(5, 8); postsinápticamente, modula la excitabilidad mediante la generación de potenciales postsinápticos inhibidores (IPPS) lentos y de larga duración ⁽²⁸⁾; en ambos casos, a través del aumento de la conductancia de K⁺ y la disminución de la conductancia de Ca⁺⁺ ^(8, 60). En base a las investigaciones sobre el GABA y los receptores GABAérgicos, se ha propuesto que la neurotransmisión GABAérgica tiene un papel importante en la modulación de la excitabilidad nerviosa, particularmente en condiciones patológicas asociadas a un exceso de excitación, como en el caso de las crisis epilépticas.

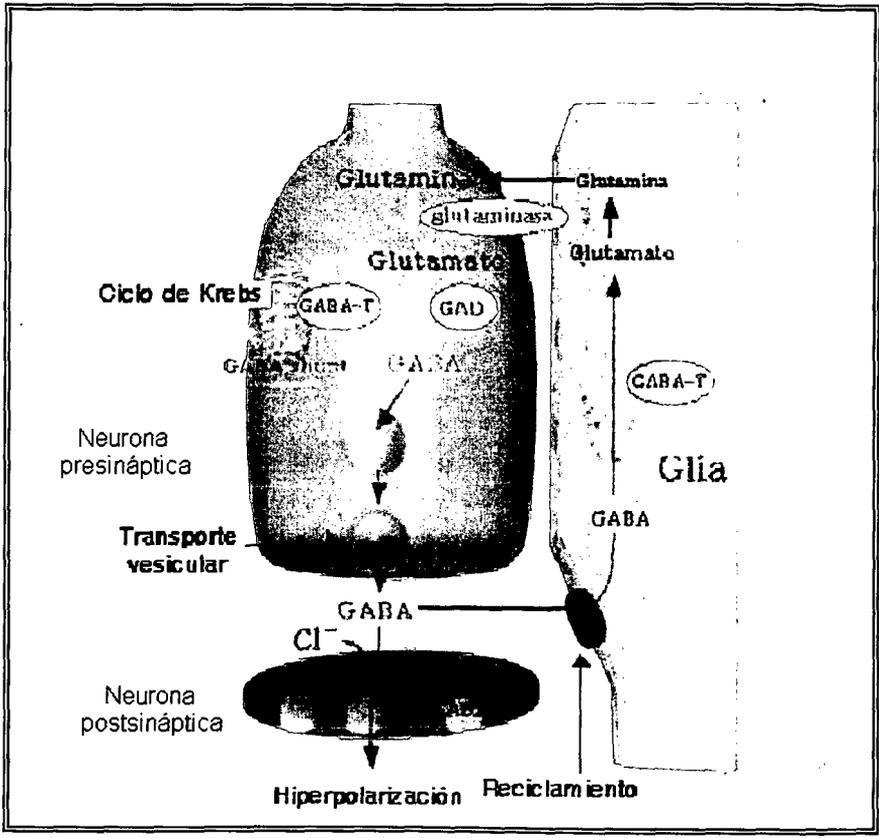


FIGURA 1. Sinapsis GABAérgica. La figura muestra la interacción entre dos neuronas y una célula glial (astrocito). La neurona presináptica sintetiza GABA a partir de Glu, el GABA se libera y difunde hacia el espacio intersináptico, donde interactúa con receptores GABA_A postsinápticos o se transporta hacia el astrocito para ser degradado. Electronic Textbook of Pharmacology, Osaka, Japón 2004, www.pharma1.med.osaka-u.ac.jp.

Neurotransmisión Glutamatérgica

Dentro del SNC de mamíferos, el ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitador ^(39, 65), de amplia distribución, se encuentra involucrado en procesos tan diversos como la epilepsia, las lesiones cerebrales isquémicas, el aprendizaje y el establecimiento de conexiones sinápticas ^(1, 20, 31, 65). Las concentraciones más elevadas de Glu se localizan en los circuitos: córtico-talámico y córtico-estriatal, así como en las interconexiones del sistema límbico (hipocampo, séptum, amígdala y núcleos mamilares) ^(39, 49). Además, recientemente se ha sugerido que el Glu puede regular el transporte capilar cerebral y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica ⁽⁷⁹⁾.

El Glu es un aminoácido no esencial, que debido a su polaridad no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que no accede al cerebro mediante la circulación ⁽⁴⁸⁾. En lugar de esto, el Glu puede sintetizarse a través de numerosas reacciones metabólicas, tales como: 1) la transaminación del α -cetoglutarato; 2) la degradación de la Gln por acción de la enzima glutaminasa; 3) la síntesis de Glu por acción reversa de la deshidrogenasa del Glu, a partir de α -cetoglutarato; y 4) a partir de ornitina por acción de la aminotransferasa de ornitina ⁽³⁹⁾.

La síntesis y el metabolismo de Glu dependen de forma significativa de las interacciones entre terminales nerviosas y las células gliales del tipo de los

astrocitos ⁽³⁹⁾. Las vesículas sinápticas acumulan Glu de forma activa, a través de un transporte dependiente de ATP y Mg^{++} ⁽⁵⁶⁾. La liberación de este neurotransmisor es dependiente de calcio y su inactivación se produce principalmente por captura dependiente de sodio ⁽²⁸⁾. Así, el Glu liberado como neurotransmisor se transporta hacia el astrocito, donde con intervención de la sintetasa de glutamina, se forma Gln que difunde a través de las membranas para llegar a la neurona donde se utiliza para generar Glu por acción de la glutaminasa (Figura 2) ^(4, 39).

La excitación neuronal que produce el Glu depende de la activación de tres tipos de receptores ionotrópicos selectivos para: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (R-AMPA), ácido kainico (R-KA) y N-metil-D-aspartato (R-NMDA), todos localizados principalmente en las espinas dendríticas ⁽⁵¹⁾. En estos receptores los sitios de enlace de los agonistas y el canal iónico se encuentran dentro del mismo complejo macromolecular ^(10, 39, 51). Los canales formados por R-AMPA y R-KA son permeables a Na^+/K^+ , favorecen la despolarización rápida de la célula nerviosa ^(51, 57) e intervienen en la diferenciación neuronal, maduración y formación laminar ⁽¹⁹⁾. Los R-NMDA son dependientes de voltaje, poseen una permeabilidad elevada para Ca^{++} y cuenta con múltiples sitios de regulación farmacológica, además de presentar un sitio sensible a cambios de óxido-reducción ^(9, 51). Los R-NMDA son abundantes en la corteza cerebral y el hipocampo ^(9, 11); y su activación se manifiesta generando corrientes excitadoras postsinápticas lentas. La activación del R-NMDA es dependiente de glicina y de la eliminación, a

través de voltaje, del bloqueo que ejerce el Mg^{++} sobre el canal, bajo concentraciones fisiológicas básicas ⁽⁵¹⁾.

Por otro lado, también existen receptores metabotrópicos para Glu, que son estructuras monoméricas, que reciben este nombre por estar vinculados a proteínas G, que promueven la activación de la fosfolipasa C o la inhibición de la ciclasa de monofosfato de adenosina ^(51, 69). Estos receptores ejercen efectos moduladores, tanto sobre la transmisión sináptica excitadora como inhibidora ⁽⁶⁹⁾.

La liberación de Glu y la activación de los receptores glutamatérgicos tienen un papel crítico en el funcionamiento cerebral, sin embargo la implicación de este aminoácido en el inicio y mantenimiento de las crisis epilépticas, así como en desencadenamiento de procesos neurodegenerativos en situaciones donde la concentración extracelular de Glu se eleva excesivamente, son cuestiones de controversia que requieren estudiarse mejor.

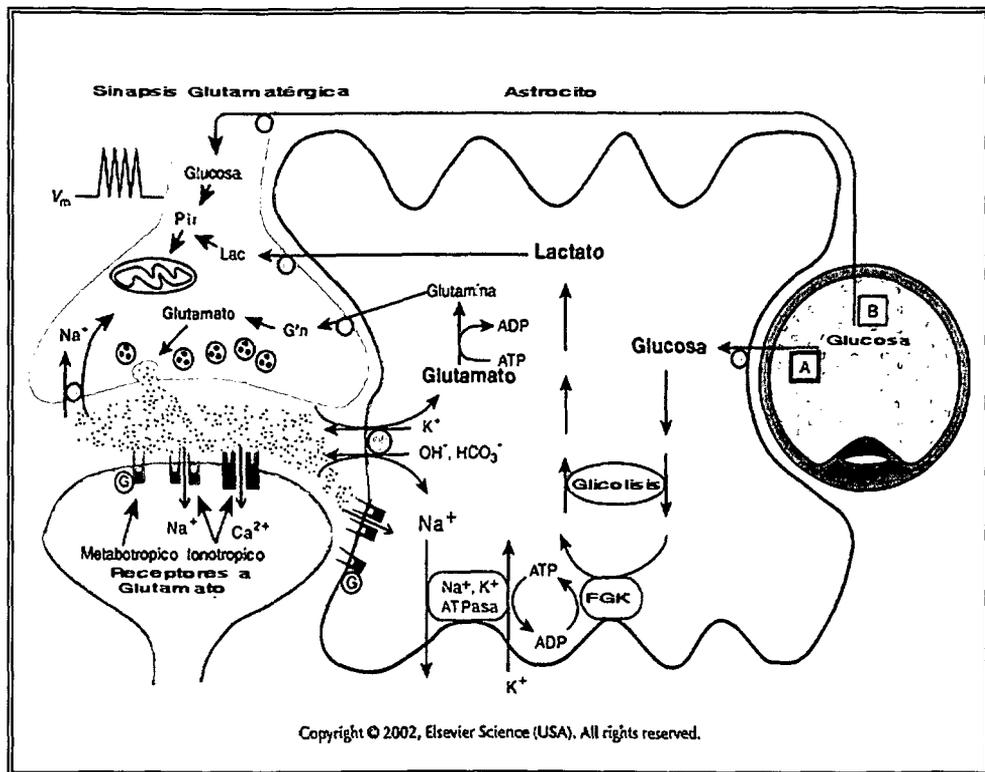


FIGURA 2. Sinapsis Glutamatérgica. La figura muestra las diferentes vías de síntesis del Glu, su transporte hacia vesículas sinápticas y la fusión de éstas sobre la membrana de la célula presináptica para producir la liberación de Glu, el cual puede interactuar con sus receptores para ejercer su efecto o transportarse hacia los astrocitos circundantes. Pir: Piruvato; Lac: Lactato; FGK: Cinasa de glicerol termoestable. Copyright 2002, Elsevier Science (USA), www.elsevier.us

Epilepsia

La epilepsia afecta actualmente a más del 1% de la población mundial (13. 74), se considera un síndrome cerebral crónico, caracterizado por la recurrencia episódica de descargas anormales sincrónicas, asociadas con anomalías en la organización neuronal y en las señales que la modulan (27), así como, con la estimulación excesiva de circuitos neuronales; con posibles manifestaciones motoras, sensoriales, autónomas y/o psíquicas (36. 38. 56).

Las manifestaciones de la epilepsia se asocian con alteraciones cerebrales, provocadas por trastornos durante el desarrollo, lesiones neoplásicas, vasculares, traumáticas, virales, bacterianas, parasitarias, degenerativas y/o anóxicas, que generalmente se asocian con daño neuronal, gliosis y degeneración dendrítica (35. 36).

En la epilepsia están involucrados múltiples sistemas de neurotransmisión, sin embargo, existen dos eventos importantes que pueden ser los iniciadores del fenómeno convulsivo: la excitabilidad celular, que se refiere a los procesos que regulan la despolarización y la repolarización de la membrana, y el desarrollo aberrante de circuitos de integración neuronal, que promueven la sincronización de las poblaciones neuronales y la propagación de las descargas epilépticas (22).

La manifestación de la excitación excesiva, que se genera a partir del desequilibrio iónico intraneuronal y/o del disparo repetitivo en un grupo de

neuronas que estimulan un circuito neuronal, determinan el origen y patrón de propagación de las descargas epilépticas ⁽²⁾, cada uno de estos eventos es una alteración que surge de manera súbita y transitoria y que visto individualmente, se denomina crisis epiléptica ⁽²⁷⁾. Las descargas que se originan pueden evaluarse a través de un registro electroencefalográfico (EEG) ⁽⁵⁶⁾, como representación de los potenciales eléctricos que se generan en poblaciones neuronales ⁽²⁸⁾ en las que se presentan cambios súbitos en la frecuencia y amplitud de las descargas eléctricas, a los que se denominan paroxismos, que pueden ser fisiológicos o patológicos ^(38. 56). Por lo tanto se puede decir que la despolarización, la hiperpolarización y las descargas neuronales excesivas e hipsincrónicas inicialmente localizadas (foco epiléptico) constituyen la esencia de la actividad epiléptica ^(36. 75).

Un aspecto importante en el daño epiléptico es la afectación selectiva de subpoblaciones neuronales ⁽²⁸⁾, la mayoría de las crisis epilépticas se producen por las descargas generadas en estructuras corticales o hipocampales ⁽¹⁰⁾, por lo que comúnmente en el estudio de la epilepsia, se llevan a cabo registros EEG en estas regiones.

De acuerdo a sus manifestaciones clínicas y electroencefalográficas, las crisis epilépticas se han dividido en dos grupos principales:

- I.- Parciales (focales); y
- II.- Generalizadas.

Las crisis parciales o focales se deben a la activación de un grupo neuronal limitado de manera anatómica y funcional, donde los signos clínicos y eléctricos se circunscriben a una zona restringida del cerebro. Por otro lado, las crisis generalizadas tienen un inicio localizado y se propagan por toda la superficie cortical ⁽²²⁾.

GABA y Glu en la epilepsia

Existe un importante vínculo entre el desequilibrio de los mecanismos sinápticos excitadores e inhibidores, la alteración de las propiedades intrínsecas neuronales y la epilepsia ^(17, 66). Entre los mecanismos intrínsecos de las neuronas implicados en la génesis de la excitabilidad podemos mencionar: cambios en la conductancia de canales iónicos, alteraciones en las respuestas características de los receptores de membrana, cambios en los sistemas de segundos mensajeros y en la expresión de proteínas ^(4, 42).

A favor de la propuesta del desequilibrio entre los sistemas de neurotransmisión excitadora e inhibidora, como un posible promotor de la epilepsia, se cuenta con las siguientes observaciones: la pérdida de neuronas GABAérgicas y los receptores GABA_A provocada experimentalmente ⁽³⁴⁾, genética o adquirida ⁽³⁷⁾, coincide con el desarrollo de crisis convulsivas; al bloquear, alterar o inhibir la actividad de la GAD o de los receptores GABAérgicos, es posible desencadenar crisis convulsivas ^(28, 45); por el contrario, el aumento de la función del GABA en el cerebro restaura la inhibición neuronal, atenúa el daño neuronal inducido por el

status epilepticus y retrasa el desarrollo de "kindling" ⁽³⁴⁾. Por otro lado, la estimulación eléctrica excesiva de las vías glutamatérgicas o la manipulación farmacológica que conduce a la activación de los receptores glutamatérgicos pueden generar crisis epilépticas ^(43, 72, 84); e inversamente, desde la perspectiva terapéutica, diversos antagonistas del receptor para NMDA pueden reducir la intensidad y la duración de la actividad de las crisis ^(7, 55, 81). Además, las drogas que aumentan la concentración de GABA en la hendidura sináptica, al inhibir su catabolismo o recaptura, poseen un efecto anticonvulsivante eficiente ^(34, 70, 81).

Estos resultados apoyan la propuesta de que, el desbalance entre los impulsos nerviosos excitadores Glutamatérgicos e inhibidores GABAérgicos pueden ser considerados como un factor importante en la generación de las crisis convulsivas. Sin embargo, la epilepsia como síndrome involucra también a otros sistemas de neurotransmisión.

Modelos experimentales de epilepsia

La mayor parte del conocimiento acerca de los mecanismos celulares y moleculares de los eventos epileptiformes específicos, así como de la terapia farmacológica con anticonvulsionantes proviene del uso de modelos experimentales de epilepsia ^(22, 38).

Los modelos experimentales tratan de reproducir cuadros clínicos bien conocidos para poder determinar factores que desencadenan las crisis

epilépticas y utilizarlos como dianas para su tratamiento ^(4, 22). Específicamente, los modelos experimentales estudian los mecanismos básicos a través de los cuales se origina el foco epiléptico: la actividad interictal; la distribución y sincronización de la actividad epiléptica; y la producción de focos epilépticos secundarios ⁽³²⁾.

Durante años se han propuesto diferentes sistemas de clasificación de las epilepsias, sin embargo, sólo recientemente, a través de la aplicación del registro EEG; los estudios de imagenología y la genética molecular, se ha logrado un mejor entendimiento y clasificación de las mismas ⁽²²⁾. Así, las epilepsias experimentales pueden clasificarse de acuerdo a tres criterios generales: 1) dependiendo de la propagación de las crisis: epilepsia generalizada y epilepsia parcial; 2) en función de la duración: crisis agudas y crónicas; y 3) desde el punto de vista electrofisiológico: modelos celulares y modelos sistémicos (Cuadro 1) ^(32, 36).

Los modelos de crisis agudas han sido muy productivos, ya que han generado la mayor parte del conocimiento actual sobre los mecanismos básicos de la actividad epiléptica ⁽²²⁾, en estos modelos se utilizan fármacos como la picrotoxina (antagonista GABA_A no competitivo), la bicuculina (antagonista GABA_A competitivo) y la 4-aminipiridina (4-AP) ⁽⁵⁶⁾, que se aplican a cerebros normales y, en un sentido estricto, más que modelos de epilepsia son modelos de inducción de crisis epileptiformes ⁽⁴⁾.

CUADRO 1. Modelos experimentales de epilepsia.

MODELO AGUDO PARCIAL

Por convulsivantes típicos:

Penicilina
Bicuculina
Picrotoxina
Estricnina
Agentes colinérgicos
Agentes anti-colinérgicos
En rodajas de neocorteza

Por estimulación eléctrica

Aguda

MODELO CRÓNICO PARCIALES

Implantes metálicos corticales
Hidróxido de aluminio
Cobalto
Tungsteno
Zinc Hierro

Lesiones por congelación

MODELO TONICO-CLONICO

Generalizado

Genéticos

Crisis audiógenas en ratones
Fotosensibles en mandril
Audiógenas
Electroshock

Por convulsivantes químicos

Pentilentetrazol
Picrotoxina
Bicuculina
4-AP
Penicilina
Otros

Por desórdenes metabólicos

Hipoxia
Hipoglucemia
Oxígeno hiperbárico
Hipercapnia
Uremia
Hipertermia

MODELO PARCIALCOMPLEJO

Ácido kainico
Toxina tetánica
Inyección en área temporal
"Kindling"
Rodaja de cerebro

Modelo hipocámpico

Células aisladas
Tejido humano Post-quirúrgico

MODELO AUSENCIA GENERALIZADA

Estimulación talámica
Foco cortical bilateral
Opiáceos intraventriculares

MODELO STATUS EPILEPTICUS

Lito-pilocarpina
Cobalto-homocisteina
Estimulación recurrente

Modificado de Granillo R. (2002)

4-Aminopiridina

La administración intraperitoneal ^(7, 24) o intracerebral ^(53-56, 64, 65) de 4-AP se ha utilizado ampliamente como modelo para la inducción de crisis epileptiformes en diferentes especies animales ⁽³⁰⁾. La 4-AP produce crisis electroencefalográficas intensas ^(7, 23, 24, 49, 66) y alteraciones motoras que inician con una etapa de hiperexcitabilidad (erección del pelo, movimiento vibrisas, hiperventilación), seguida por automatismos motores propios de las crisis límbicas (cabeceo, movimientos masticatorios, clonos de las extremidades delanteras, extensiones de las extremidades traseras, carreras alocadas y convulsiones clónicas) que pueden evolucionar hacia convulsiones tónico clónicas generalizadas (CTCG) o permanecer por periodos largos hasta establecerse el *status epilepticus* ^(54, 55, 65), el cual se asocia con el desencadenamiento de procesos neurodegenerativos ^(64, 80). Además, las propiedades convulsivas de esta droga, también se han documentado clínicamente en humanos, donde las propiedades excitadoras de la 4-AP pueden emplearse terapéuticamente en trastornos neurológicos, como la miastenia *gravis*, el síndrome de Lambert-Eaton, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer ⁽²³⁾.

Diversos estudios han demostrado que el efecto convulsivo de la 4-AP se relaciona con la liberación masiva de neurotransmisores ^(49, 53, 56, 65, 78), independiente de la sustancia mediadora, el tipo de sinapsis o la especie. La 4-AP bloquea los canales de K⁺ activados por voltaje en una gran variedad de células, incluyendo a las neuronas, en las que a nivel de la membrana

bloquea las corrientes transitoria y de inactivación lenta de potasio: condición que puede: prolongar la duración de los potenciales de acción, retrasar el cierre de los canales iónicos para Ca^{++} , disminuir el umbral de excitación, elevar la frecuencia de disparo neuronal y promover la liberación de neurotransmisores ^(49, 54, 64, 80). En este sentido, a pesar del efecto masivo de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores, estudios de microdiálisis *in vivo* en el estriado ⁽⁵³⁾ y en el circuito corteza entorrinal-hipocampo ^(49, 56), así como *in vitro* en sinaptosomas estriatales ⁽²⁹⁾, sugieren un aumento significativo de los niveles extracelulares de Glu, por encima de otros neurotransmisores, lo cual se ha asociado con la intensa actividad convulsiva generada por esta sustancia ^(64, 65). Además, el exceso de Glu liberado por acción de la 4-AP en hipocampo produce degeneración en las áreas CA1, CA3 y CA4, debido probablemente a la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos ^(49, 65, 80).

A diferencia de otros convulsionantes, la 4-AP incrementa la excitabilidad neuronal tanto en condiciones basales como cuando la actividad sináptica está elevada ^(6, 66), por lo que la 4-AP puede utilizarse para estudiar los mecanismos fisiológicos involucrados en la generación de crisis convulsivas tanto en situaciones donde la inhibición sináptica está conservada como cuando se encuentra alterada.

ANTECEDENTES

Daño Neuronal Excitotóxico

En 1957, Lucas y Newhouse, observaron que las inyecciones de L-Glu producían degeneración aguda en las láminas internas de la retina de ratón, por lo que sugirieron un posible efecto neurotóxico del Glu ⁽⁶¹⁾. Por otro lado, Olney que también estudió la retinotoxicidad producida por Glu, observó además, que estaba acompañada por inflamación celular ^(3, 61). Estos resultados condujeron a Olney a proponer la hipótesis de la excitotoxicidad, término que acuñó en 1969 para referirse a la degeneración neuronal producida por aminoácidos excitadores ^(61, 77). Aproximadamente una década después, Olney reportó que la administración sistémica de KA, un compuesto estructuralmente relacionado al Glu, producía lesiones cerebrales en animales jóvenes, donde la permeabilidad de la barrera hematoencefálica es mayor que en los adultos ⁽³⁾. Posteriormente, diversos estudios demostraron que durante la exposición del tejido nervioso a concentraciones elevadas de Glu o de algún aminoácido excitador, producían muerte celular y degeneración del tejido nervioso ^(3, 65, 77).

Después de los estudios iniciales sobre excitotoxicidad, diferentes aminoácidos excitadores o sus análogos se han utilizado experimentalmente como modelos para la inducción de daño neuronal, convirtiéndose en herramientas eficaces en el estudio de diversos padecimientos neurológicos

tales como: la enfermedad de Huntington, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la neurodegeneración hipoxi-isquémica, la epilepsia y el trauma cráneo-encefálico ^(82, 86). Así, diversos estudios, realizados tanto *in vivo* ⁽³⁾ como *in vitro* ⁽⁵⁹⁾ o en tejidos *post mortem* ⁽¹⁹⁾, demuestran que diferentes mecanismos de inducción de daño neuronal producen elevación de las concentraciones extracelulares de glutamato y aspartato ⁽³⁾, alcanzando niveles comparables a aquellos que se observan en pacientes con algún padecimiento neurológico ⁽⁸⁰⁾. En este sentido, se ha establecido una relación estrecha entre la magnitud del daño neuronal y la elevación de los niveles extracelulares de Glu, por lo que se ha propuesto al Glu como un componente crítico en la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal ⁽⁵⁸⁾.

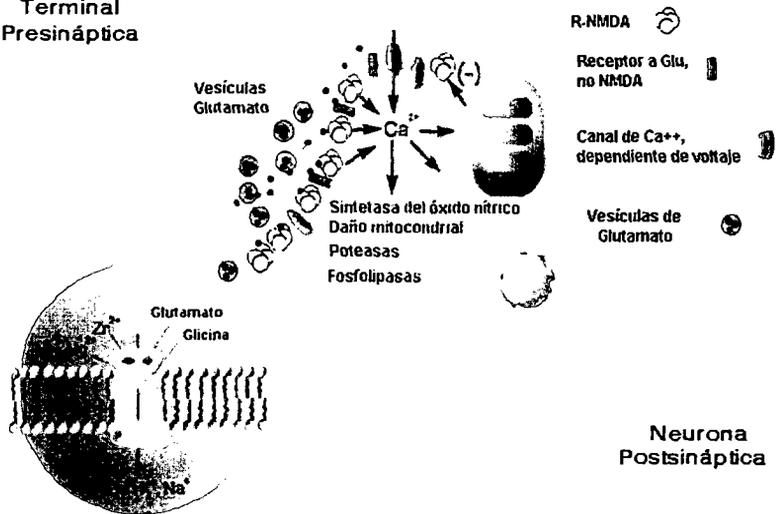
A este respecto se ha observado que, el daño neuronal excitotóxico se relaciona con la habilidad del Glu y sus análogos para despolarizar a las neuronas, excitándolas en numerosas ocasiones, hasta producir la muerte de las mismas ⁽⁶⁷⁾. La liberación de Glu en exceso, genera una serie de respuestas postsinápticas a partir de sus receptores, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, que desencadenan el daño neuronal excitotóxico ^(3, 12, 61). Sin embargo, las evidencias experimentales sugieren que son los receptores ionotrópicos y, particularmente el R-NMDA, los que tienen mayor importancia en este proceso ^(26, 61, 77). De esta manera se propone que la sobre-activación de los R-NMDA, genera una entrada masiva de Ca^{++} , que conduce a la sobrecarga o deficiencia de la homeostasis de Ca^{++} ^(26, 42, 71).

Este aumento excesivo en la concentración citosólica de Ca^{++} promueve la activación de kinasas, caspasas, proteasas, sintetasas del óxido nítrico, calcineurinas y endonucleasas que conforman la cascada de eventos excitotóxicos, condiciones que promueven la producción de radicales libres como óxido nítrico (NO), superóxido y peróxido de hidrógeno que desestabilizan tanto a las membranas celulares como al citoesqueleto ^(20, 51, 58). Aunado a esto, existen consecuencias bioenergéticas que conducen a la inevitable disfunción mitocondrial (Figura 3) ^(20, 51, 58, 77). Además, evaluaciones *in vitro* sobre el flujo iónico durante la excitotoxicidad, sugieren que tiene dos componentes ^(57, 83), el primero, es un componente agudo que depende de Na^+ y Cl^- , el cual está marcado por hinchazón celular inmediata; el segundo, asociado con una degeneración retrasada, que es dependiente de Ca^{++} ⁽³⁾. En este sentido, se ha considerado que la degeneración excitotóxica se produce por necrosis secundaria, sin embargo, estudios posteriores sugieren la presencia de un componente apoptótico retardado ^(20, 28, 74). Por lo que, los mecanismos implicados en la muerte neuronal excitotóxica permanecen como motivo de controversia.

Por otro lado, en el estudio de la excitotoxicidad debe considerarse además, el origen del aumento de la concentración extracelular del Glu ^(59, 64), ya que bajo condiciones patológicas, puede producirse por aumento en la exocitosis del neurotransmisor, o bien, a través de sistemas de recaptura deficientes ⁽⁵⁸⁾.

Además, evidencias experimentales en las que se establece un importante vínculo entre la excitotoxicidad y la muerte neuronal en diferentes padecimientos neurológicos ⁽²⁵⁾, sugieren alteraciones en varios sistemas de neurotransmisión, dando especial importancia a los cambios que ocurren en el sistema GABAérgico, cuya funcionalidad se encuentra disminuida y por lo tanto, imposibilitado para modular el exceso de excitación ^(43. 83). Estas condiciones, permiten proponer que el daño neuronal excitotóxico podría generar una disminución del umbral convulsivo y por lo tanto un aumento en la probabilidad de presentar crisis convulsivas.

Terminal Presináptica



Cell Death Differ., by P. Nicotera and M. Leist

FIGURA 3. Efecto de la liberación excesiva de Glu. La figura muestra la entrada masiva de calcio a la célula postsináptica a través de receptores glutamatérgicos. La pérdida de la homeostasis de Ca²⁺ genera una cascada de eventos que promueven la muerte celular. Se representa al R-NMDA por su relevancia en la excitotoxicidad, debido a la apertura prolongada de sus canales para calcio. Cell Death Differ., Nicotera y Leist, University of Konstana, Germany. www.celldeath-apoptosis.org/educatio.htm.

Modelo de excitotoxicidad por GMS

El término excitotoxicidad se refiere a la capacidad que tiene un neurotransmisor excitador de producir la muerte neuronal ^(2, 3, 59, 64). De acuerdo con este planteamiento, se han utilizado análogos estructurales del Glu, como el KA, el ácido iboténico, el NMDA, el ácido quisquálico ⁽⁸⁶⁾ y la sal monosódica de Glu (GMS) como agentes excitotóxicos ⁽⁵⁰⁾.

La administración sistémica GMS, constituye un modelo ampliamente utilizado para inducir daño neuronal excitotóxico ^(50, 86). Así, se conoce que el tratamiento neonatal con GMS promueve la degeneración neuronal en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo, regiones consideradas como epileptogénicas ^(6, 9-12, 83) y que bajo condiciones basales poseen una gran cantidad de neuronas GABAérgicas ⁽⁸³⁾, expresan receptores glutamatérgicos ^(9, 83), presentan aferencias glutamatérgicas abundantes ⁽⁶²⁾ y captura de [³H]-Glu elevada ^(12, 82). Además, el tratamiento neonatal con GMS también produce degeneración en el hipotálamo y áreas circunventriculares, generando alteraciones metabólicas y susceptibilidad de la barrera hematoencefálica al estrés en el adulto, lo que sugiere que los efectos neurotóxicos del GMS administrado a neonatos pueden ser persistentes ⁽⁷⁹⁾.

Los efectos tóxicos del GMS no son exclusivos para un sistema de neurotransmisión particular. Así, el GMS modifica la neurotransmisión colinérgica, a través de disminuir la actividad de la enzima colina acetil-

transferasa y la densidad de receptores colinérgicos en la corteza cerebral ⁽⁶²⁾. Además, a través de estudios inmunocitoquímicos dirigidos contra la enzima tirosina hidroxilasa se ha demostrado una disminución en la densidad de neuronas dopaminérgicas en el núcleo arcuato de la rata como reflejo de los efectos neurotóxicos del GMS ^(15, 42).

Es importante considerar que el daño producido por GMS depende de especie, cepa, género, dosis, áreas cerebrales y edades evaluadas ⁽⁸⁶⁾. En este sentido se sugiere que los animales jóvenes son más susceptibles al GMS, debido a que los mecanismos de recaptura de los aminoácidos aún no son eficaces ⁽⁶²⁾ o por que la barrera hematoencefálica no está completamente establecida o ambos casos ⁽⁷⁹⁾. Algunas de las consecuencias observadas después de la administración neonatal de GMS son: alteraciones endócrinas, metabólicas y conductuales en la edad adulta ^(44, 52), letargo, hiperfagia, automutilación, obesidad, déficit locomotor y de aprendizaje ^(1, 52, 72), entre otros. Además, el daño neuronal producido por el tratamiento neonatal con GMS se relaciona con reactividad glial, a través del aumento en número de astrocitos y células microgliales, así como en la inflamación y edema de células gliales ^(48, 50).

La administración sistémica de GMS (4 mg/g de peso corporal) a roedores recién nacidos durante la primera semana de vida posnatal, es un diseño eficaz para inducir daño neurotóxico ⁽⁹⁻¹²⁾. Bajo ese diseño, los efectos tóxicos del GMS se manifiestan en diferentes regiones cerebrales,

destacando la corteza cerebral y el hipocampo, donde en condiciones basales la densidad de R-NMDA y neuronas GABAérgicas es alta ^(9-12, 15). Así, el tratamiento neonatal GMS aumenta la expresión del RNAm de la subunidad NMDAR-2B en corteza cerebral, hipocampo y estriado ^(9, 11). Además, se demostró recientemente que el tratamiento neonatal con GMS disminuye la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la corteza cerebral ⁽³¹⁾, condición que parece estar mediada por modificaciones en la funcionalidad del R-NMDA. Por otro lado, la liberación de [³H]-GABA ⁽¹²⁾, la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) ⁽⁸³⁾ y densidad de las células GABA-positivas ⁽⁸²⁾ también se modifican después de tratamiento neonatal con GMS. Las alteraciones producidas por el GMS sobre el R-NMDA y la neurotransmisión GABAérgica sugieren un aumento en la hiperexcitabilidad neuronal. Por lo que, el paradigma de la administración sistémica de GMS a ratas recién nacidas se ha considerado un modelo adecuado para abordar el estudio de los aspectos biológicos de la epilepsia.

JUSTIFICACION

La neurotransmisión inhibitoria GABAérgica constituye el principal sistema de control sobre la excitabilidad neuronal. La administración sistémica de GMS produce alteraciones neuroquímicas en la neurotransmisión GABAérgica. Por lo que es posible que después del tratamiento con GMS, la eficiencia del GABA para controlar la excitabilidad neuronal se encuentre disminuida, condición que puede favorecer el desarrollo de crisis convulsivas. Así, en el presente trabajo se pretende emplear la administración intracerebroventricular (ICV) del convulsionante 4-AP como modelo experimental de crisis convulsivas, para evaluar las alteraciones producidas por el tratamiento con GMS sobre la susceptibilidad convulsiva. Los resultados permitirán ampliar el conocimiento sobre las alteraciones neurológicas producidas después de un evento neuroexcitotóxico, así como acerca de los mecanismos involucrados en la generación de crisis convulsivas.

HIPÓTESIS

Las alteraciones que el tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS) produce en regiones cerebrales con características epileptogénicas, elevan la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas después de la administración intracerebroventricular (ICV) de 4-Aminopiridina (4-AP).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas inducidas por la administración ICV de 4-AP en ratas adultas, después del tratamiento neonatal con GMS.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar conductual y electroencefalográficamente las crisis convulsivas inducidas por la administración ICV de 4-AP en ratas adultas.
2. Determinar el efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre las crisis convulsivas inducidas por la administración ICV de 4-AP en ratas adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar que permanecieron en condiciones de bioterio (ciclos luz - oscuridad 12x12, temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 50%), con libre acceso al agua y al alimento durante todo el proceso experimental.

Los animales recién nacidos se dividieron en dos grupos de trabajo:

Grupo I: Animales intactos que no recibieron ningún tratamiento (grupo intacto).

Grupo II: Animales tratados con glutamato monosódico (Sigma Chemical Co. St. Louis MO) a una dosis de 4 mg/g de peso corporal en un volumen de 200 μl vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 de edad (grupo experimental) ⁽¹⁰⁾.

Entre los 60 y 70 días de edad el total de los animales se sometieron a una cirugía estereotáxica. Anestesiados con una mezcla de oxígeno y el anestésico volátil halotano (Fluothane, Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, United Kingdom), los animales se sujetaron a un aparato estereotáxico (ASI, Instruments, Bioanalytical Systems, Inc., IND, U.S.A) con la barra de incisivos posicionada a 3.5 mm con respecto a la línea interaural, se practicó un corte longitudinal sobre la piel y se retiró el periostio hasta

exponer el cráneo. Posteriormente, se perforó el cráneo para la implantación de: 1) una cánula guía de acero inoxidable en el ventrículo lateral derecho (VLD) (22 gauge) (AP-0.7, L-1.4, V-3.5), para la infusión del convulsionante; 2) cuatro cánulas de acero inoxidable (18 gauge) como guías para la implantación de cuatro electrodos monopolares de bronce (0.25 mm de diámetro) en: corteza cerebral motora derecha e izquierda (AP +2, L +/-2, V -1.5); y en hipocampo dorsal derecho e izquierdo (AP -4, L +/-2.5, V -3.3), de acuerdo a las coordenadas del atlas estereotáxico del cerebro de la rata para estas regiones y tomándose como referencia el punto bregma ⁽⁶³⁾; 3) un tornillo de acero inoxidable sobre el seno frontal, al que se soldaron dos alambres de bronce (0.25 mm de diámetro) utilizados como electrodos de referencia; y 4) dos tornillos de acero inoxidable que se colocaron en la parte posterior del cráneo para dar mejor fijación a la estructura. Los electrodos se soldaron a un conector eléctrico que se fijó al cráneo de la rata con acrílico dental. La temperatura corporal se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante el proceso. Tres horas después de la cirugía se inició el registro de la actividad electroencefalográfica (Polígrafo Grass Modelo 79, Quincy, MASS, U.S.A.).

Para la inducción de las crisis convulsivas se infundieron a través del VLD 5 μl de una solución acuosa de 4-Aminopiridina (4-AP) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.), a la cual se le adicionó el colorante azul directo

15 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.), que permitió, al final de cada experimento, identificar el sitio de infusión.

Los registros EEG se digitalizaron a través de una unidad adaptadora (Grass PVA-8A, Quincy, MASS, U.S.A.), transfiriéndose al programa de cómputo Poliview (Versión 2.5, Grass, Quincy, MASS, U.S.A.) para su análisis. Los amplificadores del poligrafo se utilizaron con sensibilidad 50, $\frac{1}{2}$ amp._{lo} 1Hz – $\frac{1}{2}$ amp._{hi} 30Hz, para la corteza cerebral; y con sensibilidad 70, $\frac{1}{2}$ amp._{lo} 1Hz – $\frac{1}{2}$ amp._{hi} 30Hz, para el hipocampo dorsal. Se registraron 10 minutos de actividad basal, seguidos por 5 min durante la infusión del convulsionante 4-AP, y los 60 min siguientes. La 4-AP se infundió a una velocidad de 1 μ l/min en un volumen final de 5 μ l y las dosis utilizadas correspondieron a 1, 2, 3, 4 y 5 nmol/5 μ l. Se utilizaron 6 animales por dosis para cada grupo (ver Diagrama Experimental).

Los parámetros evaluados después de la infusión de 4-AP fueron:

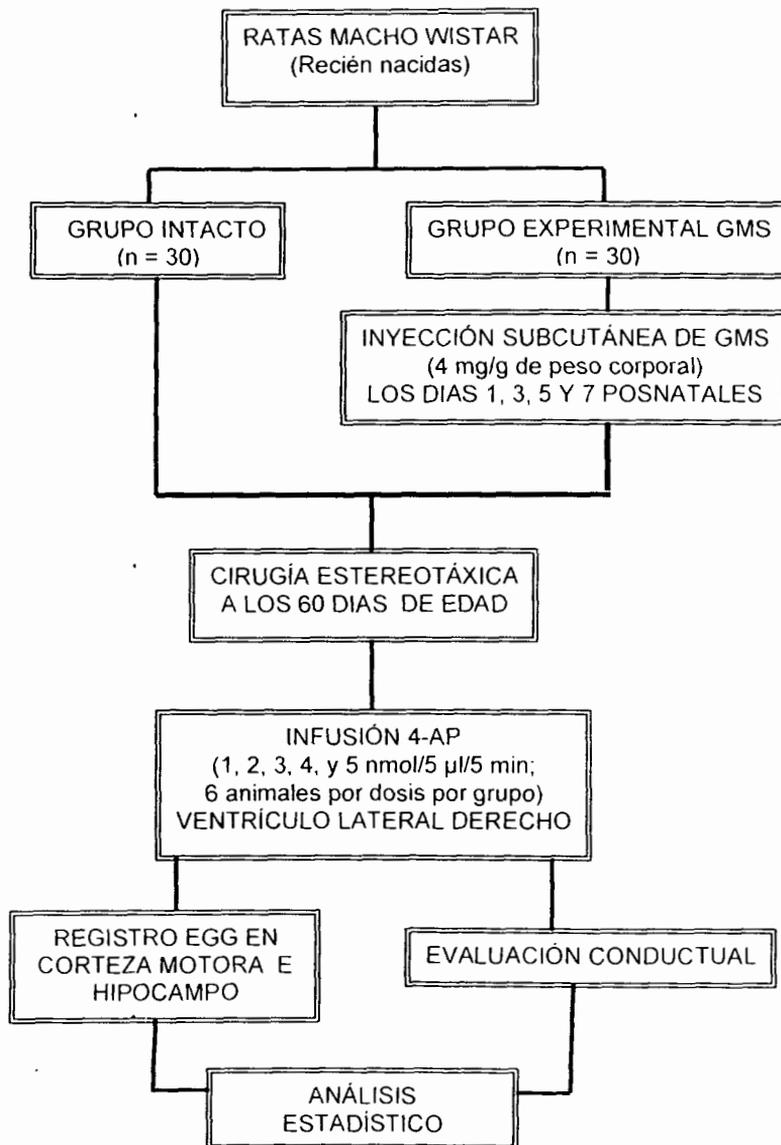
- 1) Latencia del primer tren de descargas epileptiformes, en minutos.
- 2) Características del primer tren de descargas: tipo de ondas EEG, duración y amplitud.
- 3) Prevalencia en porcentaje de animales de las siguientes conductas: mioclonos de la extremidades delanteras, "rearing" (clonos de las extremidades delanteras con levantamiento del cuerpo y caída lateral repentina), "wild running" (carreras alocadas), convulsiones clónicas,

convulsiones tónico clónico generalizadas (CTCG) y *status epilepticus* (SE).

Una hora después de la infusión del convulsionante, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro y se hicieron cortes coronales para la observación de las trayectorias de los electrodos y del sitio de inyección. Además, se verificó la difusión de la solución coloreada de 4-AP a través de los ventrículos cerebrales.

Las diferencias estadísticas se establecieron a través del análisis de varianza (ANOVA) de una vía (prueba de hipótesis de Fisher), con el programa de cómputo Biostat (Versión 1.0, MacGrawHill Inc.), tanto para la latencia, como para la duración y amplitud del primer tren de descargas. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con una $p < 0.05$.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

El patrón de crisis inducido por la administración ICV de 4-AP se caracterizó por una serie de síntomas preconvulsivos que incluyeron: hiperexcitabilidad (erección del pelo, movimiento de vibrisas e hiperventilación), temores, cabeceos y movimientos masticatorios; que presentaron todos los animales en los primeros minutos durante la administración del convulsionante, con todas las dosis utilizadas. Después del primer tren de descargas, los animales presentaron salivación, mioclonos de las extremidades delanteras, rearing, wild running y convulsiones clónicas, en ambos grupos y para todas las dosis. Posteriormente, los animales del grupo intacto presentaron convulsiones tónico-clónico generalizadas (CTCG) y *status epilepticus* (SE) para las dosis de 4 y 5 nmol de 4-AP en el 33% de los animales (Figura 4). En cambio, en el grupo tratado con GMS las crisis convulsivas inducidas por la administración ICV de 4-AP evolucionaron hacia el *status epilepticus* a partir de la dosis de 2 nmol en el 16% de los animales; y hacia la generación de CTCG a partir de la dosis de 3 nmol de 4-AP, también en el 16% de los animales (Figura 4). La prevalencia en porcentaje de animales que presentaron CTCG y SE fue mayor para el grupo tratado con GMS con respecto al intacto (Figura 4).

Además la administración (ICV) de 4-AP indujo descargas epileptiformes de alta frecuencia y amplitud, que se propagaron desde su inicio a las cuatro

regiones registradas, sin embargo fueron de mayor intensidad en el hipocampo derecho, debido probablemente a la cercanía con el sitio de infusión del convulsionante (Figuras 6-15). El primer tren de descargas EEG estuvo representado inicialmente por poli-espigas seguidas por complejos punta-onda hacia el final del tren. La latencia del primer tren de descargas para el grupo intacto fluctuó entre los 6 y 3 minutos a partir del inicio de la infusión del convulsionante, con una tendencia a disminuir conforme aumentó la dosis de 4-AP (1-5 nmol) (Figura 5). El tratamiento neonatal con GMS disminuyó la latencia del primer tren de descargas para todas las dosis de 4-AP, misma que fluctuó entre los 4 y 2 minutos (Figura 5). Por otro lado, la duración y amplitud del primer tren de descargas EEG se incrementaron conforme al aumento de la dosis de 4-AP y alcanzaron valores más altos en el grupo tratado con GMS en comparación con el grupo intacto (Cuadro 2).

La infusión ICV de 4-AP indujo inicialmente una disminución en la actividad EEG basal hasta el momento en que se presentó el primer tren de descargas epileptiformes para todas las dosis y en ambos grupos experimentales. Las dosis de 1 nmol (Figura 6) y 2 nmol (Figura 8) de 4-AP indujeron de 1 a 5 trenes de descargas durante los primeros 15 minutos en el grupo intacto, mientras que en el grupo tratado con GMS estas mismas dosis produjeron de 1 a 10 trenes de descargas que se presentaron durante los primeros 30 minutos (Figuras 7 y 9), excepto en 1/6 animales donde las crisis evolucionaron hasta el SE después de la administración de 2 nmol (Figura 4). La dosis de 3 nmol de 4-AP generó alteraciones en la

actividad EEG durante los primeros 30 minutos en el grupo intacto (Figura 10), en tanto que en los animales tratados con GMS las alteraciones en la actividad EEG permanecieron durante los 60 minutos de registro (Figura 11). Las dosis de 4 nmol y 5 nmol de 4-AP alteraron la actividad EEG durante todo el periodo de registro, tanto en los animales que presentaron el SE como en aquellos en los que las descargas epileptiformes fueron intermitentes (Figuras 12-15).

Los resultados muestran que las crisis convulsivas tanto a nivel de la evaluación conductual como en EEG inducidas por la administración ICV de 4-AP son más severas después del tratamiento neonatal con GMS.

FIGURA 4. Conductas evaluadas después de la administración ICV de 4-AP. La figura muestra el porcentaje de animales que presentó cada conducta después de la infusión del convulsionante. En ambos grupos se observa la tendencia a presentar síntomas más severos conforme la dosis de convulsionante se elevó. En el grupo tratado con GMS las convulsiones tónico clónico generalizadas y el *status epilepticus* se presentaron a dosis menores en comparación con el grupo intacto. El 100% corresponde a la "n" de cada grupo que fue de 6 animales para todas las dosis.

Conductas evaluadas después de la administración ICV de 4-AP

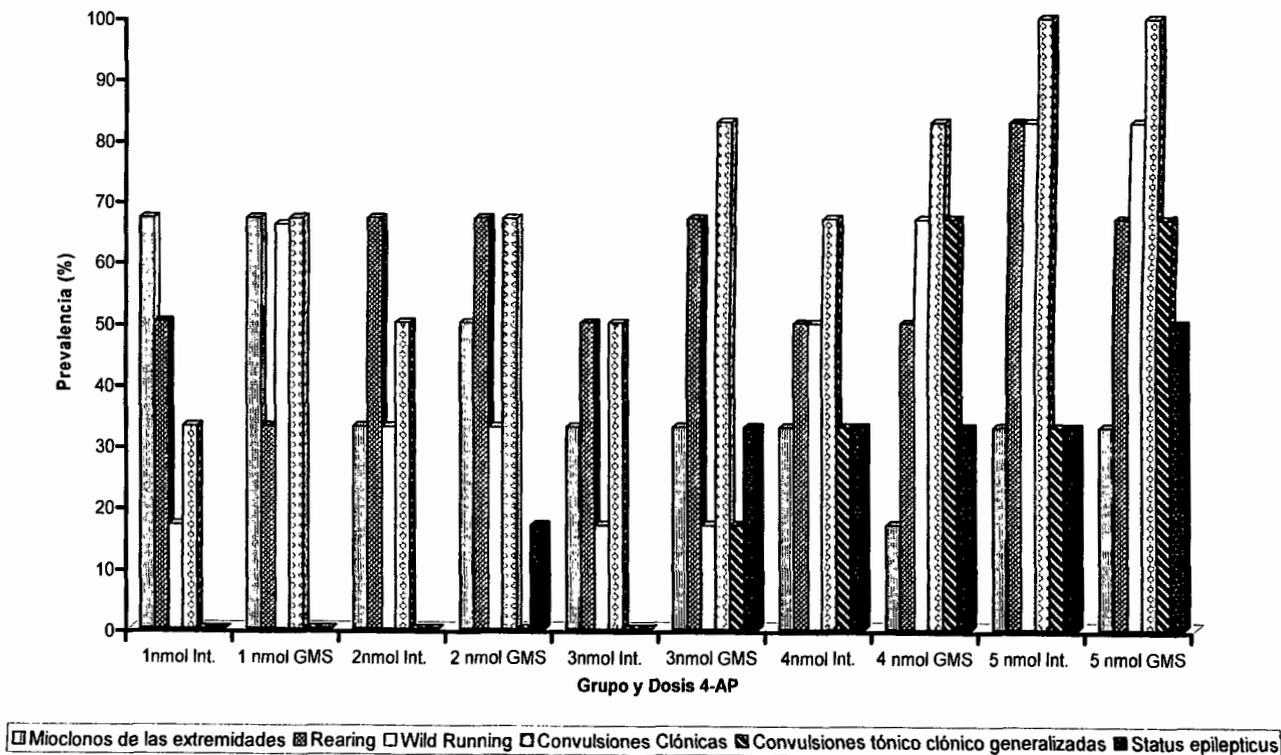
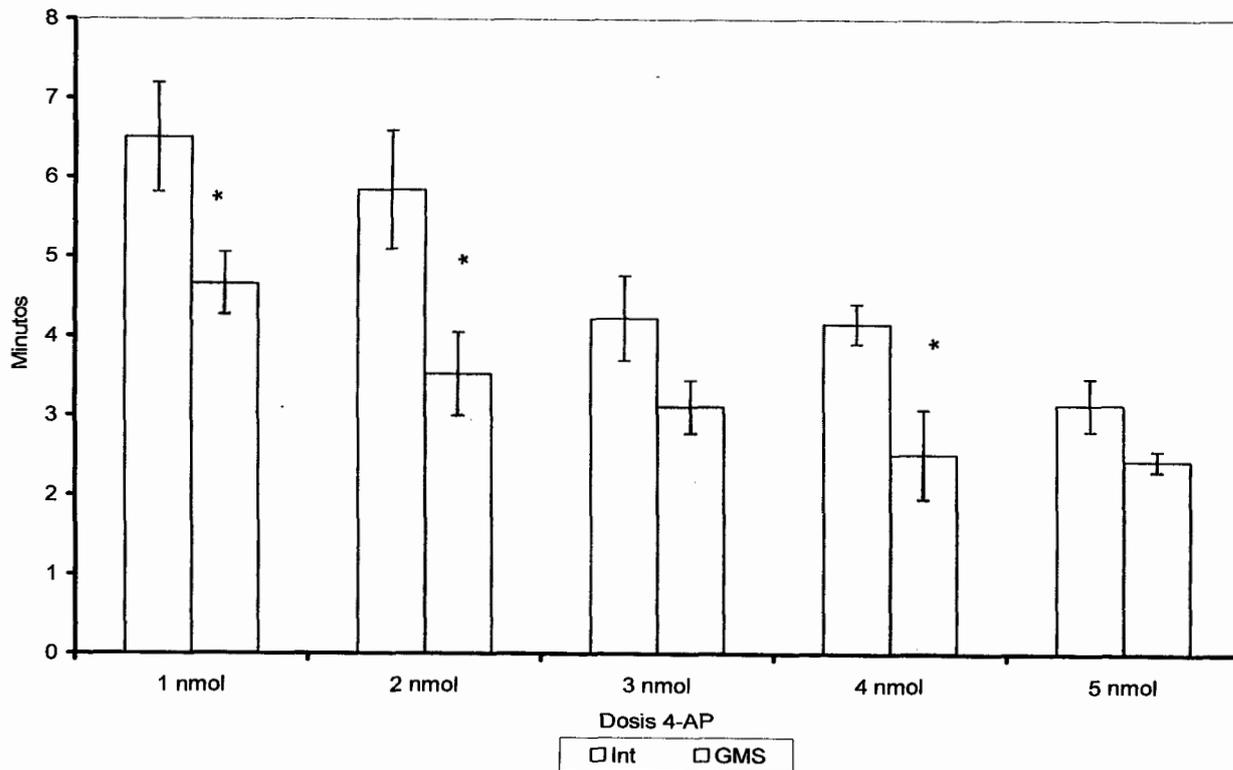


FIGURA 5. Latencia del primer tren de descargas EEG inducidas por la infusión ICV de 4-AP. La figura muestra la tendencia en ambos grupos a la disminución de la latencia de manera proporcional al aumento de la dosis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis para ambos grupos ($p < 0.005$ para el intacto y $p < 0.05$ para el de GMS). Además, el tratamiento neonatal con GMS disminuye la latencia del primer tren de descargas para todas las dosis de 4-AP. Sin embargo, las diferencias entre grupo sólo fueron estadísticamente significativas para las dosis de 1, 2 y 4 nmol ($*p < 0.05$). Los datos representan la media \pm ESM, $n=6$ para todos los grupos, prueba de ANOVA de una vía.

Latencia del primer tren de descargas EEG inducidas por la infusión ICV de 4-AP



CUADRO 2. Características del primer tren de descargas EEG inducido por la administración ICV de 4-AP.

DOSIS 4-AP	GRUPO	DURACIÓN (s)	AMPLITUD (μ V)
1 nmol	INTACTO	21.27 \pm 1.38	5424.79 \pm 965.90
	GMS	25.00 \pm 1.53	6012.57 \pm 988.86
2 nmol	INTACTO	22.54 \pm 1.65	4833.73 \pm 749.82
	GMS	29.06 \pm 1.71*	7132.64 \pm 387.89*
3 nmol	INTACTO	25.50 \pm 1.39	3750.12 \pm 192.54
	GMS	29.24 \pm 1.76	7031.99 \pm 504.83#
4 nmol	INTACTO	25.62 \pm 0.68	6364.95 \pm 525.81
	GMS	31.00 \pm 1.16@	7765.31 \pm 605.01
5 nmol	INTACTO	30.41 \pm 1.31	8300.67 \pm 431.50
	GMS	32.69 \pm 1.49	8374.27 \pm 565.41

La duración y la amplitud de las descargas se incrementaron significativamente con la dosis de 4-AP en ambos grupos ($p < 0.001$ para el grupo Intacto y $p < 0.05$ para el grupo de GMS). Entre los grupos existe diferencia estadísticamente significativa para la duración en las dosis de 2 y 4 nmol (* $p < 0.05$ y @ $p < 0.005$); y para la amplitud en 2 y 3 nmol (* $p < 0.05$ y # $p < 0.001$). Los datos muestran la media \pm ESM, $n=6$ para todas las dosis de ambos grupos, prueba de ANOVA de una vía.

FIGURA 6. Efecto de la administración ICV de 1 nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas Intactas. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 1nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas intactas.

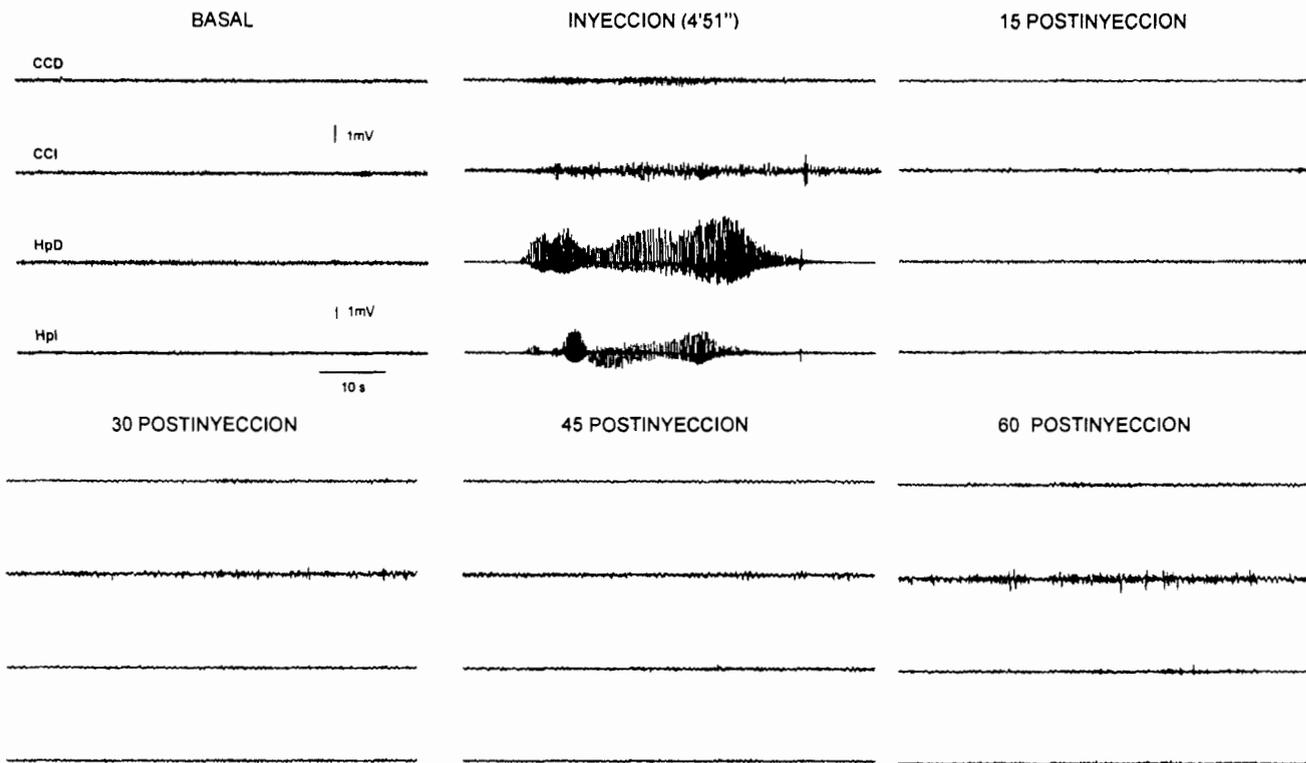


FIGURA 7. Efecto de la administración ICV de 1nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas tratadas con GMS. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecho (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

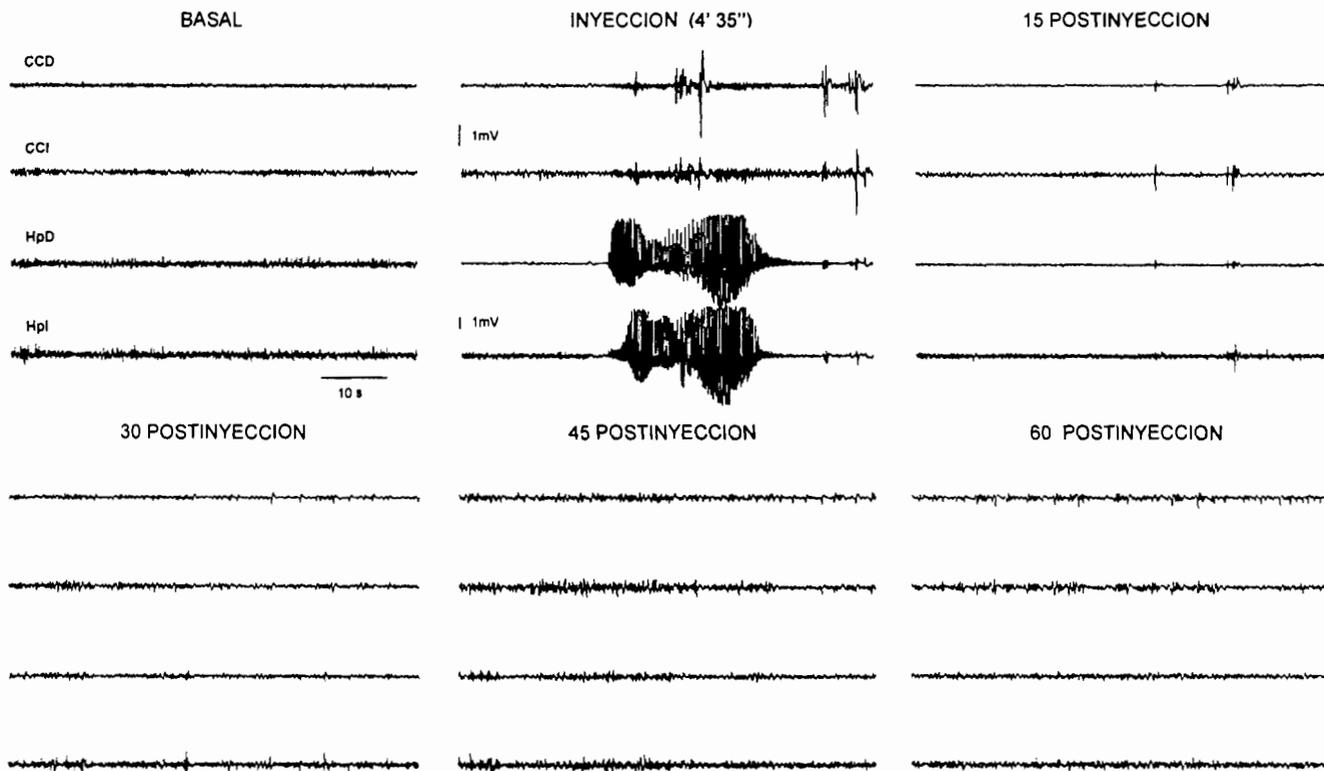
Efecto de la administración ICV de 1 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas tratadas con GMS.

FIGURA 8. Efecto de la administración ICV de 2nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas Intactas. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecho (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 2 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas intactas.

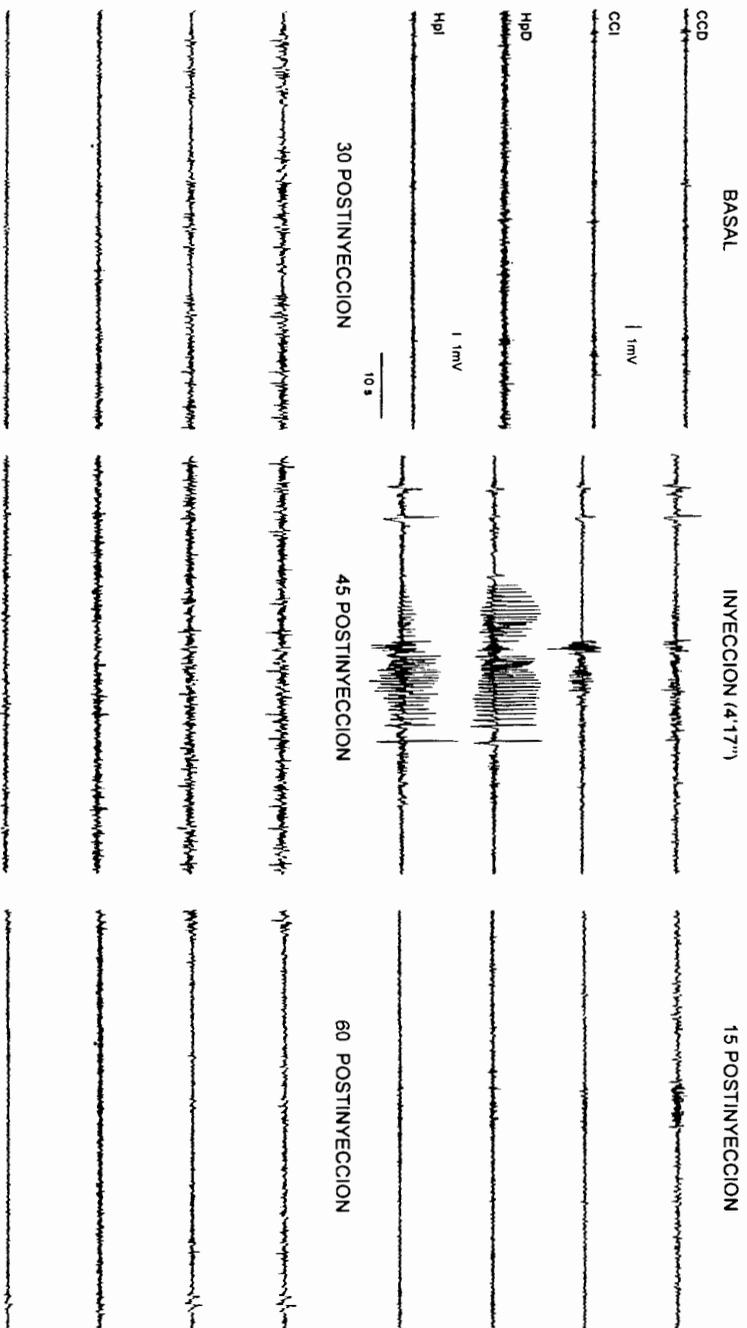


FIGURA 9. Efecto de la administración ICV de 2nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas tratadas con GMS. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

FIGURA 10. Efecto de la administración ICV de 3nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas Intactas. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 3 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas intactas.

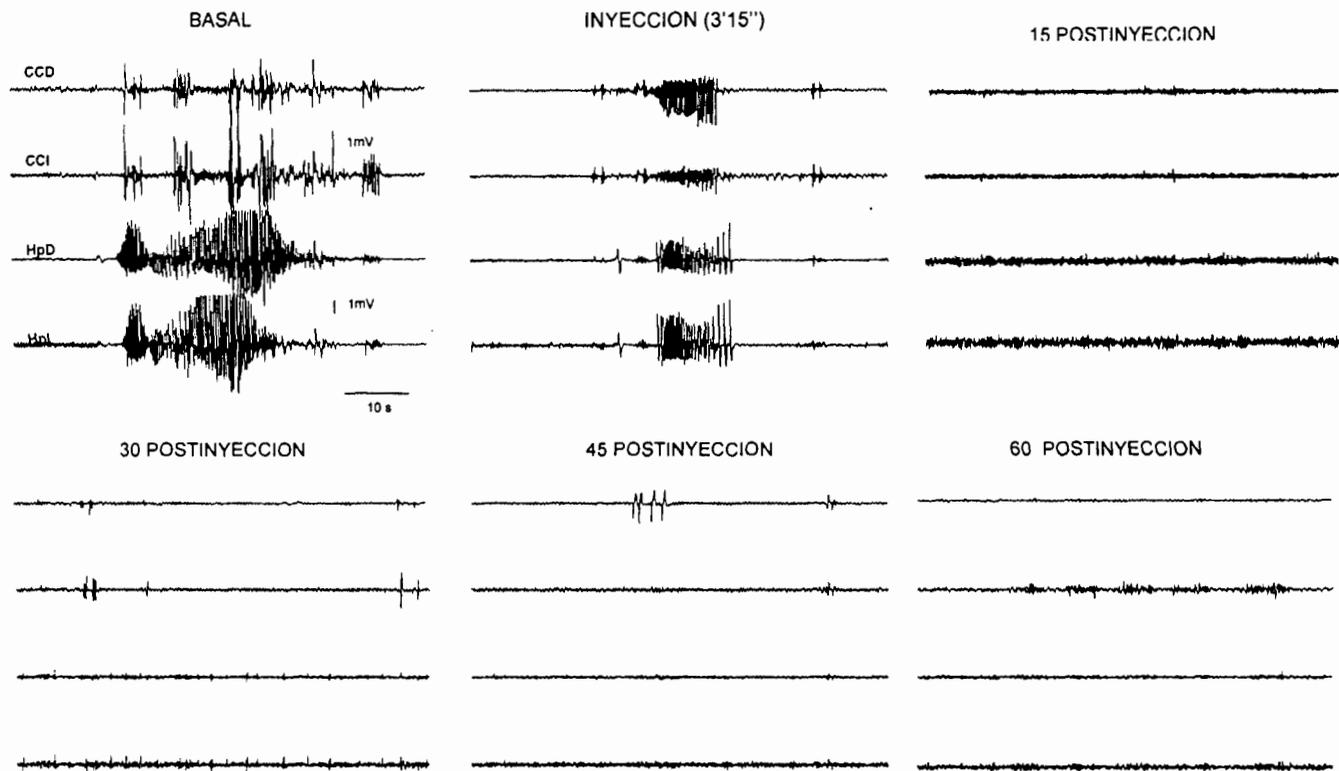


FIGURA 11. Efecto de la administración ICV de 3nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas tratadas con GMS. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 3 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas tratadas con GMS.

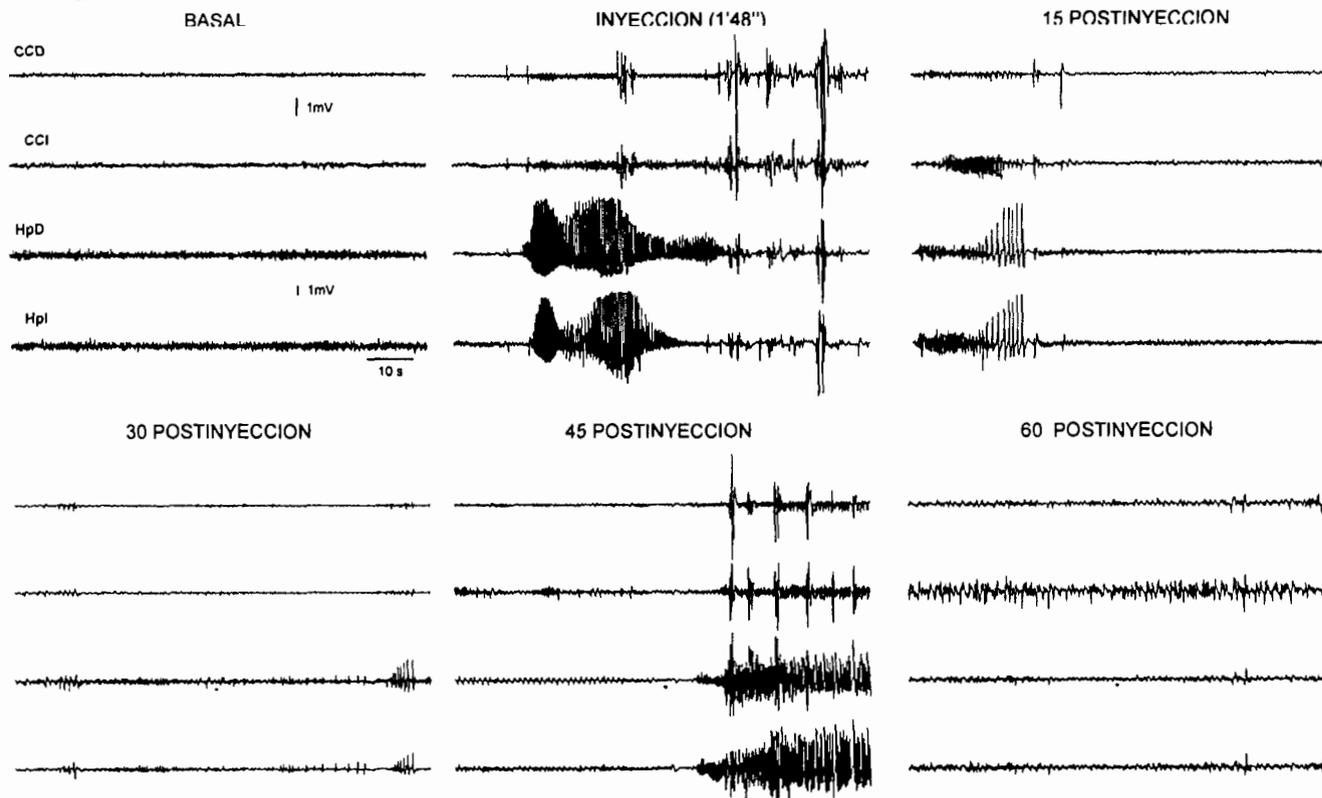


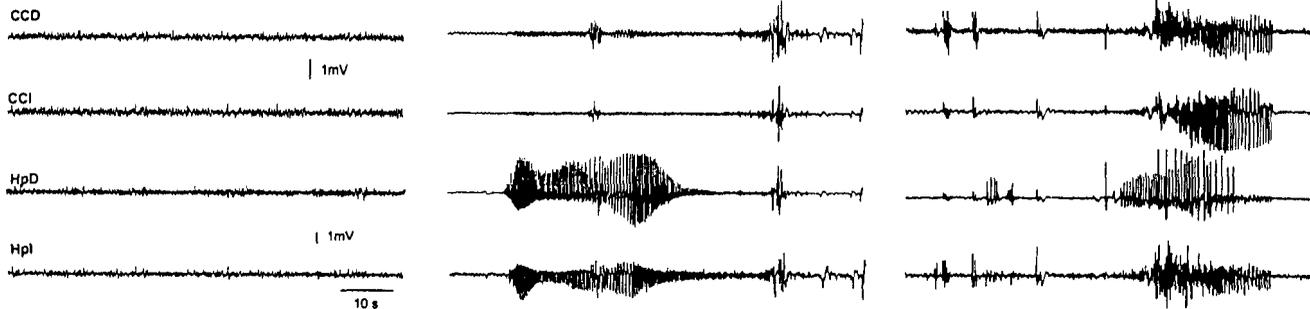
FIGURA 12. Efecto de la administración ICV de 4nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas Intactas. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 4nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas intactas.

BASAL

INYECCION (3' 52'')

15' POSTINYECCION



30' POSTINYECCION

45' POSTINYECCION

60' POSTINYECCION

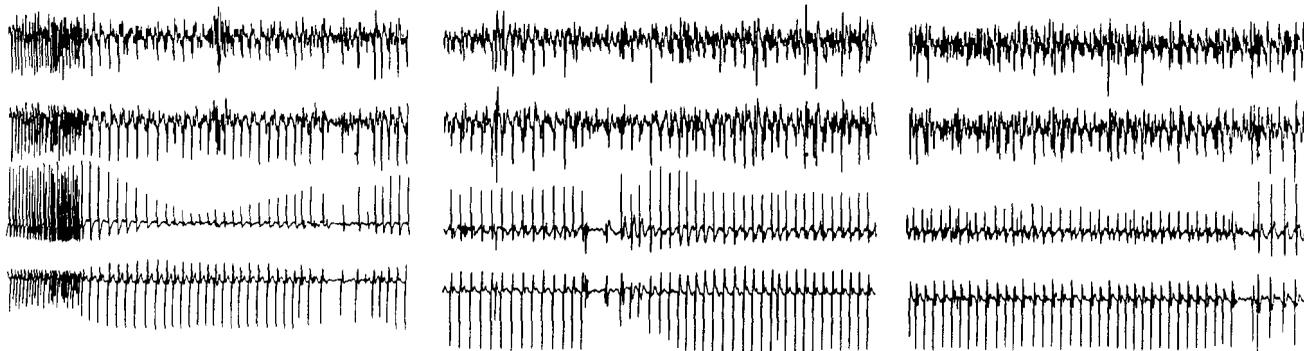


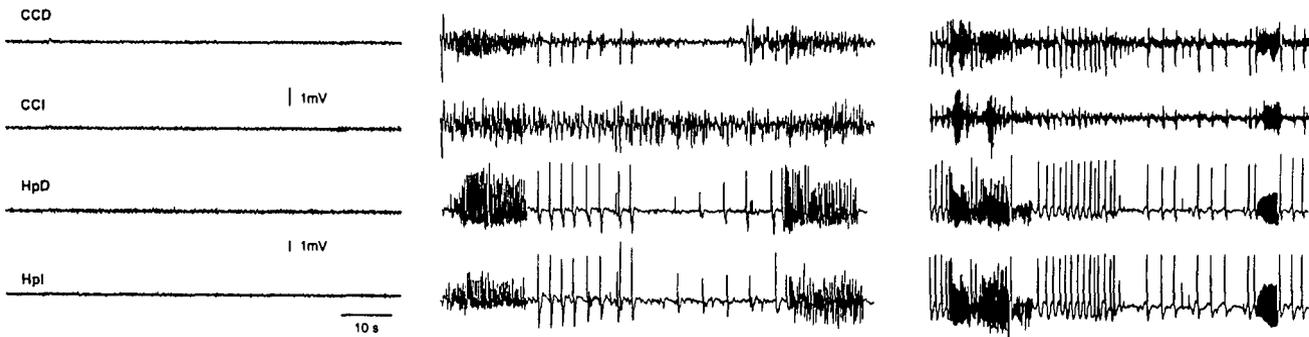
FIGURA 13. Efecto de la administración ICV de 4nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas tratadas con GMS. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 4 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas tratadas con GMS.

BASAL

INYECCION (3'15")

15 POSTINYECCION



30 POSTINYECCION

45 POSTINYECCION

60 POSTINYECCION

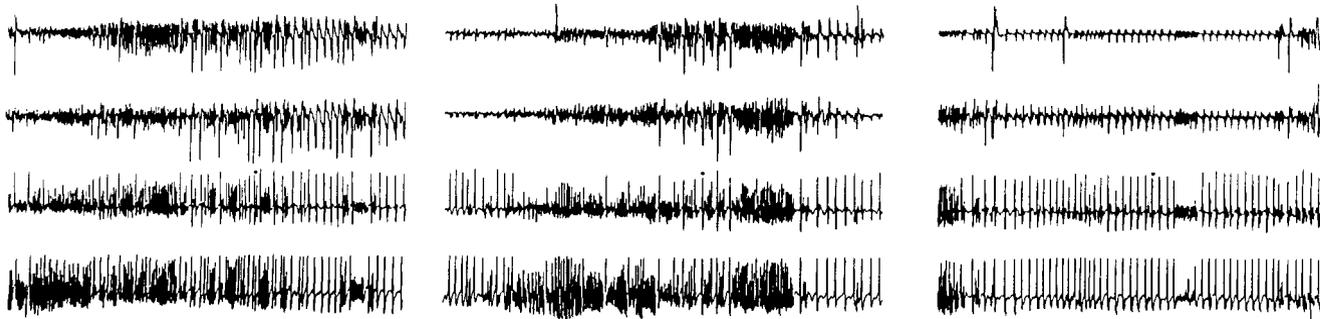


FIGURA 14. Efecto de la administración ICV de 5nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas Intactas. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (Hpl). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 5 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas intactas.

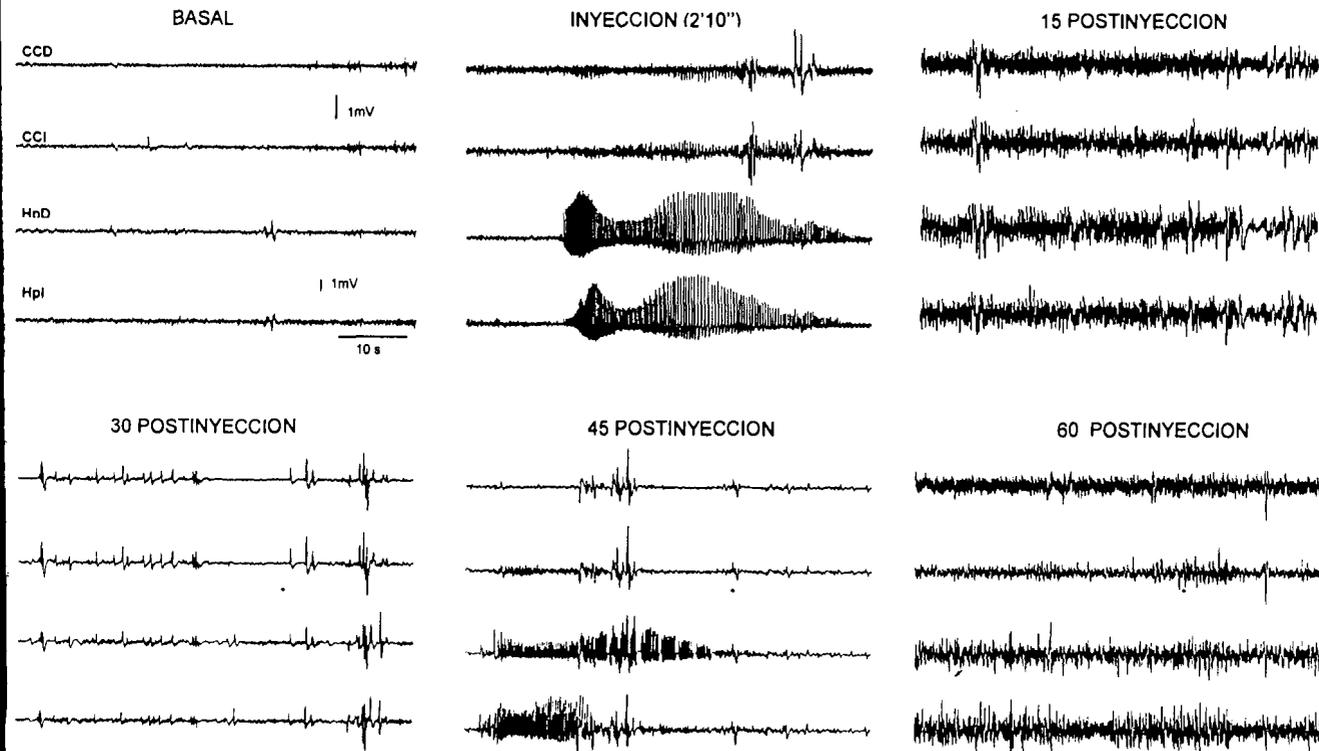
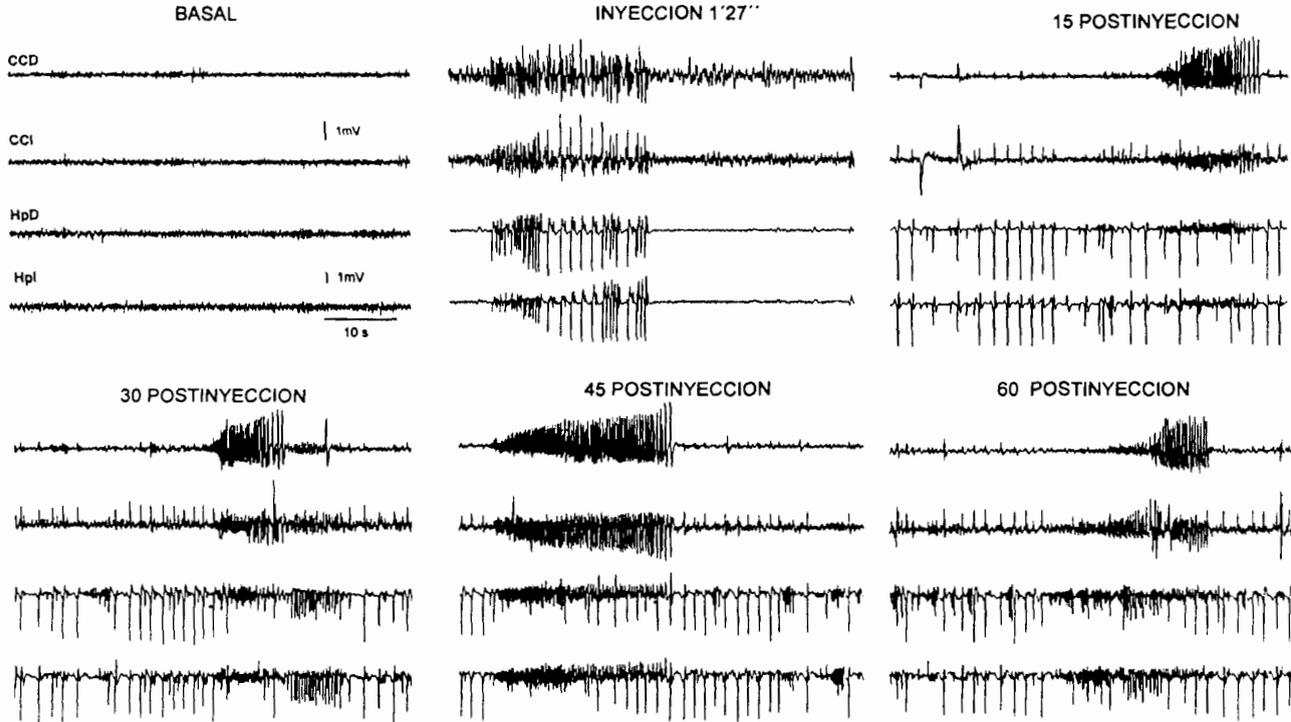


FIGURA 15. Efecto de la administración ICV de 5nmol de 4-AP sobre el registro EEG de ratas tratadas con GMS. La figura muestra los cuatro canales de registro que representan: la corteza cerebral derecha (CCD) e izquierda (CCI); y el hipocampo derecho (HpD) e izquierdo (HpI). Cada segmento corresponde a un minuto de registro de actividad: basal, durante la primera descarga, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración. La latencia del primer tren de descargas se cita en el segmento correspondiente.

Efecto de la administración ICV de 5 nmol de 4-AP sobre el EEG de ratas tratadas con GMS.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizó la administración ICV de 4-AP como modelo de inducción de crisis epileptiformes, para evaluar el efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas. La 4-AP es un bloqueador de los canales de K^+ que estimula la liberación generalizada de neurotransmisores, tanto excitadores como inhibidores, lo que genera actividad epileptiforme intensa *in vitro* ^(18, 33) y crisis convulsivas *in vivo* ^(40, 54, 64).

Así, la infusión ICV de 4-AP (1-5 nmol) indujo crisis convulsivas de tipo límbico con un periodo inicial de hiperexcitabilidad (erección del pelo, movimiento vibrisas, hiperventilación), seguido por automatismos motores propios de las crisis límbicas (cabeceo, movimientos masticatorios, clonos de las extremidades delanteras, extensiones de las extremidades traseras, carreras alocadas y convulsiones clónicas) que evolucionaron hacia convulsiones tónico clónicas generalizadas (CTCG) o hacia el *status epilepticus*. En este sentido, el patrón de crisis límbicas inducido por 4-AP ha sido ampliamente documentado, a través de la administración intracerebral del convulsionante en diferentes regiones tales como el hipocampo, la corteza cerebral motora, el área tempestas y el estriado ^(54, 64, 73, 77), entre otras. Por otro lado, la administración sistémica de 4-AP también puede inducir crisis en diferentes especies animales ⁽³¹⁾, lo que coincide con los resultados obtenidos, donde en el grupo intacto los

mioclonos de las extremidades delanteras, el rearing, las carreras alocadas y las convulsiones clónicas se observaron con todas las dosis; y las CTCG y el SE únicamente con las dosis de 4 y 5 nmol (Figura 4). Además, el convulsionante 4-AP generó descargas epileptiformes que se propagaron a las regiones cerebrales estudiadas, con una latencia que osciló entre los 6 y 3 min para las diferentes dosis en el grupo intacto (Figura 5). Sin embargo, en trabajos previos se han utilizado dosis de 4-AP desde 2-300 veces más altas para inducir crisis límbicas ^(7, 23, 47, 49, 55, 64, 76). En este sentido, las diferencias en dosis pueden deberse a que en el presente trabajo, los animales se infundieron con 4-AP después de un periodo de 3 horas de recuperación de la anestesia, lo que demuestra la eficacia de la 4-AP para inducir crisis convulsivas en dosis bajas. Así, se ha demostrado que el anestésico halotano, disminuye la excitabilidad neuronal, efecto que también pueden ejercer otros anestésicos ⁽⁵⁶⁾. Además, los cambios conductuales generados por las dosis de 4-AP utilizadas en el presente trabajo, son propias del convulsionante, ya que la administración ICV de la solución acuosa del colorante azul directo 15 no produjo ninguna modificación. La acción convulsionante de la 4-AP en animales intactos está directamente relacionada con el aumento de la excitación glutamatérgica, ya que a pesar de producir una liberación masiva de neurotransmisores ^(31, 71, 76), se ha observado que durante la inducción de crisis con 4-AP a animales en libre movimiento, la concentración extracelular de Glu y Gln alcanzada es mayor que la de otras sustancias ^(42, 49, 53, 54, 73, 76).

Por otra parte, el tratamiento neonatal con GMS favoreció la generación de las crisis epileptiformes inducidas por la administración ICV de 4-AP, ya que el SE y las CTCG se presentaron a partir de dosis más bajas, en relación al grupo intacto (2 y 3 nmol, respectivamente; Figura 4). Además, la latencia del primer tren de descargas EEG inducidas por la administración ICV de 4-AP fue menor para todas las dosis en los animales tratados con GMS. Por otro lado, el tratamiento neonatal con GMS también aumentó la severidad de las crisis convulsivas inducidas por 4-AP, ya que la prevalencia de las conductas convulsivas evaluadas, la duración y amplitud del primer tren de descargas fueron mayores en comparación con el grupo intacto.

A este respecto, la administración sistémica de GMS a ratas recién nacidas aumenta la concentración extracelular de Glu, que sobre-activa a sus receptores ⁽¹¹⁾, lo que activa una serie de señales intracelulares que promueven la degeneración en regiones cerebrales con características epileptogénicas ^(6, 10, 32). El daño excitotóxico que produce el GMS afecta a diferentes tipos neuronales ⁽⁸³⁾ y genera alteraciones diversas, sin embargo, las alteraciones producidas sobre al sistema GABAérgico ^(12, 50), tienen especial importancia debido al control que ejerce el GABA sobre la excitabilidad general del SN ⁽⁷⁸⁾. En este sentido, el tratamiento neonatal con GMS disminuye la liberación, tanto basal como estimulada, de [³H]-GABA ⁽¹²⁾, modifica la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) ⁽⁵⁰⁾ y reduce la densidad de las células GABA-positivas ⁽³⁵⁾ en la corteza cerebral y el hipocampo. Observaciones, que sugieren que la inhibición mediada por GABA podría ser

menos eficiente después del tratamiento neonatal con GMS, lo que evidentemente favorecería el desarrollo de crisis convulsivas, hipótesis que estaría de acuerdo con los resultados de este trabajo, en el cual la severidad de las crisis convulsivas inducidas por 4-AP fue mayor en el grupo tratado con GMS respecto al grupo intacto. Además, existen anomalías en la estructura y funcionalidad de los R-NMDA después del tratamiento con GMS ^(9, 11), que favorecen la existencia de receptores de mayor sensibilidad al Glu y con corrientes de calcio de mayor amplitud pero de menor duración, condición que también pudiera estar implicada en las modificaciones en susceptibilidad convulsiva observadas en este trabajo.

De esta forma, los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento neonatal con GMS disminuye la latencia y eleva la duración y amplitud del primer tren de descargas electroencefalográficas, así como la severidad de las manifestaciones conductuales inducidas por la administración ICV de 4-AP. Debido probablemente a que el aumento de los niveles corticales de Glu en etapas tempranas, pudieron haber inducido la sobreactivación de los R-NMDA mediadores de neurotoxicidad y llevar a la muerte celular, así como al desarrollo neuronal deficiente observado en las neuronas sobrevivientes ⁽¹⁰⁾, aunado a la disminución en la función de la neurotransmisión GABAérgica y los cambios generados en el resto de los sistemas de neurotransmisión, factores que tienen un papel significativo en la inducción de efectos persistentes. Otra de las posibilidades que es importante tomar en cuenta para explicar las diferencias en el patrón crisis que presentan los animales de un mismo grupo,

son las diferencias intrínsecas que existen entre animales. Aún así, las diferencias estadísticamente significativas encontradas tanto en la evaluación conductual y electroencefalográfica entre los grupos en las diferentes dosis de 4-AP, sugieren que en estudios posteriores el tamaño de la muestra podría ser mayor para disminuir el error experimental, así mismo se necesitan realizar estudios de microdiálisis, bajo los modelos de daño excitotóxico y de inducción de crisis utilizados en el presente trabajo, para la caracterización neuroquímica de las modificaciones en susceptibilidad convulsiva inducidas por el GMS.

Los resultados permiten afirmar que el tratamiento neonatal con GMS disminuye el umbral convulsivo y eleva la intensidad de las crisis epileptiformes inducidas por la administración ICV e 4-AP. Debido probablemente a que las alteraciones producidas sobre la neurotransmisión GABAérgica después del tratamiento neonatal con GMS modifican el balance funcional entre la inhibición y excitación nerviosas en favor de la excitación, lo que eleva la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas.

CONCLUSIONES

1. La administración sistémica de GMS a animales recién nacidos disminuye la latencia y eleva la duración y amplitud del primer tren de descargas EEG, inducidas por la administración ICV de 4-AP.
2. Las manifestaciones conductuales durante las crisis convulsivas generadas por la administración ICV de 4-AP son más severas después del tratamiento neonatal con GMS.
3. El tratamiento neonatal con GMS facilita las crisis convulsivas inducidas por la administración ICV de 4-AP, disminuye el umbral convulsivo y promueve la propagación y generalización de las crisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ali M.M., Bawari M., Misra U.K., Babu G.N. (2000) "Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-L-glutamate during early life" *Neurosci. Lett.* 284:57-60.
2. Arauz-Contreras J., Feria-Velasco A. (1984) "Monosodium L-Glutamate-induce convulsions. I. Differences in seizure pattern and duration of effect as a function of age in rats" *Gen. Pharmacol.* 15:391-395.
3. Arundine M., Tymianski M. (2004) "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury" *Cell. Mol. Life Sci.* 61:657-668.
4. Avanzani G., Francwaschetti S. (2003) "Cellular biology of epileptogenesis" *Lancet Neurol.* 2:33-42.
5. Avoli M. (2001) "Do interictal discharges promote or control seizures? Experimental evidence from an in vitro model of epileptiform discharge" *Epilepsia* 42:2-4.
6. Avoli M., D'Antuono M., Louvel J., Köhling R., Biagini G., Pumain R., D'Arcangelo G., Tancredi V. (2002) "Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro." *Progr. Neurobiol.* 68:167-207.
7. Ayala G.X., Tapia R. (2003) "Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo" *Neuropharmacol.* 45:649-660.
8. Barbarosie M., Louvel J., D'Antuono M., Kurcewicz I., Avoli M. (2002) "Masking Synchronous GABA-mediated Potentials Controls Limbic Seizures". *Epilepsia* 43:1469-1479.
9. Beas-Zárate C., Flores-Soto M.E., Armendariz-Borunda J. (2002) "NMDAR-2C and 2D subunits gene expression is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adult rats" *Neurosci. Lett.* 321:9-12.
10. Beas-Zárate C., Pérez-Vega M. I., González-Burgos I. (2002) "Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats" *Brain Res.* 952:275-281.

11. Beas-Zárate C., Rivera-Huizar S.V., Sánchez-Ruiz M.Y., Martínez-Contreras A., Feria-Velasco A., Armendariz-Borunda J. (2001) "Changes in NMDA-receptor gene expression are associate with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in rat brain" *Neurochem. Int.* 39:1-10.
12. Beas-Zárate C., Sánchez-Ruiz M.Y., Ureña-Guerrero M.E., Feria-Velasco A. (1998) "Effect of neonatal exposure to monosodium L-glutamate on regional GABA release during postnatal development" *Neurochem. Int.* 33:106-121.
13. Bernardo L.S. (2003) "Prevention of epilepsy after head trauma: do we need new drugs or a new approach?" *Epilepsia* 44:27-33.
14. Blondeau N., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M., Heurteaux C. (2002) "A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures" *Int. Soc. Cer. Blood Flow Metabol.* 821-834.
15. Bodnár I., Gööz P., Okamura H., Tóth B. E., Vecsernyés M., Halász B., Nagy G. M. (2001) "Effect of neonatal treatment with monosodium glutamate on dopaminergic and L-DOPA-ergic neurons of the medial basal hypothalamus and on prolactin and MSH secretion of rats." *Brain Res. Bull.* 55:767-774.
16. Bragin A., Mody I., Wilson C.L., Engel J. (2002) "Local Generation of fast ripples in epileptic brain" *J. Neurosci.* 22:2012-2021.
17. Cabezas-Fernández C., Martín-Montiel E.D., Buño-Buceta W. (2003) "Mecanismos celulares reguladores de la excitabilidad celular: implicaciones funcionales y en epilepsia" *Rev. Neurol.* 36:738-743.
18. Calcagnotto M.E., Barbarosie M., Avoli M. (2000) "Hippocampus-Entorhinal cortex loop and seizure generation in the young rodent limbic system" *J. Neurophysiol.* 83:3183-3187.
19. Camón L., de Vera N., Martínez E. (2001) "Polyamine metabolism and glutamate receptor agonist-mediated excitotoxicity in the rat brain" *J. Neurosci. Res.* 66:1101-1111.
20. Chaparro-Huerta V., Rivera-Cervantes M.C., Torres-Mendoza B.M., Beas-Zárate C. (2002) "Neuronal death and tumor necrosis factor- α response to glutamate induced excitotoxicity in the cerebral cortex of neonatal rats" *Neurosci. Lett.* 333:95-98.
21. Cheng Q., Burkat P.M., Kulli J.C., Yang J. (2001) "GABA α p1 subunits from functional receptors but not functional synapses in hippocampal neurons" *J. Neurophysiol.* 86:2605-2615.

22. Contreras D. (2000) "Modelos experimentales en epilepsia" *Rev. Neurol.* 30:370-376.
23. Corona J.C., Tapia R. (2004) "AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord *in vivo*" *J. Neurochem.* 89:988-997.
24. Cuadro A., Amat G., Armijo J.A. (2003) "Is the interaction between felbatame and valproate against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazol in mice beneficial?" *Pharmacol. Res.* 48:183-192.
25. Eells J.B., Clough R.W., Browning R.A., Jobe P.C. (2004) "Comparative FOS immunoreactivity in the brain after forebrain, stream, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats" *Neuroscience* 123:279-292.
26. Ekdahl C.T., Zhu C., Bonde S., Bahr B.A., Blomgren K., Lindvall O. (2003) "Death mechanism in status epilepticus-generated neurons and effects of additional seizures on their survival" *Neurobiol. Dis.* 14:513-523.
27. Escobar A. (2004) "Epilepsia" *Revista Mexicana de Neurociencias* 5:186-187.
28. Ferrer I. (2002) "Señalización celular en el hipocampo epiléptico" *Rev. Neurol.* 34:544-550.
29. Galván E., Sitges M. (2004) "Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na⁺ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes" *Neurochem. Res.* 29:347-355.
30. Glover W.E. (1982) "The aminopyridines" *Gen. Pharmacol.* 13:259-274.
31. González-Burgos I., Pérez-Vega M.I., Beas-Zárate C. (2001) "Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons." *Neurosci. Lett.* 297:69-72.
32. Granillo R.J., Zanniello G., Cristiano A. (2002) "Epilepsias. Modelos experimentales. Epileptogénesis" *Rev. Neurol. Arg.* 27:31-40.
33. Gu Y., Ge S.Y., Ruan D.Y. (2004) "Effect of 4-aminopyridine on synaptic transmission in rat hippocampal slices" *Brain Res.* 1006:225-232.
34. Halonen T., Nissinen J., Pitkänen A. (2001) "Chronic elevation of brain GABA levels begins two days after status epilepticus does not prevent epileptogenesis in rats" *Neuropharmacology* 40:536-550.

35. Hernández A. (2004) "Actividad anticonvulsiónante de la esparteína en modelos experimentales de crisis epileptiformes" Tesis (Licenciatura en Biología) Universidad de Guadalajara. CUCBA. División de Ciencias Biológicas y Ambientales. Las Agujas, Zapopan, Jal.
36. International League Against Epilepsy, Org. Bruselas, Bélgica. 2004 <http://www.epilepsia.org/>
37. Ishizuka Y., Ishida Y., Jin Q.-J., Mitsuyama Y., Kannan H. (2000) "GABA_A and GABA_B receptor modulating basal and footshock-induced nitric oxide releases in rat prefrontal cortex" *Brain Res.* 872:266-270.
38. Jefferys J.G.R. (2003) "Models and mechanisms of experimental epilepsies" *Epilepsia* 44:44-50.
39. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (1999) "Principles of neural science" Mc Graw-Hill, 4ta. ed., New York, 1414 págs.
40. Koryntová H., Kubová H., Tutka P., Mares P. (2002) "Changes in cortical epileptic afterdischarges under the influence of convulsant drugs" *Brain Res. Bull.* 58:49-54.
41. Kovács A., Mihály A., Komáromi A., Gyengési E., Sente M., Weiczner R., Krisztin-Péva B., Szabo G., Telegdy G. (2003) "Seizure, neurotransmitter release, and gene expression are closely related in the striatum of 4-aminopyridine- treated rats" *Epilepsy Res.* 55:117-129.
42. Kovács A.D., Cebere G., Cebere A., Moreira T., Liljequist S. (2001) "Cortical and striatal neuronal cultures of the same embryonic origin show intrinsic differences in glutamate receptor expression and vulnerability to excitotoxicity" *Exp. Neurol.* 168:47-62.
43. Malva J. O., Silva A. P., Cunha R. A. (2003) "Presynaptic modulation controlling neuronal excitability and epileptogenesis: Role of Kainate, Adenosine and Neuropeptide-Y Receptors". *Neurochem. Res.* 28:1501-1515.
44. Manivasagam T., Subramanian P. (2004) "Monosodium glutamate affects the temporal characteristics of biochemical variables in wistar rats" *Pol. J. Pharmacol.* 56:79-84.
45. Mares P., Chino M., Kubova H., Mathern P., Veliky M. (2000) "Convulsant action of systemically administered glutamate and bicuculline in immature rats" *Epilepsy Res.* 42:183-189.

46. Marini A.M., Ueda Y., June C.H. "Intracellular survival pathways against glutamate receptor agonist excitotoxicity in cultured neurons". Ann. N.Y. Acad. Sci.
47. Martin E.D., Pozo M.A. (2003) "Valproate suppresses status epilepticus induced by 4-aminopyridine in CA1 hippocampus region" *Epilepsia* 44(11):1375-1379.
48. Martínez-Contreras A., Huerta M., López-Pérez S., García-Estrada J., Luquín S., Beas-Zárate C. (2002) "Astrocytic and microglia cells reactivity induced by neonatal administration of glutamate in cerebral cortex of the adult rats" *J. Neurosci. Res.* 67:200-210.
49. Medina-Ceja L., Morales-Villagrán A., 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 Res. Bull.* 53:255-262.
50. Meister B. (1989) "Monosodium glutamate (MSG) lesions" En: *Lesion and transplantation Vol. 7. Methods in Neuroscience.* (P. M. Conn, ed.) Academic Press Inc. San Diego, p.p. 28.
51. Michaelis E.K. (1997) "Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging" *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
52. Mohd. A.M., Bawari M., Misra. U.K, Babu G.N. (2000) "Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-L-glutamate during early life". *Neurosci. Lett.* 284:57-60.
53. Morales-Villagrán A. y Tapia R. (1995) "Preferential stimulation of glutamate released by 4-aminopyridine in rats striatum *in vivo*" *Neurochem. Int.* 28:35-40.
54. Morales-Villagrán A., López-Pérez S.J., Medina-Ceja L., Tapia R. (1999) "Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique" *Neurosci. Lett.* 275:133-136.
55. Morales-Villagrán A., Ureña-Guerrero M.E., Tapia R. (1996) "Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine" *Eur. J. Pharmacol.* 305:87-93.
56. Murguía-Castillo J. (2002) "Participación del glutamato en la propagación de las crisis epileptiformes inducidas por la 4-aminopiridina en el circuito corteza entorrinal-hipocampo de ratas" Tesis (Licenciatura en Biología)

Universidad de Guadalajara. CUCBA. División de Ciencias Biológicas y Ambientales. Las Agujas, Zapopan, Jal.

57. Nicholls D.G., Budd L.S., Castilho F.R., Wasrd M.W. (1999) "Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893:1-12.
58. Obrenovitch T.P. (1999) "High extracellular glutamate and neuronal death in neurological disorders, cause, contribution or consequence?" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890:273-283.
59. Obrenovitch T.P., Urenjak J., Zilka E., Jay T.M. (2000) "Excitotoxicity in neurological disorders—the glutamate paradox". *Int. J. Dev. Neurosci.* 18:281-287.
60. Ohno K., Higashima M. (2002) "Effects of antiepileptic drugs on afterdischarge generation in rat hippocampal slices" *Brain Res.* 924:39-45.
61. Olney J W., Collins R.C., Sloviter R.S. (1986) "Excitotoxic mechanism of epileptic Brain damage" *Adv. Neurol.* 44:857-877.
62. Ortuño-Sahagún D., Beas-Zárate C., Adame-González G., Feria-Velasco A. (1997) "Effect on L-glutamate on cholinergic transmission in various brain regions and during the development of rats, when administrated perinatally" *Neurochem. Int.* 31:683-692.
63. Paxinos G., Watson C. (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates", 2a. ed., Academic Press, San Diego.
64. Peña F., Tapia R. (1999) "Relationship among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study" *J. Neurochem.* 72:2006-20014.
65. Peña F., 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.
66. Perreault P., Avoli M. (1991) "Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices" *J. Neurophysiol.* 65:771-785.
67. Rónai A. Z., Gyires K., Barna I., Müller K., Palkovits M. (2001) "Neonatal monosodium glutamate treatment abolishes both delta opioid receptor-induced an alpha-2 adrenoceptor-mediated gastroprotection in the lower brainstem in rats" *J. Physiol. Paris* 95:215-220.

68. Russo G.E., Ferreri G., Giuseppe B., Flocco M.A., Di Paola E.D., De Sarro A. (2004) "Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice" *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77:761-766.
69. Rutecki P.A., Yang Y. (1997) "Metabotropic glutamate receptor activation modulates epileptiform activity in the hippocampus". *Neuroscience* 81: 927-935.
70. Sakamaki K., Nomura M., Hatakenaka S., Miyakubo H., Tanaka J. (2003) "GABAergic modulation of noradrenaline release in the median preoptic nucleus area in the rat" *Neurosci. Lett.* 342:77-80.
71. Salazar P., Tapia R. (2001) "Seizures induced by intracerebral administration of pyrodoxal-5'-phosphate: effect on GABAergic drugs and glutamate receptor antagonist." *Neuropharmacology* 41:546-553.
72. Sanabria E.R.G., Pereira M.F.S., Dolnikoff M.S., Andrade I.S., Ferreira A.T., Cavalheiro E.A., Fernandes M.J.S. (2002) "Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats" *Brain Res. Bull.* 59:47-51.
73. Sayin U., Rutecki P.A. (2003) "Group I metabotropic receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus" *Epilepsy Res.* 53:186-195.
74. Scharfman H.E. (2002) "Epilepsy as an example of neural plasticity" *Neuroscientist* 8:154-173.
75. Schiller Y. (2002) "Inter-ictal and ictal-like epileptic discharges in the dendritic tree of neocortical pyramidal neurons" *J. Neurophysiol.* 88:2954-2962.
76. Segovia G., Porras A., Mora F. (1997) "Effects of 4-aminopyridine on extracellular concentrations of glutamate in striatum of the freely moving rat" *Neurochem. Res.* 22:1491-1497.
77. Singh P., Mann K. A., Mangat H. K., Kaur G. (2003) "Prolonged glutamate excitotoxicity: Effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes" *Mol. Cell Biochem.* 243: 139-145.
78. Sinha S.R., Saggau P. (2001) "Imaging of 4-AP induced, GABA_A-dependant spontaneous synchronized activity mediated by the hippocampal interneuron network" *J. Neurophysiol.* 86:381-391.

79. Skultétová I., Tokarev D., Jezová D. (1997) "Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats" *Brain Res. Bull.* 45:175-178.
80. Tapia R., Medina-Ceja L., Peña F. (1999) "On the relationship between extracellular glutamate, hiperexcitation and neurodegeneration, in vivo" *Neurochem. Int.* 34:23-31.
81. Treiman D.M. (2001) "GABAergic mechanism in epilepsy" *Epilepsia* 42:8-12.
82. Ureña-Guerrero M.E. (1999) "Densidad de células GABAérgicas, actividad y propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en diferentes regiones del cerebro de la rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS)" Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jalisco, México.
83. Ureña-Guerrero M.E., López-Pérez S.J., Beas-Zárate C. (2003) "Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development" *Neurochem. Int.* 42:269-276.
84. Ushigome A., Nomura M., Tanaka J. (2004) "Modulation of noradrenaline release in the median preoptic area by GABAergic inputs from the organum casulosum of the lamina terminalis in the rat" *Neurochem Int.* 44:139-144.
85. van de Pol A.N., Gao X-B., Patrylo P.R., Ghosh P.K., Obrietan K. (1998) "Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons" *J. Neurosci.* 18:10749-10761.
86. Winn P. (1989) "Excitotoxins as tools for producing brain lesions" En: *Lesion and transplantation. Vol 7 Methods in neuroscience* (P. M. Conn, ed.) Academic Press Inc. San Diego, p.p. 16-27.
87. Yang X-F., Chang J. H., Rothman S.M. (2003) "Long lasting anticonvulsant effect of focal cooling on experimental neocortical seizures" *Epilepsia* 44: 1500-1505.