

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“EFECTO DEL NO SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA
CORTICAL EN UN MODELO FARMACOLÓGICO DE
EPILEPTOGÉNESIS”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

Por:

VICTORIA BARTSCH ESPINOZA

Directores de Tesis

**Dra. Úrsula Wyneken Hempel
Dra Jenny Fiedler Temer**

SANTIAGO- CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

VICTORIA BARTSCH ESPINOZA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2013.

Directores de Tesis:

Dra. Úrsula Wyneken H. _____

Dra. Jenny Fiedler T. _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Guillermo Díaz (Presidente) _____

Dra. Inés Ruiz _____

Dra. Katya Gysling _____

Dr. Sergio Lavandero _____

*A mis padres y hermana
Gracias por su apoyo y comprensión
Este triunfo es para ustedes*

“Todo es mente, el Universo es una creación mental”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Úrsula Wyneken, quién me acogió en el Laboratorio de Neurociencias, a pesar de mis nulos conocimientos del trabajo de investigación científica. Agradezco su dedicación, apoyo a la realización de mi tesis doctoral y haberme introducido al mundo de la neurociencia.

A la Dra. Jenny Fiedler, por aceptar ser mi co-tutora y apoyarme en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Adrián Ocampo Garcés, por aceptar que la mayor parte del trabajo experimental se desarrollara en su laboratorio y por enseñarme el mundo de la cronobiología.

A Javier Díaz, por su gran ayuda computacional en el desarrollo de todos los algoritmos utilizados en esta tesis, su dedicación y apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurociencias: Sole, Mau, Motus, Estibaliz, Andrés, Gonza, Pílon, Ariel, Engendrito, Jorge, Javier, Xime. Gracias por acompañarme, apoyarme, enseñarme, entenderme y aguantarme a lo largo de estos años.

A mis compañeros del Laboratorio de Sueño y Cronobiología: Javiera, Danay, Ingrid, Jorge, Francisco, Natalia, Cristián. Gracias por su ayuda, compañía y múltiples eventos de esparcimiento compartidos.

A todos mis amigos, especialmente a Patty, Carla, Alexis, Claudia, Marcela, Marlen, José, Beatriz. Gracias por su apoyo y su ayuda en los momentos más difíciles de este camino que hoy culmina.

A mi familia, gracias por su apoyo incondicional a todas las locuras que de repente se me ocurren.

A mis compañeras del doctorado: Tatiana, Mirtha y Sylvia, gracias por su amistad, enseñanzas, compañía y múltiples cafés helados compartidos durante nuestra formación conjunta.

Gracias a todas aquellas personas que no he nombrado en esta página, pero que han estado presente en alguna parte de esta etapa de mi vida.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Esta tesis dio origen a la siguiente publicación:

“Electroencephalographic characterization of pentylenetetrazole kindling in rats and modulation of epileptiform discharges by nitric oxide” Victoria Bartsch; Javier Diaz; Paula Farias; Ignacio Gonzalez; Gabriel Cavada; Adrian Ocampo; Úrsula Wyneken. Neurochemical research (Aceptado).

Las presentaciones a congreso realizadas durante el desarrollo de la tesis fueron las siguientes:

- Jornadas de Investigación Universidad de los Andes, Santiago 2009, presentación póster: “Caracterización electroencefalográfica de Kindling Farmacológico con Pentilentetrazol”
- V Congreso Sociedad Chilena de Neurociencias, La Serena 2009, presentación póster: “Curso temporal del modelo de Kindling Farmacológico con Pentilentetrazol en ratas”
- VI Congreso Sociedad Chilena de Neurociencias, Valdivia 2010, presentación póster: “Caracterización electroencefalográfica del Kindling con Pentilentetrazol”
- XXXIV Congreso Nacional de Estudiantes de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago 2011, tutoría a alumnos de medicina presentación oral: “Caracterización de Kindling Farmacológico con Pentilentetrazol”
- I Congreso Ciencia Joven, Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad de Chile, Santiago 2011, presentación póster: “Óxido nítrico tiene un papel antiepileptogénico en la corteza cerebral”

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS.....	V
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	VI
INDICE DE CONTENIDOS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
SUMMARY.....	XV
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- EPILEPSIA.....	1
1.2.- EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL.....	2
1.3.- EL HIPOCAMPO EN LA EPILEPTOGÉNESIS.....	3
1.4.- MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA EPILEPTOGÉNESIS.....	5
1.5.- MODELOS EXPERIMENTALES.....	9
2.-HIPÓTESIS.....	13
3.-OBJETIVOS.....	13
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4.-METODOLOGÍA.....	14
4.1.- ANIMALES.....	14
4.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	15
4.3.- SOLUCIONES Y AGENTES FARMACOLÓGICOS.....	17
4.4.- DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	20
4.5.- ANÁLISIS CONDUCTUAL.....	21
4.6.- REGISTRO Y ADQUISICIÓN DE DATOS ELECTROENCEFALOGRAFICOS (EEG) Y ELECTROMIOGRAFICOS (EMG).....	22

4.7.- ANÁLISIS DEL EEG.....	23
4.8.- ANÁLISIS DE DESCARGAS EPILÉPTICAS (DE)	23
4.9.- PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS DE RATAS SOMETIDAS A IMPLANTES DE CÁNULAS.....	26
4.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
5.- RESULTADOS	31
5.1.- CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL KINDLING FARMACOLÓGICO.....	31
5.2.- CARACTERIZACIÓN DE DESCARGAS EPILÉPTICAS EN EL EEG DE LAS RATAS SOMETIDAS A KINDLING FARMACOLÓGICO CON PTZ.....	35
5.3.- CARACTERIZACIÓN DE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS POSTERIOR AL KINDLING FARMACOLÓGICO CON PTZ.	54
5.4.- MODULACIÓN DE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS POR NO.	56
6.- DISCUSIÓN	63
6.1.- MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA.....	63
6.3.- PERSISTENCIA DE LOS EFECTOS DEL KINDLING CON PTZ	69
6.4.- EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS.....	69
6.4.- FARMACOTERAPIA ACTUAL.....	71
7.- CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	77
8.- REFERENCIAS.....	78
9.- ANEXOS	87
9.1.- ESTADOS DEL CICLO SUEÑO VIGILIA.....	87
9.2.- ESPECTROGRAMA DE UNA DESCARGA EPILÉPTICA	89
9.3.- CANALES DE REGISTRO DE EEG.....	90
9.4.- POSICIONES DE LAS CÁNULAS CORTICALES	91

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1.- Circuito trisináptico excitatorio del hipocampo.....	4
Fig. 1.2.- Mecanismo de acción diferencial propuesto para el NO en corteza (CX) e hipocampo (HP).....	8
Fig. 4.1.- Posiciones de cánulas y electrodos corticales.	17
Fig. 4.2.- Diseño experimental para análisis conductual del kindling farmacológico.	20
Fig. 4.3.- Diseño experimental del kindling farmacológico.....	20
Fig. 4.4.- Diseño experimental de modulación de los niveles corticales de NO.....	21
Fig. 4.5.- Algoritmo de la Transformada de Fourier Rápida.....	24
Fig. 4.6.- Perfil espectral de una descarga epiléptica.	25
Fig. 5.1.- Número de crisis epilépticas en 10 minutos para dosis de 30 o 40 mg/kg.....	32
Fig. 5.2.- Duración de crisis epilépticas por grado.....	33
Fig. 5.3.- Representación descriptiva de la frecuencia de crisis epilépticas.	34
Fig. 5.4.- Comparación de grado máximo de crisis epiléptica promedio.....	35
Fig. 5.5.- Registro EEG y EMG durante los estados del ciclo sueño vigilia.	36
Fig. 5.7.- Las descargas epilépticas se producen en vigilia.....	38
Fig. 5.8.- Comparación del perfil espectral de las descargas epilépticas con el perfil de los estados del ciclo sueño vigilia.	38
Fig. 5.9.- Número de descargas epilépticas por minuto de vigilia en los días de inyección (I) y no inyección (NI).	39
Fig. 5.10.- Porcentaje de descargas epilépticas por 10 minutos a lo largo de dos horas de registro.....	41
Fig. 5.11.- Sueño durante el kindling.....	45
Fig. 5.12.- Histograma de Frecuencia Relativa (% con respecto al total de descargas epilépticas en días de inyección o no inyección) de las duraciones de las descargas epilépticas.....	46
Fig. 5.13.- Número de descargas epilépticas durante el kindling.	47
Fig. 5.14.- Representación gráfica de la probabilidad de registrar una descargas epilépticas en cada día del kindling.....	48
Fig. 5.15.- Duración Promedio de las descargas epilépticas durante el kindling.	49
Fig. 5.16.- Duración Promedio de las descargas epilépticas.	49
Fig. 5.17.- Análisis espectral de las bandas de frecuencia de las descargas epilépticas.	51
Fig. 5.18.- Tendencia de los poderes espectrales de las bandas del EEG durante el kindling.	52
Fig. 5.19.- Perfiles espectrales de las descargas epilépticas durante el kindling farmacológico con PTZ.....	53
Fig. 5.20.- Número y duración promedio de las descargas epilépticas post kindling farmacológico con PTZ.....	54
Fig. 5.21.- Comparación del poder espectral de las bandas de frecuencias en el día 44 con los días basal y 20.	55
Fig. 5.23.- Posiciones de las cánulas de inyección.	58

Fig. 5.24.- Registro de EEG posterior a la administración de 7-NI.	58
Fig. 5.25.- La inhibición de la nNOS induce un aumento en el número de descargas epilépticas.....	59
Fig. 5.26.- Perfil espectral de descargas epilépticas en presencia de 7-NI.....	60
Fig. 5.27.- El dador de NO, SNAP, disminuye la duración de las descargas epilépticas.	61
Fig. 5.28.- Perfil espectral de las descargas epilépticas de ratas con niveles corticales de NO aumentados.....	61
Fig. 6.1.- Esquema de la modulación de circuitos excitadores por interneuronas inhibitorias.	64

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.1.- Modelos animales utilizados en el estudio de la epilepsia y la epileptogénesis.....	12
TABLA 4.1.- Posiciones electrodos corticales.....	16
TABLA 4.2.- Posiciones cánulas corticales.....	17
TABLA 4.3.- Composición líquido cefalorraquídeo artificial.....	18
TABLA 4.4.- Concentraciones de drogas en las soluciones inyectadas y sus acciones en los experimentos de modulación de los niveles corticales de NO.	18
TABLA 4.5.- Criterios de clasificación de crisis epilépticas, según Luttjohann y colaboradores.....	21
TABLA 4.6.- Derivaciones para adquisición de datos.	22
TABLA 4.7.- Bandas de frecuencia analizadas en el EEG.....	25
TABLA 4.8.- Fórmula cuantitativa de la solución de PFA al 4%.	27
TABLA 5.1.- Número de descargas epilépticas en los días de inyección de PTZ.....	40
TABLA 5.2.- Número de descargas epilépticas analizadas en los días de no inyección de PTZ.....	40
TABLA 5.3.- Porcentaje de sueño NREM en los días de inyección de PTZ..	42
TABLA 5.4.- Porcentaje de sueño NREM en los días de no inyección de PTZ.	43
TABLA 5.5.- Porcentaje de sueño REM en los días de inyección de PTZ.....	44
TABLA 5.6.- Porcentaje de sueño REM en los días de no inyección de PTZ.....	45
TABLA 5.7.- Número de descargas epilépticas analizadas en los experimentos de modulación de los niveles de NO.....	57
TABLA 6.1.- Crisis epilépticas inducidas con PTZ en ratas adultas..	66
TABLA 6.2.- Fármacos antiepilépticos.....	75

ABREVIATURAS

<i>7-NI:</i>	7-Nitroindazol
<i>aLCR:</i>	Líquido ceforraquídeo artificial
<i>AMPA:</i>	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
<i>BDNF:</i>	Factor neurotrópico derivado de cerebro
<i>CLO:</i>	Ciclo luz-oscuridad
<i>CSV:</i>	Ciclo sueño vigilia
<i>DE:</i>	Descargas epilépticas
<i>EEG:</i>	Electroencefalograma
<i>ELT:</i>	Epilepsia del Lóbulo Temporal
<i>EMG:</i>	Electromiograma
<i>EPSP:</i>	Potencial excitador postsináptico
<i>FFT:</i>	Transformada de Fourier rápida
<i>GABA:</i>	Ácido γ -amino-butírico
<i>GABA-A:</i>	Receptor tipo A para GABA
<i>GABA-B:</i>	Receptor tipo B para GABA
<i>IC:</i>	Intracortical
<i>INN:</i>	International nonproprietary names
<i>IP:</i>	Intraperitoneal
<i>IPSP:</i>	Potencial inhibitor postsináptico
<i>IRR:</i>	Tasa de variación de la probabilidad de Poisson
<i>IV:</i>	Intravenoso
<i>LB:</i>	Línea base
<i>L-glut:</i>	L-glutamato
<i>L-NAME:</i>	N-nitro-L-arginina metil ester
<i>NMDA:</i>	Ácido N-metil-D-aspartico
<i>nNOS:</i>	Óxido nítrico sintasa neural
<i>NO:</i>	Óxido nítrico
<i>NOS:</i>	Óxido nítrico sintasa
<i>NREM:</i>	Non rapid eye movements
<i>PFA:</i>	Paraformaldehido
<i>PTZ:</i>	Pentilentetrazol
<i>REM:</i>	Rapid eye movements
<i>R-NMDA:</i>	Receptor para NMDA
<i>SE:</i>	Status epiléptico
<i>SNAP:</i>	S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
<i>SNC:</i>	Sistema nervioso central

RESUMEN

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) se desarrolla de manera progresiva durante la epileptogénesis, después de la cual se producen crisis epilépticas espontáneas. Para su estudio, se necesitan modelos animales bien caracterizados de este proceso, que permitan aclarar los mecanismos moleculares subyacentes, entre los cuales se encuentra el rol del óxido nítrico (NO), al cual la literatura ha dado roles controversiales.

En esta tesis, se utilizó como modelo experimental el kindling farmacológico con pentiléntetrazol (PTZ), que consiste en la administración de 10 dosis subconvulsivantes de PTZ, día por medio. Este modelo fue caracterizado conductual y electroencefalográficamente. Posteriormente, se realizaron experimentos con moduladores de los niveles corticales de NO.

Se analizaron conductualmente 3 dosis de PTZ (20, 30 y 40 mg/Kg) durante los días de inyección. El grado de crisis máximo alcanzado mostró que la intensidad de las crisis aumenta conforme aumenta la dosis de PTZ administrada. Además, se observó que a dosis bajas (20 mg/Kg) el aumento de la intensidad de las crisis evoluciona lentamente y no llega a grados 5 y 6 durante los 20 días que dura el kindling, lo que la hizo elegible para la caracterización electroencefalográfica de este modelo.

Se analizaron registros de electroencefalograma (EEG), tanto durante los días en que se inyectó PTZ (20 mg/kg) como en los días de no inyección (intermedios a éstas) y, a continuación, 25 días después de la última dosis de PTZ, cuantificando el número, la duración y el perfil espectral de las descargas epilépticas. Los niveles de óxido nítrico fueron modulados localmente en la corteza cerebral. El número de descargas epileptiformes aumentó durante el kindling, así como 25 días después de su finalización, lo que revela la inducción de un proceso epileptogénico auto-sostenible.

Las descargas epilépticas se caracterizaron por un aumento en las frecuencias de la banda theta (4-8 Hz), las que se asocian con crisis de tipo ausencia. Sin embargo, durante kindling, cuando la intensidad de las crisis epilépticas aumenta, la potencia espectral de la banda theta disminuyó progresivamente; mientras que, el poder de frecuencias más altas (banda beta bajo) aumentó. El NO en la corteza cerebral inhibió el número y la amplitud de las descargas epilépticas.

La caracterización electroencefalográfica de del kindling con PTZ proporciona un valioso modelo para detectar con precisión las consecuencias de las intervenciones terapéuticas en epileptogénesis, especialmente las dirigidas a detener este proceso. La producción local de óxido nítrico en la corteza cerebral podría ser útil para contrarrestar los efectos deletéreos y la propagación de las descargas epilépticas.

SUMMARY

Temporal lobe epilepsy (TLE) is developed in a progressive manner during epileptogenesis, after which spontaneous seizures occur. To study epileptogenesis, well-characterized animal models of this process are necessary to clarify underlying molecular mechanisms, among which nitric oxide (NO) has a controversial role throughout the literature.

In this thesis, a pharmacological kindling model was used by means of administration of 10 subconvulsive doses of pentylenetetrazole (PTZ), every other day. The characterization of this epileptogenesis model was monitored by behavioral and electroencephalographic recordings. Subsequently, NO levels in the cerebral cortex were modulated.

PTZ kindling was performed with three doses (20, 30 and 40 mg/Kg) to analyze behaviors during injection days. The maximum degree of seizure recorded each day shows that seizures intensity rises along the days of the protocol. In addition, at low PTZ doses (20 mg/kg), the seizure intensity increased slowly through the protocol, without reaching grades 5 or 6 during the 20 days of the kindling process making it a suitable dose for the electroencephalographic characterization of this model.

Electroencephalogram recordings (EEG) were analyzed, both during injection and inter-injection days. In addition, EEG recordings were performed 25 days after the last PTZ dose. The number, duration and spectral profile of epileptic discharges. Nitric oxide levels were modulated locally in the cerebral cortex. The number of epileptiform discharges increased during the kindling protocol, and 25 days after its completion, revealing the induction of a self-sustaining epileptogenic process.

Epileptic discharges were characterized by an increase in theta band frequency (4-8 Hz) associated with absence-like seizure. However, during the kindling protocol, when the intensity of seizures increases, the spectral power of the theta band

decreases progressively, while the power of higher frequencies (low beta band) is increased. NO in cerebral cortex inhibited the number and amplitude of epileptic discharges.

The electroencephalographic characterization of this PTZ kindling protocol provides a valuable model to detect precisely consequences of therapeutic interventions on epileptogenesis, especially those targeted towards stopping this process. Local production of nitric oxide in the cerebral cortex could be useful to counteract the deleterious effects and the propagation of epileptic discharges.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- EPILEPSIA

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, con una prevalencia a nivel mundial cercana al 1%, teniendo en América la mayor prevalencia [1]. Además, una de cada diez personas tendrá al menos una crisis epiléptica en su vida, aunque no todas desarrollarán epilepsia [2].

La epilepsia no es una enfermedad singular, sino que un síndrome de múltiples causas y síntomas clínicos, cuya característica común es la hiperexcitabilidad neuronal. Ésta se traduce en descargas epilépticas, es decir, alteraciones en la amplitud y la frecuencia del electroencefalograma (EEG) [2-4]. Frecuentemente, las descargas epilépticas generan crisis epilépticas, que se definen como una ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas originados por una actividad cerebral anormal recurrente o sincrónica [4]. Estas crisis pueden ser focales o generalizadas. Las crisis focales se originan en una estructura neuronal limitándose a un hemisferio cerebral. Las crisis generalizadas se propagan rápidamente, comprometiendo ambos hemisferios cerebrales. A su vez, las crisis focales se subdividen en crisis parciales simples o parciales complejas. Aquellas parciales simples no involucran pérdida de conciencia; mientras que, las parciales complejas comienzan sin afectar la conciencia pero secundariamente la comprometen [5].

Los síndromes epilépticos no son fácilmente clasificables, dado que existen múltiples factores que influyen en su manifestación [2, 4-6]. Se han propuesto clasificaciones de acuerdo a su etiología, tipo de crisis epiléptica, presencia o ausencia de anormalidades neurológicas o al desarrollo y presencia de características electroencefalográficas [6]. Así, según su etiología, las epilepsias se dividen en 4 categorías:

- Idiopáticas: se definen como epilepsias de origen predominantemente genético, en las cuales no hay anormalidades neuroanatómicas o neuropatológicas evidentes.

- Sintomáticas: se definen como epilepsias de causas adquiridas o genéticas, asociadas con anormalidades neuroanatómicas o neuropatológicas indicativas de la enfermedad o condición subyacente.
- Provocadas: se definen como epilepsias en que un factor sistémico o ambiental específico es la causa predominante de las descargas epilépticas y no hay cambios neuroanatómicos o neuropatológicos que la causen.
- Criptogénicas: se definen como epilepsias de presunta naturaleza sintomática, en la cual la causa no ha sido identificada [5, 7, 8].

1.2.- EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

El 60% de las epilepsias sintomáticas adquiridas corresponden a la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) [9], la cual se asocia con crisis epilépticas parciales complejas de origen temporal [10]. Éstas se caracterizan por hiperexcitabilidad en estructuras límbicas mesiales, generalmente esclerosis hipocampal y otras lesiones estructurales discretas [9]. La causa de la ELT es una injuria cerebral [11], que puede ser de naturaleza variada. Entre ellas se cuentan crisis epilépticas en la niñez, tumores o meningitis. En adultos mayores, las principales causas de ELT son infarto, enfermedades degenerativas, tumores, traumas e infección [12]. Estas injurias o insultos cerebrales inducen cambios permanentes en el cerebro que conducen a la manifestación de la epilepsia a través de un proceso llamado epileptogénesis [9].

La primera manifestación clínica de la ELT es una crisis epiléptica que puede ser generalizada o parcial [13]. En la ELT, la crisis parcial está generalmente precedida por un aura (primera manifestación sensorial de la crisis epiléptica), como molestias epigástricas asociadas a alteraciones emocionales como el llanto, manifestaciones psíquicas (por ejemplo los *déjà vu*), síntomas autonómicos (por ejemplo bochornos o taquicardia) o sensaciones gustatorias u olfatorias. La crisis epiléptica comienza con inmovilidad y automatismos oroalimentarios, por ejemplo chasquido de labios o masticaciones, con progresiva pérdida de conciencia hasta la pérdida total de ésta, es decir, hasta su generalización [14].

La ELT es la epilepsia farmacológicamente más refractaria, pero puede ser tratada en forma quirúrgica. El tratamiento farmacológico tiene como finalidad eliminar las crisis epilépticas con el menor número posible de efectos adversos [15]. El tratamiento comienza con fármacos anticonvulsivantes de primera línea en monoterapia, tales como fenitoína, carbamazepina, valproato de sodio, lamotrigina, oxcarbazepina, topiramato o levetiracetam. La dosis de cada fármaco es incrementada hasta que se logra erradicar las crisis epilépticas o hasta la ocurrencia de efectos adversos, como cansancio, discinesia, diploplía, alteración de la marcha, entre otros. Cuando la monoterapia no es suficiente, se utilizan combinaciones de fármacos, con lo que aumenta la efectividad y la probabilidad de efectos adversos. En algunos pacientes, las crisis epilépticas se hacen refractarias al tratamiento, lo que los hace candidatos para cirugía, que es una alternativa que permite eliminar las crisis en un gran número de pacientes, sobretodo en aquellos con esclerosis hipocampal unilateral [16].

1.3- EL HIPOCAMPO EN LA EPILEPTOGÉNESIS

El hipocampo contiene un circuito trisináptico excitatorio muy bien caracterizado (figura 1.1). La entrada al hipocampo está formada por los axones de la vía perforante, que hacen sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado. A su vez, los axones de las neuronas granulares (o fibras musgosas) contactan a las células piramidales de la capa CA3, que a su vez emiten las colaterales de Schaffer hacia la capa CA1 [17]. Este circuito es modulado por interneuronas inhibitorias GABAérgicas.

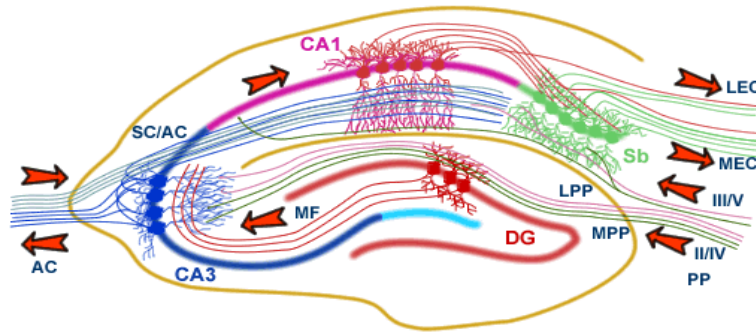


Fig. 1.1.- Circuito trisináptico excitatorio del hipocampo. Las flechas rojas indican la propagación del impulso nervioso a través del circuito excitatorio del hipocampo por las siguientes estructuras: vía perforante (PP), giro dentado (DG), fibras musgosas (MF), colaterales de Schaffer (SC/AC) y subiculum, (Sb).

En las sinapsis, el neurotransmisor se libera desde la terminación presináptica e interactúa con los receptores postsinápticos, generando cambios en la permeabilidad iónica de la membrana postsináptica, lo que determina cambios del potencial de membrana [18]. En las sinapsis excitatorias se genera un potencial depolarizante o potencial excitador postsináptico (EPSP); mientras que en las inhibitorias, se genera un potencial hiperpolarizante o potencial inhibitorio postsináptico (IPSP) [19].

En las sinapsis excitatorias glutamatérgicas, los terminales axónicos contactan espinas dendríticas, pequeñas protrusiones de alrededor de $1 \mu\text{m}^3$ que sobresalen desde las dendritas [20, 21]. En éstas existen dos tipos de receptores para glutamato, los receptores ionotrópicos, que son canales iónicos [22], y los receptores metabotrópicos, que son acoplados a proteína G [23]. Los receptores ionotrópicos se clasifican farmacológicamente en receptores tipo NMDA (sensibles al ácido N-metil D-aspartico), AMPA (sensibles al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) y kaínico (sensibles a ácido kaínico). Los receptores NMDA (R-NMDA) son heterotetrámeros formados por dos subunidades GluN1 (anteriormente denominadas NR1) y dos subunidades GluN2 (anteriormente denominadas NR2). Estas subunidades GluN2 son codificadas por 4 genes diferentes, dando origen a las subunidades GluN2A, B, C ó D [22]. A diferencia de los demás receptores glutamatérgicos, los R-NMDA conducen calcio, por lo que juegan un papel central en procesos como plasticidad sináptica, memoria, aprendizaje y formación de redes neuronales durante el desarrollo

[24-26]. Los R-NMDA están acoplados, directamente o a través de proteínas andamio, a diversas proteínas efectoras, como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), una enzima dependiente de calcio para su activación. De este modo, la estimulación sináptica lleva a activación de la nNOS y síntesis de óxido nítrico (NO), el cual es considerado un segundo mensajero en estas sinapsis. A su vez, el ingreso masivo de calcio durante una descarga epiléptica, lleva a daño neuronal por un fenómeno denominado excitotoxicidad. La excitotoxicidad produce muerte neuronal por apoptosis o por necrosis [27].

A su vez, en las sinapsis inhibitorias existen dos tipos de receptores para GABA; el receptor GABA tipo A (R-GABA_A) que es un canal iónico que conduce ión cloruro. El receptor GABA tipo B (R-GABA_B), que es metabotrópico [18, 19, 28]. Los receptores ionotrópicos son heteropentámeros compuestos generalmente por subunidades α , β y γ en una relación 2:2:1. Otras subunidades menos abundantes son las δ , ϵ , π y θ [29]. A su vez, cada subunidad tiene varias isoformas; y todas las combinaciones posibles de ellas originan R-GABA_A [29-31]. El R-GABA_B es un heterodímero, formado por dos subunidades. La unión de GABA al R-GABA_B activa la proteína G trimérica G_{i/o}. La subunidad α de la proteína G_o inhibe canales de calcio dependientes de voltaje o activa canales de potasio dependientes de calcio, induciendo así una hiperpolarización de la membrana [32]. Este circuito hipocampal está críticamente implicado en el proceso de la epileptogénesis que conduce a la expresión de epilepsia del lóbulo temporal.

1.4.- MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA EPILEPTOGÉNESIS

Durante la epileptogénesis se producen cambios morfofuncionales, tales como crecimiento de axones recurrentes en el giro dentado del hipocampo [33, 34], cambios en la morfología de las espinas dendríticas, aumento de la concentración de glutamato extracelular [35, 36] y aumentos en la concentración de calcio intraneuronal [37], entre otros. En forma concomitante, ocurre muerte neuronal por sobreestimulación glutamatérgica (o excitotoxicidad), pero también gliosis y neurogénesis [38, 39]. Estos cambios pueden originar un exceso en la neurotransmisión glutamatérgica y/o una deficiencia en la neurotransmisión GABAérgica, los que pueden ser la causa de

despolarizaciones mantenidas de la membrana neural y la consecuente generación de descargas epilépticas [40].

Estos cambios en la neurotransmisión están mediados, en parte, por una neurotrofina llamada BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) [41] y su receptor Trk-B [42] ya que BDNF estimula el crecimiento axonal y dendrítico, la liberación de neurotransmisores, y potencia las sinapsis glutamatérgicas [43-45]. Por otra parte, en las sinapsis glutamatérgicas se estimula la síntesis de NO. El NO puede ser sintetizado por todas las isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS), a partir de L-arginina. La NOS tiene 3 isoformas: neural (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). nNOS y eNOS son constitutivas y su actividad es dependiente de la concentración de calcio intracelular. Por otro lado, iNOS es expresada en respuesta a estímulos inmunológicos e inflamatorios y su acción es independiente de la concentración de calcio [46, 47]. Las 3 isoformas de la NOS están expresadas en el cerebro, nNOS se expresa en la corteza, hipocampo, amígdala y sustancia nigra; eNOS, en células endoteliales y en algunas neuronas, y la iNOS se expresa después de una injuria cerebral en astrocitos, neuronas y células endoteliales [48]. En el hipocampo, se ha demostrado que nNOS se expresa principalmente en interneuronas del giro dentado y de CA3 [49] y eNOS, en las células piramidales de CA1 y en las neuronas granulares del giro dentado [50]. nNOS está directamente implicada en la muerte neuronal por excitotoxicidad en el hipocampo [51]; mientras que, la eNOS regula el tono vascular y la presión sanguínea [52].

Los efectos celulares del NO están mediados básicamente por dos mecanismos: NO activa la guanilil ciclasa soluble (con síntesis de GMP cíclico), lo que regula diversas proteínas río abajo. Por otra parte, NO puede reaccionar directamente con residuos aminoacídicos. Uno de los aminoácidos más frecuentemente modificado por NO es la cisteína, proceso denominado S-nitrosilación [53]. Cuando NO se oxida a peroxinitrito (NO_2^\bullet), se modifican residuos amino-acídicos, como tirosina, por nitración. El estrés nitrosativo, vale decir, el exceso de la producción de NO en condiciones de estrés oxidativo, provoca neurodegeneración en diversas enfermedades. Por otra parte, el NO también puede tener efectos neuroprotectores [54]. Por ejemplo, entre los

blancos de la S-nitrosilación se encuentran las subunidades GluN1 y GluN2A del R-NMDA, lo que tiene efectos neuroprotectores, ya que se inhibe la actividad del R-NMDA, y por tanto, disminuye el influjo de calcio [55, 56].

En general, se acepta que la sobre-producción de NO en las sinapsis glutamatérgicas hiper-estimuladas son tóxicas para la células [54]. Sin embargo, también se han reportado efectos protectores, como la inhibición del R-NMDA recién descrita. Se ha planteado que los efectos opuestos del NO sobre neuroprotección vs. toxicidad pueden deberse a cambios cuantitativos en su síntesis: mientras niveles bajos serían neuroprotectores, niveles altos serían neurotóxicos [54]. Sin embargo, también es posible que NO sea sintetizado en microambientes celulares, por activación de diferentes vías de señalización. En este caso, formaría parte de complejos proteicos diferentes, lo que a su vez determina blancos diferenciales debido a la corta vida media de este gas (3-5 segundos) [46].

Experimentos realizados en el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes en cultivos neuronales hipocampales han mostrado que un insulto excitotóxico con NMDA disminuye la sobrevivencia neuronal, lo que se previene al utilizar un inhibidor de la NOS. Por otro lado, este mismo experimento realizado en cultivos de neuronas corticales muestra lo opuesto, vale decir, al inhibir la producción de NO, la sobrevivencia neuronal disminuye considerablemente [57]. Similarmente, se encontró recientemente una vulnerabilidad diferencial de neuronas corticales e hipocampales a la excitotoxicidad inducida por NMDA [58]. Al establecer que los niveles basales de NO son similares en corteza e hipocampo, se descarta que la concentración de NO sea determinante en la generación de efectos opuestos, es decir, neurotoxicidad vs. neuroprotección. Un factor diferencial en ambos tipos de cultivos neuronales es que la producción de NO en células corticales es estimulada por BDNF, mientras en el hipocampo es estimulada por NMDA [57]. Estos antecedentes nos permiten inferir que los blancos del NO probablemente son diferentes [57]. De hecho, se mostró que el NO producido en respuesta a BDNF es capaz de S-nitrosilar el R-NMDA, no así el NO producido en respuesta a NMDA. Además, al analizar el patrón de proteínas S-nitrosiladas en respuesta a NMDA o BDNF, en el Laboratorio de Neurociencias se ha

confirmado un patrón diferencial de proteínas S-nitrosiladas, confirmando que la vía celular que lleva a síntesis de NO determina sus blancos y el efecto fisiológico.

Estos resultados generaron un modelo celular cuya validez será en parte estudiada en animales sometidos a epileptogénesis en esta tesis, esquematizado en la figura 1.2. El modelo propone que la hiper-actividad neuronal en células hipocampales produce sobre-estimulación del R-NMDA, llevando al aumento de la concentración de calcio intracelular, que al unirse a calmodulina, induce la síntesis de NO mediante la activación de la nNOS y produce muerte celular por excitotoxicidad. Por otro lado, en células corticales (y por lo tanto en la corteza cerebral), el NO es sintetizado por una isoforma de la NOS aún no identificada, en respuesta a la interacción de BDNF con su receptor TrkB. En este caso, NO produce neuroprotección. Lo más probable es que en cada caso, los blancos del NO sean diferenciales.

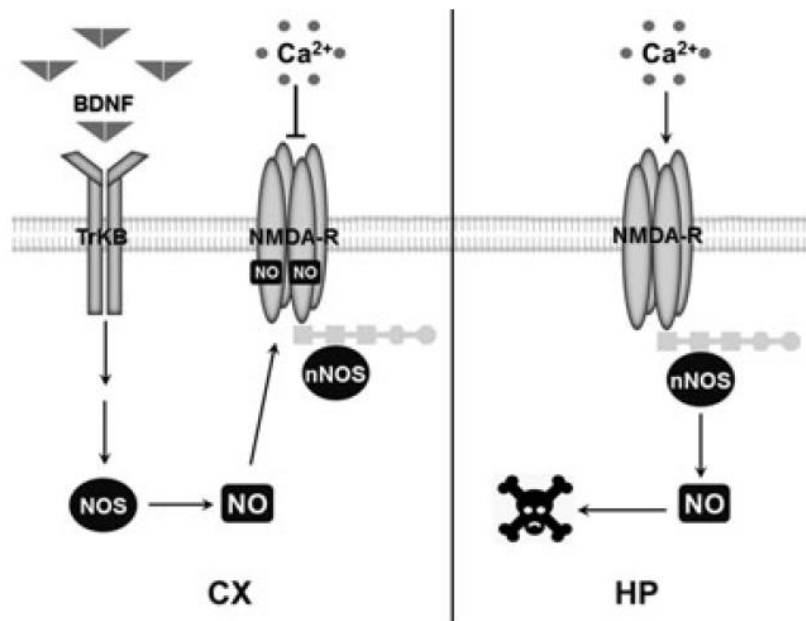


Fig. 1.2.- Mecanismo de acción diferencial propuesto para el NO en corteza (CX) e hipocampo (HP). En neuronas corticales, NO es sintetizado en respuesta a la neurotrofina BDNF, lo que lleva a S-nitrosilación (e inhibición) del R-NMDA, reduciendo el influjo de calcio a la célula. En neuronas hipocampales, NO es sintetizado en respuesta a NMDA, lo que tiene efectos neurotóxicos. Por motivos que se desconocen, en este caso el R-NMDA no es blanco de NO.

Hay diversos grupos que han investigado los efectos del NO en ratas. En estos estudios se administran inhibidores no selectivos de las isoformas de la NOS o inhibidores de la nNOS, vía intraperitoneal o intracerebroventricular, con resultados controversiales. Mientras algunos estudios otorgan al NO un efecto pro-epileptogénico [59-61], en otros, resulta ser anti-epileptogénico [62], no tiene efecto [63] o depende de las condiciones experimentales [64]. Por otra parte, el efecto pro-epileptogénico de NO en el hipocampo ha sido claramente establecido [49]. En estas investigaciones no se ha llevado a cabo el análisis de los fenómenos que ocurren en corteza cerebral en forma separada.

1.5.- MODELOS EXPERIMENTALES

Para el estudio de la epilepsia y la epileptogénesis, los modelos animales se agrupan en dos grandes categorías, los agudos y los crónicos. En los modelos agudos, los agentes convulsivantes se administran en dosis tales que, posterior a una administración única, se induce *status epilepticus*, vale decir, una crisis epiléptica prolongada [65]. Estos agentes convulsivantes antagonizan la neurotransmisión inhibitoria (mediada por ácido γ -amino-butírico o GABA) o estimulan la neurotransmisión excitatoria (mediada por L-glutamato) [66, 67]. A su vez, en los modelos crónicos se administran estímulos subconvulsivantes de manera repetitiva, procedimiento que se denomina kindling.

El kindling es un modelo experimental en el cual se puede caracterizar la naturaleza progresiva de la epileptogénesis [68]. Las crisis epilépticas inducidas por el kindling son similares a las crisis epilépticas parciales que progresan a generalizadas, observadas en los pacientes con ELT [67] y permiten evaluar cambios progresivos en el funcionamiento cerebral. Su valor radica en que podrían servir de base para el estudio de intervenciones capaces de inhibir la epileptogénesis, es decir, el proceso que lleva al desarrollo de la epilepsia. El kindling puede realizarse a través de una estimulación eléctrica o farmacológica.

En el kindling eléctrico se estimulan circuitos cerebrales específicos de forma repetitiva, utilizando magnitudes de estimulación subconvulsivantes [67]. Las primeras estimulaciones inducen crisis epilépticas de baja duración y mínimas manifestaciones conductuales. Luego de repetidas estimulaciones, las crisis epilépticas son más largas y más intensas. El incremento de la duración de las crisis epilépticas sugiere que la resistencia de los circuitos a la actividad convulsiva se debilita. Es claro que el kindling resulta en cambios de la capacidad del cerebro para limitar las crisis epilépticas [69]. Cada descarga epiléptica tiene efectos nocivos sobre el funcionamiento cerebral, lo que comprende aspectos moleculares, celulares, anatómicos y funcionales.

En el kindling farmacológico, todo el sistema nervioso es estimulado farmacológicamente; sin embargo, las estructuras mesiales son más susceptibles a desarrollar cambios pro-epilépticos [70]. Uno de los modelos animales más utilizados es el kindling farmacológico con pentilentetrazol (PTZ), un derivado del tetrazol que bloquea receptores GABA_A con acción convulsivante en mamíferos [44].

Para estudiar las estructuras neuronales activadas por PTZ, se ha usado inmunodetección de la expresión del gen temprano c-Fos. La inducción de crisis epilépticas por una sola dosis de PTZ aumenta significativamente la marca de c-Fos en regiones corticales y del hipocampo, especialmente en el giro dentado [71], en forma dosis-dependiente. A su vez, una crisis prolongada aumenta la expresión de c-Fos en prácticamente todas las áreas cerebrales [72]. Por otro lado, administraciones repetitivas de PTZ inducen un aumento gradual del marcaje con c-Fos, siendo nuevamente el giro dentado del hipocampo la estructura con el aumento más marcado [73].

La farmacocinética de PTZ está descrita en ratas por una ecuación bi-exponencial, consistente con un modelo de dos compartimentos. Los parámetros farmacocinéticos muestran una rápida absorción y biodisponibilidad 100%, post inyección subcutánea [74]. Posterior a una administración intravenosa (i.v.) de 20 mg/Kg, la vida media de eliminación es de 116 ± 35 min [75, 76], el volumen de

distribución aparente en el estado estacionario es 896 ± 134 mL/Kg y el clearance total $5,36 \pm 0,34$ mL/min/Kg. La excreción renal es la principal ruta de eliminación, correspondiendo el 75% de la dosis excretada en la orina a PTZ en forma inalterada [75]. PTZ es parcialmente biotransformado por el hígado en metabolitos farmacológicamente inactivos [74, 75, 77]. La unión a proteínas plasmáticas es despreciable [76]. Posterior a una dosis i.p. de PTZ, la concentración umbral en el cerebro de la rata es de $45 \mu\text{g/g}$ y después de una dosis i.v., $46 \mu\text{g/g}$ [78]. El máximo efecto de PTZ se produce con una concentración 2,5 veces mayor que la concentración umbral [76]. La tasa global de partición cerebro/plasma de PTZ es una relación lineal a bajas dosis (menores de 25 mg/Kg); por otro lado, un incremento de la dosis i.p. administrada de 25 a 50 mg/Kg triplica la concentración cerebral, debido probablemente a que los mecanismos de eflujo de PTZ al SNC son realizados mediante un proceso activo saturable [74].

PTZ ha demostrado ser un buen predictor de eficacia clínica en fármacos que inhiben el influjo de Ca^{+2} , a través de canales de tipo T, o que estimulan la neurotransmisión mediada por receptores GABA. Existen muchos modelos adicionales de epilepsia que se resumen en la tabla 1.1.

Tipo	Modelo	Tipo	Modelo
<u>Estimulación eléctrica</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Shock eléctrico máximo (MES) • Status epilepticus autosostenido • Kindling 	<u>Estimulación farmacológica: kindling</u>	<ul style="list-style-type: none"> • PTZ • Beta carbolina • Picrotoxina • Bicuculina • Cocaína • Lidocaína
<u>Estimulación farmacológica: Agentes no convulsivantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> • γ-hidroxibutirato • Penicilina • Gaboxadol • PTZ (bajas dosis) 	<u>Estimulación farmacológica: Agentes convulsivantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> • PTZ (altas dosis) • Bicuculina • Picrotoxina • Ácido kaínico • Pilocarpina
<u>Radiación</u>	Radiación <i>in utero</i>	<u>Agentes convulsivantes localmente administrados</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Alúmina gel • Toxina tetánica • Cefalosporinas • Hierro • Penicilina sódica
<u>Trauma</u>	Injuria cerebral por percusión de fluidos		
<u>Hipoxia</u>	Oclusión vascular		

Tabla 1.1.- Modelos animales utilizados en el estudio de la epilepsia y la epileptogénesis [68]. El MES consiste en la estimulación eléctrica a través de clips en los oídos o en las córneas de roedores, resultando en la extensión tónica de las patas traseras. El kindling eléctrico estimula circuitos cerebrales específicos de forma repetitiva, utilizando magnitudes de estimulación subconvulsivantes.

En los modelos de epilepsia adquirida se utilizan mayoritariamente las manifestaciones conductuales para caracterizar la progresión de la epileptogénesis. Así, el grado de convulsiones se categorizan comúnmente mediante la escala de Racine [79], la que sin embargo, no se puede aplicar a la epileptogénesis con PTZ [80]. Para lograr una mayor precisión en el estudio de este modelo ampliamente utilizado, sería óptimo contar con registros electroencefalográficos en los cuales la detección de descargas epilépticas ayudaría a un análisis objetivo de los efectos de intervenciones farmacológicas. Considerando estos antecedentes y el efecto neuroprotector de NO en neuronas corticales, se planteó la siguiente hipótesis:

2.-HIPÓTESIS

El kindling farmacológico con pentilentetrazol produce descargas epilépticas en la neocorteza, que se mantienen en el tiempo y son sensibles a la modulación por óxido nítrico.

3.-OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar electroencefalográficamente el proceso de kindling farmacológico con pentilentetrazol. Determinar en este modelo farmacológico si el óxido nítrico modula la generación y duración de descargas epilépticas en la corteza cerebral.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Caracterizar las manifestaciones conductuales del kindling farmacológico con PTZ.
- ii. Caracterizar las descargas epilépticas en el EEG de ratas sometidas a kindling farmacológico con PTZ.
- iii. Determinar si el kindling farmacológico con PTZ es sostenido en el tiempo y por tanto, corresponde a un modelo de epilepsia.
- iv. Determinar el efecto de NO sobre las descargas epilépticas, modulando NO localmente en la corteza cerebral.

4.-METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 250-300 g. La tesis fue dividida en dos partes: la primera permitió caracterizar conductual y electroencefalográficamente el kindling farmacológico con PTZ, y la segunda, manipular los niveles de NO en la corteza cerebral y así determinar el papel del NO en la generación y características de las descargas epilépticas.

El establecimiento de la dosis de PTZ a administrar a las ratas fue realizada a través de la observación conductual, para lo cual se utilizaron 3 dosis (20, 30 y 40 mg/Kg). En base a que las dosis mayores (30 y 40 mg/Kg) generan convulsiones de grado 5 y 6 en los primeros días del protocolo, se eligió la dosis más baja para la caracterización electroencefalográfica, que requiere de implante de electrodos capaces de generar registros estables en el tiempo. Los registros electroencefalográficos se realizaron en el Laboratorio de Sueño y Cronobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Doctor Adrián Ocampo Garcés.

4.1.- ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 250 a 300 g, provenientes del Vivero Central de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas fueron mantenidas con ciclo luz oscuridad 12:12, en jaulas individuales y con libre disposición de agua y comida durante todo el experimento. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Los Andes. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

En los grupos experimentales se utilizó el siguiente número de ratas:

- Análisis conductual de crisis epilépticas a dosis de 20 mg/Kg: 8 ratas.
- Análisis conductual de crisis epilépticas a dosis de 30 y 40 mg/Kg: 10 ratas

- Análisis electroencefalográfico del proceso de kindling: 5 ratas
- Análisis electroencefalográfico de la persistencia de los efectos del kindling: 10 ratas
- Análisis electroencefalográfico de los efectos del NO sobre el kindling: 10 ratas
- Número total de ratas utilizadas: 43 ratas

4.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

4.2.1.- Protocolo quirúrgico.

La cirugía fue realizada bajo anestesia general con la combinación de xilacina 2% (1g/100g peso vivo i.p.) y ketamina 10% (5g/100g peso vivo i.p.). Una vez comprobado el estado de depresión disociativa del animal, se dio inicio a la preparación quirúrgica.

La parte superior del cráneo de la rata fue depilada con una rasuradora eléctrica. Posteriormente, fue posicionada en un estereotáxico para la fijación de la cabeza. Se aplicó una solución antiséptica de povidona yodada sobre el área depilada, utilizando una varilla de algodón. La cirugía comienza con una incisión con bisturí en la línea media de la superficie craneal, desde un centímetro anterior a bregma hasta el comienzo de la musculatura de la nuca. La incisión fue ampliada mediante la sujeción de la piel lateral con pinzas anatómicas. El tejido subcutáneo y el periostio fueron removidos mediante el uso de una varilla de algodón. Con un taladro eléctrico con broca de 44 mm de largo y cabeza de 0,9 mm de diámetro se realizaron las perforaciones para los tornillos y las cánulas, según las coordenadas mostradas en las tablas 1 y 2. Los electrodos corticales corresponden a tornillos de acero de 4,7 mm de largo y 1,7 mm de diámetro soldados a un cable de acero inoxidable con aislamiento de teflón (con excepción de sus extremos). Los electrodos fueron atornillados a la calota y fijados con acrílico dental autocurable. Las cánulas guías (Plastic One, 26G y 1mm de largo) fueron fijadas a los electrodos 1 y 2 y al cráneo con una capa de acrílico dental autocurable. La cánula de inyección (Plastic One, 33G) se proyecta 0,3 mm de la cánula guía. Posteriormente, se implantaron los 2 electrodos musculares, que corresponden a cables de acero inoxidable aislado con teflón (a excepción de sus

extremos), con forma de anzuelo, con la ayuda de una aguja G22, con la cual se pincharon los músculos de la nuca en forma bilateral a la línea media, y se comprobó el correcto enganche mediante el estiramiento del electrodo. Los electrodos fueron soldados a conectores hembra y sellados herméticamente con acrílico dental autocurable.

El día de la cirugía y los dos días posteriores, las ratas fueron tratadas con enrofloxacino 5% i.p. (2.5mg/Kg, Centrovét Ltda.) y ketoprofeno 1% subcutáneo (0.5mg/Kg, Sanofi Pasteur S.A.) para evitar posibles infecciones y disminuir el sufrimiento de los animales.

4.2.2.- Implante de Cánulas y Electrodo.

Las ratas fueron implantadas con 3 electrodos corticales para la adquisición del electroencefalograma (EEG) y con 2 electrodos en la musculatura de la nuca para registro de electromiograma (EMG). Las posiciones de los electrodos corticales se muestran en la tabla 4.1 y en la figura 4.1.

Electrodo	Posición Anteroposterior (Referencia)	Posición Medio Lateral
1	-2,5 (Bregma)	+ 4,0
2	-2,5 (Bregma)	- 4,0
3	- 2,0 (Lambda)	+ 0,0

Tabla 4.1.- Posiciones Electrodo Corticales.

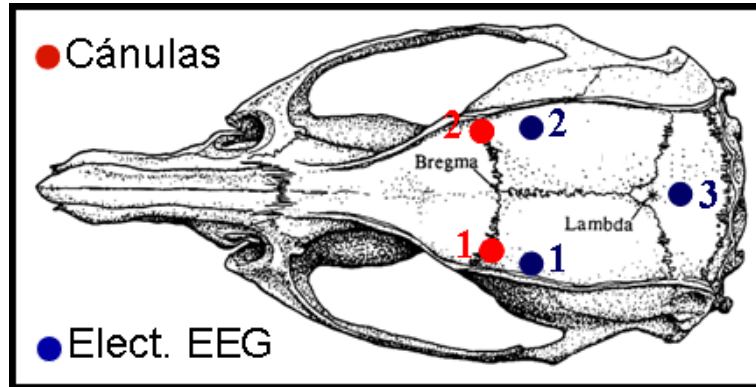


Fig. 4.1.- Posiciones de cánulas y electrodos corticales. En la figura se observa un esquema del cráneo de la ratona. En azul se señalan los electrodos corticales y en rojo las cánulas de inyección.

Además, se implantaron dos cánulas intracorticales para inyección de fármacos. La posición de las cánulas se muestra en la tabla 4.2 y en la fig 4.1. El protocolo de cirugía es idéntico al descrito en el punto 4.2.2.

Cánula	Posición Anteroposterior (Referencia)	Posición Medio Lateral	Ángulo Anteroposterior
1	+ 0,0 (Bregma)	+ 4,0	+ 11°
2	+ 0,0 (Bregma)	- 4,0	+ 11°

Tabla 4.2.- Posiciones Cánulas Corticales.

4.3.- SOLUCIONES Y AGENTES FARMACOLÓGICOS

4.3.1.- Pentilentetrazol (PTZ)

El PTZ (Sigma N° Catálogo P6500), fue diluido en suero fisiológico para la administración i.p. de las ratas. Las dosis utilizadas para los experimentos fueron 20, 30 y 40 mg/Kg. El volumen a administrar nunca superó 1 mL.

4.3.2.- Moduladores de los niveles corticales de óxido nítrico.

Todos los agentes farmacológicos utilizados en los experimentos de modulación de niveles de NO fueron administrados intracorticalmente (IC) y se utilizaron como vehículo líquido céfalo raquídeo artificial (LCRa). El volumen administrado corresponde a 0,5 μ L, medidos con una jeringa Hamilton de 10 μ L. Las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 4.4.

La composición del LCRa se muestra en la siguiente tabla:

Reactivo	Concentración (mM)	Cantidad (mg) para 100 mL
NaCl	124,00	72,5
KCl	3,00	22,0
NaHCO ₃	26,00	218,0
CaCl ₂ /2H ₂ O	2,00	29,0
MgSO ₄ /7H ₂ O	1,00	25,0
KH ₂ PO ₄	1,25	17,0
D-Glucosa	10,00	180,0
Agua tridestilada		Csp. 100 mL

Tabla 4.3.- Composición Líquido Cefalorraquídeo Artificial.

Reactivo	Acción	Concentración
SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina)	Dador de NO	200 μ M
MK801 (Dizocilpina)	Antagonista selectivo no competitivo R-NMDA	5 μ g/ μ L
7-NI (7-Nitroindazol)	Inhibidor selectivo nNos	300 μ M

Tabla 4.4.- Concentraciones de drogas en las soluciones inyectadas y sus acciones en los experimentos de modulación de los niveles corticales de NO. En la tabla se muestran en la primera columna las abreviaturas de los nombres y en la línea siguiente y entre paréntesis los nombres DCI correspondientes.

Una semana después del implante, se comenzó a hacer el registro electroencefalográfico de las ratas para establecer las características del EEG basal, o línea base, en la cual no se espera encontrar alteraciones electroencefalográficas. Luego, las ratas fueron sometidas al kindling, que consistió en la administración de 10 dosis i.p. de 20 mg/Kg de PTZ día por medio, y registros diarios durante 2 horas en los 20 días del protocolo. Luego, en el día 44 después del inicio del protocolo nuevamente se registró el EEG.

Para la segunda parte se implantaron 2 cánulas de inyección en la corteza somatosensorial además de los electrodos de registro. Estas ratas fueron registradas a partir del día 20 del protocolo, día que se utilizó como referencia para las características de las descargas epilépticas y, en los días 21 y 23, se les administró moduladores de los niveles de NO: en el día 21 se usó el 7-NI, un inhibidor selectivo de la nNOS, y MK-801, un antagonista del R-NMDA. En el día 23, se usó SNAP, un dador de NO. Las ratas sometidas a la modulación de los niveles de NO fueron profundizadas con paraformaldehído, bajo anestesia general, para realizar la tinción de Nissl y determinar la posición de las cánulas de inyección.

Los registros electroencefalográficos de las ratas usadas para la caracterización del kindling fueron inspeccionados visualmente para determinar las anomalías presentes en las ratas epilépticas y ausentes en la línea base. Esta inspección mostró que todas las ratas sometidas a kindling mostraban ondas con forma de poliespigas de características espectrales constantes que interrumpían el registro de vigilia, tanto en los días de inyección de PTZ como en los intermedios. Estas alteraciones son descargas epilépticas, las que fueron analizadas en relación a su número, duración y perfil espectral.

4.4.- DISEÑOS EXPERIMENTALES

4.4.1.- Diseño experimental de análisis conductual de kindling farmacológico a dosis altas de PTZ (20, 30 y 40 mg/Kg).

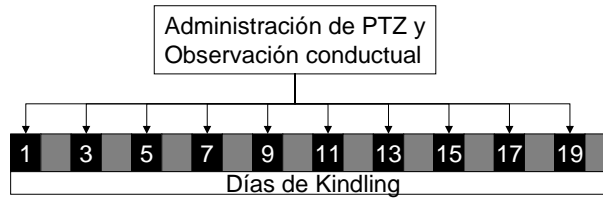


Fig. 4.2.- Diseño experimental para análisis conductual del kindling farmacológico. En la figura, se observan en negro los 10 días en que se administra el PTZ 20, 30 ó 40 mg/kg; mientras que, en gris los días intermedios a éstos.

4.4.2.- Diseño experimental de caracterización electroencefalográfica del kindling farmacológico con 20 mg/Kg de PTZ.

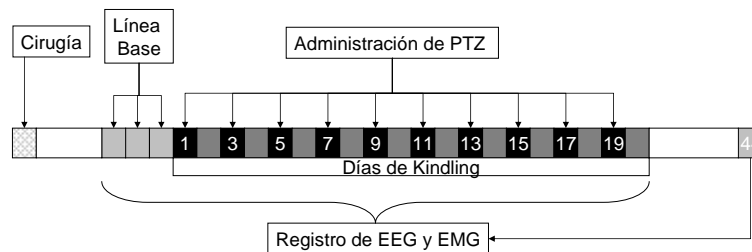


Fig. 4.3.- Diseño experimental del kindling farmacológico. En la figura se observa la línea temporal del proceso de kindling, desde la cirugía hasta el día 44. La cirugía es seguida de un período post-operatorio de 7 a 10 días. Durante los dos últimos días del post-operatorio, las ratas se habitúan al sistema de registro. Luego, se registra el EEG control o basal durante 3 días para verificar la ausencia de descargas epilépticas. Posteriormente, se sigue registrando diariamente durante los 20 días del protocolo. Los números con fondo negro indican los días en que se administró el PTZ y en fondo gris, se indican los días intermedios. Siguen 23 días sin registro, y luego se realiza el último día de registro, que corresponde al día 44 contado desde la primera administración de PTZ.

4.4.3.- Diseño experimental de modulación de los niveles corticales de NO.

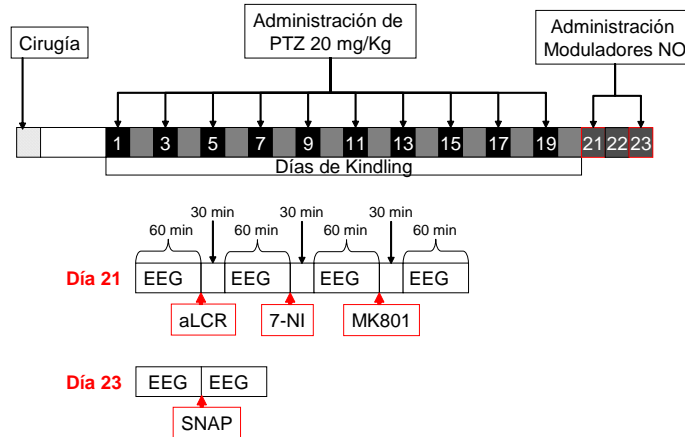


Fig. 4.4.- Diseño experimental de modulación de los niveles corticales de NO. En la figura se indica el día de la cirugía de implante de las cánulas y los electrodos, el período post-operatorio (5-7 días), el período de kindling y los 3 días de experimentación con los niveles de NO.

4.5.- ANÁLISIS CONDUCTUAL

Las ratas sometidas a dosis altas de PTZ (30 ó 40 mg/Kg) fueron observadas y filmadas por una hora post-inyección de PTZ por 3 alumnos de Medicina de la Universidad de los Andes. Durante este período, sus conductas fueron clasificadas y cuantificadas según los criterios de Luttjohann y colaboradores [80] en alguno de los grados de crisis epiléptica que se muestran en la tabla 4.5.

Grado	Manifestación Física
Grado 0	Sujeto normal.
Grado 1	Detención repentina y/o mirada fija.
Grado 2	Movimientos faciales que pueden incluir el hocico y/o el ojo.
Grado 3	Movimientos del cuello.
Grado 4	Crisis epiléptica clónica en posición sentada.
Grado 5	Crisis epiléptica tónica o tónico-clónica en posición sobre el vientre.
Grado 6	Crisis epiléptica tónica o tónico-clónica con pérdida de postura.

Tabla 4.5.- Criterios de clasificación de crisis epilépticas, según Luttjohann y colaboradores.

Los alumnos fueron entrenados en el reconocimiento de las manifestaciones físicas de las crisis epilépticas y su graduación, realizando sus observaciones por separado, de manera que se obtuvieran resultados objetivos. Los datos fueron promediados y con este promedio se construyeron los gráficos que dieron cuenta de los resultados.

4.6.- REGISTRO Y ADQUISICIÓN DE DATOS ELECTROENCEFALOGRÁFICOS (EEG) Y ELECTROMIOGRÁFICOS (EMG)

Para el registro del EEG, las ratas fueron colocadas en una caja de paredes de acrílico transparente de 40X40X40 cm de largo, ancho y alto sin tapa, dentro de una jaula de aislamiento acústico con iluminación con luz fría de 300 lux. Dentro de esta caja se encuentra un conmutador anclado a una pluma de contrabalanceo que permite el libre movimiento de la rata durante los experimentos. La rata fue conectada a un cable de conexión constituido por dos conectores machos, uno en cada extremo, que se utilizan para comunicar el conector implantado en la cabeza de la rata y el conmutador del sistema de adquisición. Las derivaciones utilizadas se muestran en la tabla 4.6:

Canal	Electrodo Activo	Electrodo de Referencia
EEG 0	1	3
EEG 1	2	3
EMG	Músculo 1	Músculo 2

Tabla 4.6.- Derivaciones para adquisición de datos.

Un amplificador (Grass Modelo 15LT) recibió la señal bioeléctrica desde el conmutador conectado a la rata. La señal de EEG fue filtrada analógicamente en pasabanda 0.1 a 30 Hz y amplificada analógicamente entre 2000 y 5000 veces, y la señal de EMG, filtrada en pasabanda de 30 a 100 Hz y amplificada analógicamente entre 5000 y 10000 veces. Además, se aplicó un *notch-filter* de 50 Hz. La adquisición estuvo mediada por una tarjeta de conversión Análogo/Digital de 8 bits (*National*

Instruments), con tasa de muestreo de 250 Hz. Una interfase Lab-View (*National Instruments*) desplegó el registro polisomnográfico (EEG + EMG) a tiempo real en ventanas de 15 segundos y almacenó la señal en archivos de segmentos de 10 minutos para su procesamiento fuera de línea [81].

4.7.- ANÁLISIS DEL EEG

El registro fue visualizado y analizado fuera de línea en el ambiente de Igor PRO 6.0 (Wavemetrics Inc.). El registro fue clasificado dentro de uno de estos estados de acuerdo a características electroencefalográficas y electromiográficas. Así el sueño NREM (*Non rapid eye movements*) se caracteriza por la presencia de ondas delta (1.5-4 Hz) en el EEG, ausencia de espigas musculares y tono muscular presente y el sueño REM (*Rapid eye movements*) es identificable por desincronización cortical, presencia de actividad en la banda theta (4-8 Hz) en el EEG y atonía muscular; mientras que la vigilia es distinguible por desincronización cortical y presencia de espigas musculares relacionadas a la actividad locomotora o tono motor elevado.

En las ratas sometidas a kindling, se observaron alteraciones electroencefalográficas caracterizadas por una disminución de la frecuencia y aumento de la amplitud de las ondas durante la vigilia. Éstas fueron denominadas descargas epilépticas.

4.8.- ANÁLISIS DE DESCARGAS EPILÉPTICAS (DE)

Las descargas epilépticas en el EEG, que sólo se observaron durante la vigilia, se definieron visualmente como poliespigas de mayor amplitud y menor frecuencia que las ondas de vigilia, de duración mayor o igual a un segundo. Dos descargas epilépticas se consideraron eventos independientes si el intervalo entre ellas era mayor de un segundo.

Se analizó el número de descargas epilépticas (presentes en vigilia), la duración de cada descarga y sus características espectrales mediante el algoritmo de la transformada de Fourier rápida (figura 4.5), aplicando una ventana de Hanning para evitar artefactos espectrales, pues la resolución espectral depende de la duración de la descarga. Así, el espectro promedio fue obtenido previo re-muestreo a una resolución homogénea de 0,5 Hz. El poder espectral total (área del espectro) se normalizó a 1. Para evaluar la contribución de bandas de frecuencia específicas, el poder espectral se dividió en bandas discretas (tabla 4.7), por lo tanto, el área bajo la curva calculada en cada una de ellas corresponde a una fracción del poder espectral total. Cada día del protocolo fue caracterizado por un poder espectral promedio de todas las descargas epilépticas presentes.

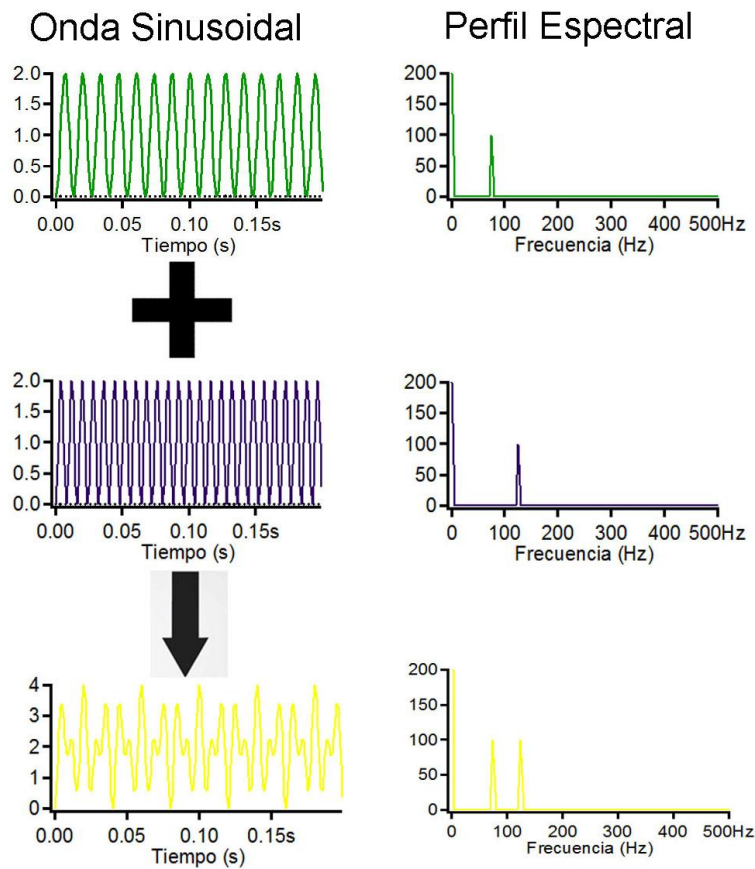


Fig. 4.5.- Algoritmo de la Transformada de Fourier Rápida A la izquierda se observan 3 ondas sinusoidales, las dos primeras (verde y azul) son ondas simples (de frecuencia única) y la onda amarilla es la resultante de la suma de las ondas verde y azul. A la derecha se observa el perfil espectral de cada onda, obtenido por el análisis de la Transforma de Fourier Rápida.

Banda de EEG	Rango de Frecuencias
Delta	1,5 – 4 Hz
Theta	4 – 8 Hz
Alfa	8 – 10 Hz
Beta bajo	10 – 15 Hz
Beta alto	15 – 30 Hz

Tabla 4.7.- Bandas de frecuencia analizadas en el EEG. En la tabla se muestran las bandas de frecuencia utilizadas en el análisis del EEG.

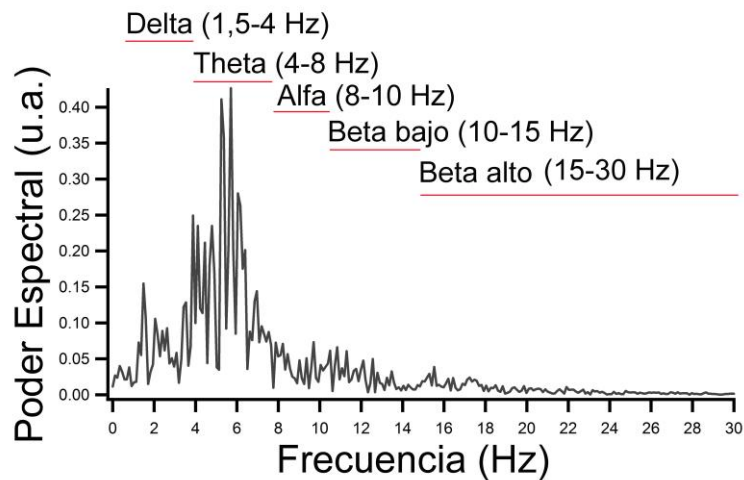


Fig. 4.6.- Perfil espectral de una descarga epiléptica. En el gráfico se observa el perfil espectral de una descarga epiléptica, obtenido mediante el análisis de la Transformada de Fourier. Sobre el gráfico se señalan las bandas de frecuencia que se analizaron. Las líneas rojas muestran el rango de frecuencias que comprende cada banda.

4.9.- PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS DE RATAS SOMETIDAS A IMPLANTES DE CÁNULAS

4.9.1.- Fijación de cerebros por perfusión intraventricular.

4.9.1.1.- Preparación y Anestesia

La rata fue anestesiada con Ketamina (100 mg/Kg) y Xilacina (30mg/Kg). Una vez anestesiada, en la campana de extracción, la rata fue fijada a la tabla de disección con cinta de papel.

4.9.1.2.- Incisiones para llegar al corazón

Se efectuó un corte longitudinal en la línea media a la altura de la base del tórax, de 4 cm aproximadamente. Luego se realizó un corte transversal en la base del tórax y luego longitudinalmente a través de las costillas, por ambos lados. El diafragma fue cortado desde su zona de inserción costal sin dañar el corazón. El tórax fue levantado y se sostuvo con una pinza Kelly para mantener expuesto el corazón. Con una espátula redonda, se levantó el pulmón izquierdo de la rata y se obstruye con una pinza Kelly la aorta descendente para el bloqueo del sistema descendente de circulación.

4.9.1.3.- Perfusión

Sobre la base del ventrículo izquierdo se realizó una pequeña incisión de medio centímetro aproximadamente. Se introdujo una cánula roma dentro del ventrículo izquierdo y se fijó con una pinza Kelly. Una vez fijada la cánula y comprobada su posición, se dio inicio a la bomba peristáltica de perfusión.

La sangre fue eliminada perfundiendo con 80 mL de PBS 1X a 37°C (flujo 10-12 mL/min; tiempo máximo 7 min). Se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y las soluciones de perfusión. Posteriormente, se

perfunde con 50 mL de PFA 4% a 37°C (flujo 7-10 mL/min). Se detiene brevemente la perfusión y se continúa con 250 mL de PFA 4% a 4°C (flujo 7-10 mL/min). Para finalizar se deja la rata perfundida sobre hielo por 10 a 15 min.

4.9.1.4.- Extracción y procesamiento de cerebros

Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron por 2 horas en PFA 4% frío. Posteriormente, fueron deshidratados con sacarosa al 15% por 24 a 48 horas y luego con sacarosa al 30% por 24 a 48 horas.

4.9.1.5.- Soluciones utilizadas

4.9.1.5.1.- Solución de PFA al 4% en 0,1 M PB (tampón fosfato) a pH 7,4

Reactivo	Cantidad para 1 L
PFA (Paraformaldehído)	40,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,0 g
NaH ₂ PO ₄ /H ₂ O	3,1 g
Agua bidestilada	Csp. 1 L
HCl y NaOH	Csp. pH 7.4

Tabla 4.8.- Fórmula cuantitativa de la solución de PFA al 4%.

4.9.2.- Tinción de Nissl

Los cerebros de las ratas perfundidos fueron delipidados con alcohol 100% y xileno. Luego fueron rehidratados con soluciones alcohólicas de concentración decrecientes y agua destilada. Una vez rehidratados, fueron teñidos con violeta de cresilo y nuevamente deshidratados y montados con Entellan en portaobjetos previamente gelatinizados. Se dejaron secar antes de tomar las fotografías para la determinación de las posiciones de los electrodos y las cánulas.

4.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Intercooled Stata versión 9.2 para Windows. Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente consideran $p < 0,05$ como significativo.

A continuación, se realiza una pequeña reseña de las pruebas estadísticas usadas en el análisis de los resultados. La utilización de cada test será señalada en el resultado correspondiente.

4.10.1.- Test de Student

El test de t de student permite medir la diferencia entre dos promedios de una muestra con distribución normal [82], a través de dos modalidades:

Prueba de t no pareada: permite comparar dos grupos independientes de observaciones con respecto a una variable numérica [83].

Prueba de t pareada: permite medir la diferencia en los promedios de pares de muestras pareadas. Este test suele ser efectivo en la eliminación parcial de los efectos de factores externos [84].

En los resultados de esta tesis se utilizaron ambas modalidades, permitiendo expresar los resultados como promedio \pm desviación estándar.

4.10.2.- ANOVA de una vía (one-way)

Es un método de comparación simultánea de varias medias en un solo paso. Su objetivo es determinar si alguno de los valores medios difiere significativamente del resto [83]. Se realiza cuando aumenta el número de grupos a comparar y la realización de test de Student individuales no es posible por el aumento del error tipo I (aumento

de la probabilidad de tener un test con significancia estadística, cuando la hipótesis nula es verdadera) [82].

4.10.3.- ANOVA de medidas repetidas

Los modelos de ANOVA con medidas repetidas permiten estudiar un efecto a lo largo de una serie de puntos de observación o intervenciones [85], en un diseño de una sola muestra de sujetos (diseño simple) como con diseño de dos o más muestras (diseño multimuestra) [86]. Las ventajas de la ANOVA con medidas repetidas es que se requiere un número de sujetos menor y permite eliminar la variación residual debida a las diferencias entre éstos [87]. Para verificar el grado en que la matriz de covarianza se desvía de la circularidad se utiliza el factor de ajuste Epsilon (ϵ), el cual es calculado, para esta tesis, con el método de Huynh y Feld ($H-F \epsilon$), que se obtiene a partir de estimaciones insesgadas de los elementos del numerador y denominador del factor ϵ [88].

4.10.3.1.- ANOVA de medidas repetidas con datos anidados

Es un modelo de ANOVA de medidas repetidas, en los cuales las observaciones provienen de los mismos individuos, a lo largo de una serie de tiempo. De este modo, se puede asumir que este modelo tiene una estructura jerárquica [86], en el cual, uno de los factores está anidado en el otro factor. Esto significa que los niveles de uno de los factores son distintos en cada nivel del otro factor. Con este modelo no es posible evaluar el efecto de la interacción, pero sí los efectos principales [89].

4.10.4.- Modelo Probabilístico de Poisson

Con los datos del número de DE/día se calculó la probabilidad de su incidencia mediante la distribución de frecuencias de Poisson.

La distribución de Poisson modela la distribución de un evento que ocurre aleatoriamente en un intervalo de tiempo o espacio. Por otro lado, el modelo probabilístico de regresión de Poisson determina la probabilidad de ocurrencia de un fenómeno en función de ciertas variables independientes, además del tamaño de la unidad de observación desde el cual se obtiene la cantidad de interés [82].

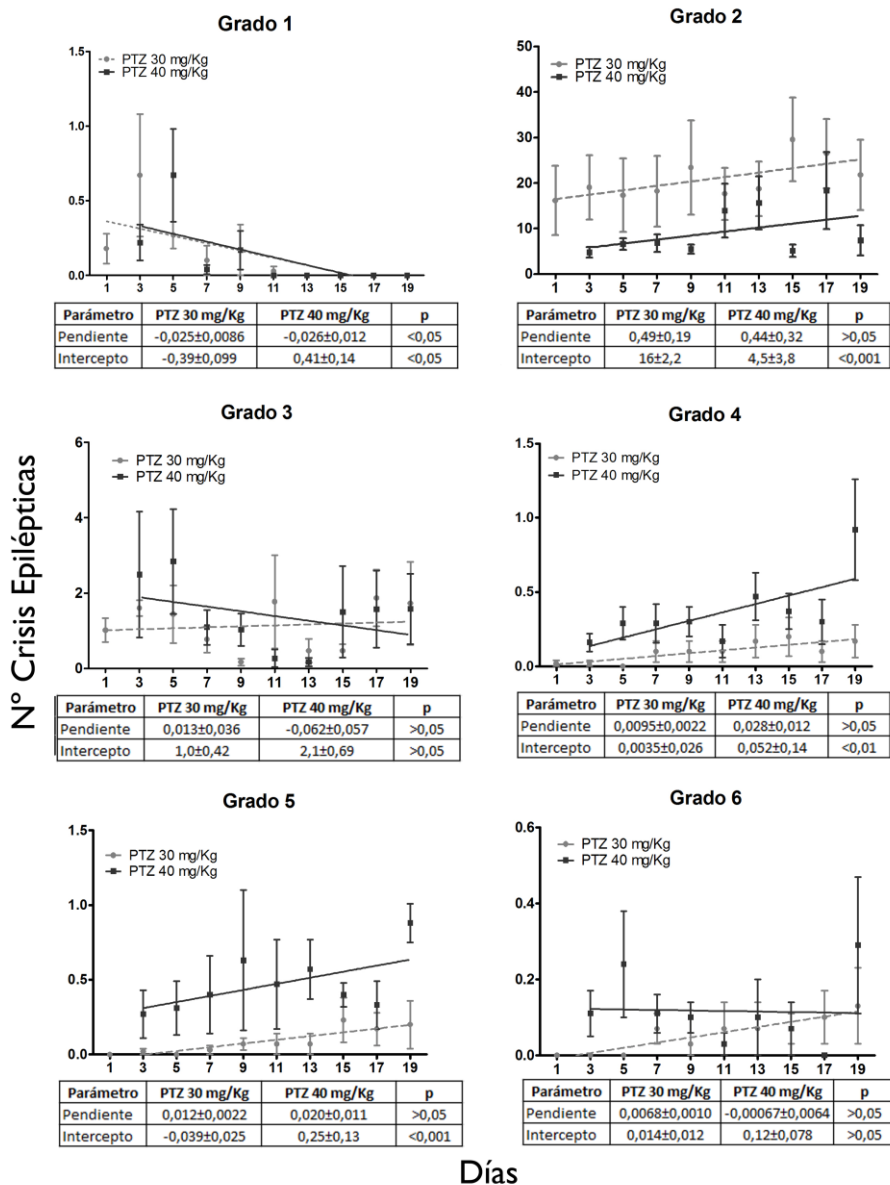
5.- RESULTADOS

5.1.- CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL KINDLING FARMACOLÓGICO.

El kindling farmacológico con PTZ ha sido ampliamente utilizado [66, 67, 69, 70], pero poco caracterizado, especialmente desde el punto de vista electroencefalográfico, por lo cual se comenzó categorizando los grados de crisis epilépticas alcanzadas durante el kindling utilizando tres dosis de PTZ. La escala para categorizar crisis epilépticas más utilizada es la escala de Racine [79, 90, 91], que se basa en el uso del ácido kaínico como agente convulsivante, pero resulta imprecisa para agentes como PTZ. Afortunadamente, en el año 2009 aparece la primera escala adaptada para PTZ [80], la cual fue utilizada para la caracterización del grado de la crisis epiléptica en estos experimentos.

Primero, se graficó el grado de cada crisis epiléptica, inducida por 30 y 40 mg/Kg de PTZ, durante los 10 días de inyección (figura 5.1). Los resultados muestran que:

- El número de convulsiones grado 1, vale decir, las crisis de ausencia, decrecen durante el protocolo independientemente de las dosis administradas.
- El número de convulsiones grado 2, es decir, los movimientos estereotipados de cara y manos, aumentan en el tiempo para ambas dosis, pero son más numerosas a dosis más bajas.
- El número de convulsiones grado 3, movimientos involuntarios del cuello, no presentan diferencias significativas entre ambos grupos.
- El número de convulsiones clónicas en posición sentado o sobre el vientre, grados 4 y 5 respectivamente, no muestran diferencia en la progresión para ambas dosis, pero son más numerosas a la dosis.
- El número de convulsiones clónicas grado 6, es decir, aquellas con pérdida de postura, no difieren significativamente entre ambos grupos.



Días

Fig. 5.1.- Número de crisis epilépticas en 10 minutos para dosis de 30 o 40 mg/kg. En los gráficos se muestra el número de convulsiones en 10 minutos, para cada grado, evaluado según los criterios de Luttjohann y cols., mostrados en la tabla 4.5. En la tabla inferior de cada gráfico se muestra la estadística correspondiente al ajuste de los números a una regresión lineal, de la cual se analizaron las diferencias entre las pendientes y el intercepto, entre ambos grupos.

A las crisis epilépticas grado 4, 5 y 6 se les midió la duración y se calculó el porcentaje de tiempo ocupada por cada una, respecto al tiempo total de

observación (60 minutos), lo que permitió verificar la progresión del kindling. Los resultados se muestran en la figura 5.2, en la cual se observa:

- Las crisis epilépticas grado 4 aumentan más rápidamente con la dosis mayor de PTZ.
- Las crisis epilépticas grado 5 aumentan con la misma velocidad en ambos grupos, pero la duración es significativamente mayor con 40 mg/Kg de PTZ.
- Las crisis epilépticas grado 6 no difieren significativamente en ambos grupos analizados.

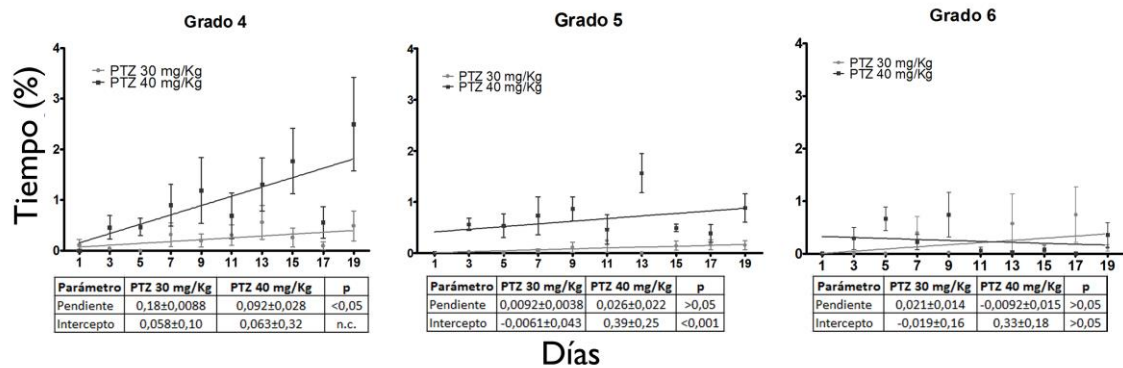


Fig. 5.2.- Duración de crisis epilépticas por grado. En los gráficos se muestra el porcentaje de duración de cada grado de crisis con respecto al tiempo de observación total. En la tabla inferior de cada gráfico se muestra la estadística correspondiente al ajuste de los números a una línea recta, de la cual se analizaron las diferencias entre las pendientes y el intercepto, entre ambos grupos.

Por último, se realizó un análisis descriptivo de la progresión del grado de crisis epiléptica y su frecuencia, durante los días de administración de PTZ para ambas dosis (figura 5.3). Se observa que, a medida que progresa el protocolo de kindling, las crisis grado 1 desaparecen mientras que en las de tipo 2 y 3, no es posible apreciar cambios. A su vez, el número de crisis epilépticas de mayor grado (4, 5 y 6) muestran una tendencia al aumento.

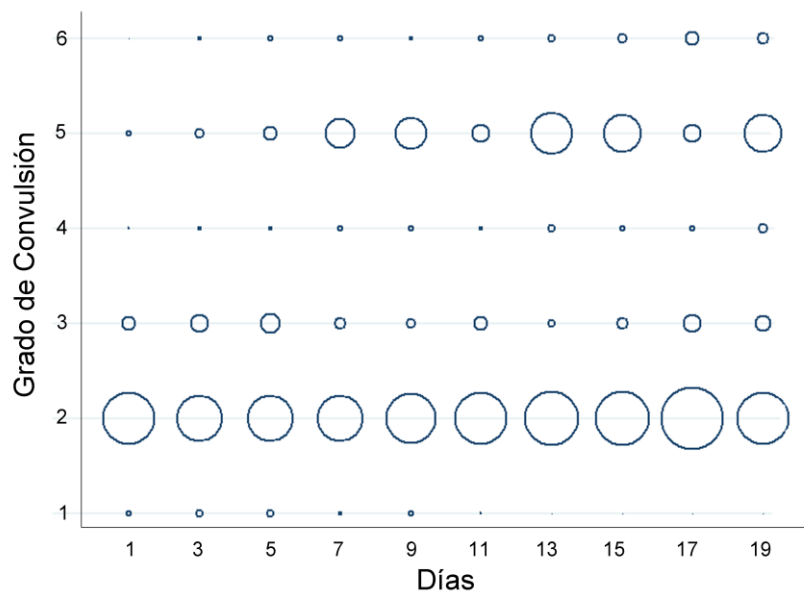


Fig. 5.3.- Representación descriptiva de la frecuencia de crisis epilépticas. En la figura se muestra la frecuencia de cada grado de crisis epiléptica inducidas por 30 y 40 mg/Kg de PTZ en un gráfico en 3 dimensiones, en el cual se relacionan 3 parámetros: en el eje X, los días de administración de PTZ; en el eje Y, el grado de crisis epiléptica; y, en el eje Z, el número de crisis epilépticas por minuto de registro, representado por el tamaño de los círculos. (n=10 ratas)

Por otro lado, se analizó la conducta de un grupo de 8 ratas, tratadas con una dosis más baja de PTZ, 20 mg/Kg, dosis que luego fue utilizada en las ratas analizadas electroencefalográficamente.

Se compararon los grados máximos de crisis epilépticas alcanzados por las ratas tratadas con todas las dosis de PTZ (figura 5.4). Los resultados obtenidos muestran que a dosis más altas (30 y 40 mg/Kg), las crisis se manifiestan con grados más intensos (sobre el grado 3); mientras que, con la dosis baja (20 mg/Kg), las crisis progresan de forma paulatina. Con 20 mg/Kg, las crisis se manifiestan desde la quinta administración de PTZ, a partir de la cual las crisis progresan aumentando su intensidad. Con 30 mg/Kg, la evolución de las crisis es fluctuante, llegando algunas ratas a manifestar el grado máximo de crisis (convulsión con pérdida postural). Con la dosis más alta (40 mg/Kg), no hay evolución del grado máximo de crisis alcanzado, ya que éste siempre se mantiene casi invariable entre los grados 5 y 6, incluso con resultado de muerte de una rata en la penúltima inyección de PTZ.

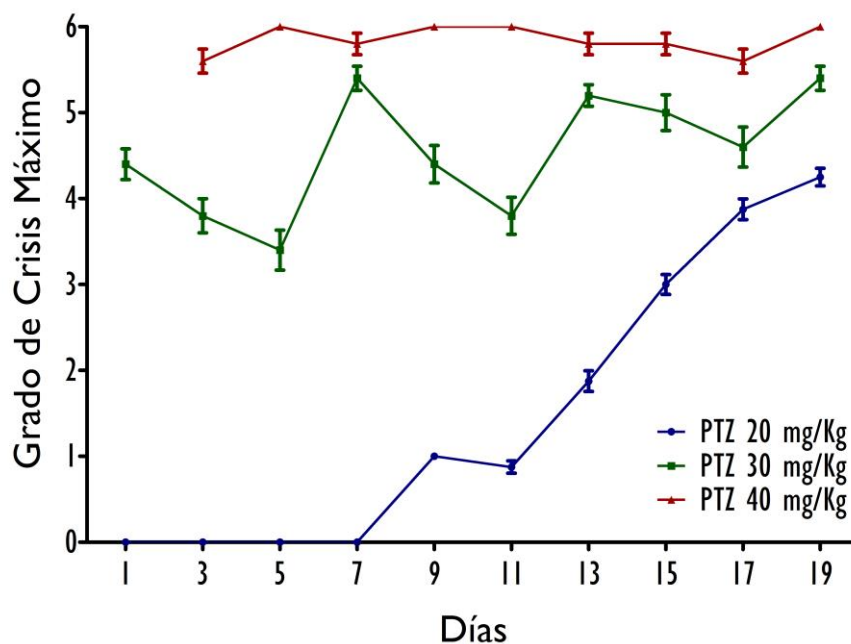


Fig. 5.4.- Comparación de grado máximo de crisis epiléptica promedio. Se determinaron los grados máximos de crisis alcanzado por las ratas en cada día de inyección de PTZ. El gráfico muestra el grado máximo promedio de crisis epiléptica alcanzado con las 3 dosis de PTZ administrado: 20 mg/Kg (n=8), 30 mg/Kg (n=5) y 40 mg/Kg (n=5).

Considerando que a dosis de 20 mg/kg las ratas en los primeros días del kindling no manifiestan crisis detectables y desarrollan progresivamente los grados de crisis, se decidió realizar la caracterización electroencefalográfica con esta dosis.

5.2.- CARACTERIZACIÓN DE DESCARGAS EPILÉPTICAS EN EL EEG DE LAS RATAS SOMETIDAS A KINDLING FARMACOLÓGICO CON PTZ.

5.2.1.- Las descargas epilépticas (DE) se observan durante la vigilia.

El ciclo sueño vigilia (CSV) se compone de 3 estados conductuales: vigilia, sueño NREM y sueño REM, que presentan características polisomnográficas y espectrales bien definidas. Se registró el EEG y EMG de las ratas que posteriormente se someterían a kindling durante los días basales del protocolo, detectándose los tres

estados mencionados. En la figura 5.5 se muestran segmentos de 20 segundos de registro de cada estado observándose que: la vigilia se caracteriza por ondas de baja amplitud y alta frecuencia (banda beta) en el EEG y espigas de actividad muscular en el EMG, el sueño NREM se caracteriza por ondas lentas y de gran amplitud en el EEG (banda delta) y tono muscular bajo en el EMG mientras que en el sueño REM se observan ondas parecidas a las de la vigilia en el EEG (banda beta) y ausencia de tono muscular en el EMG.

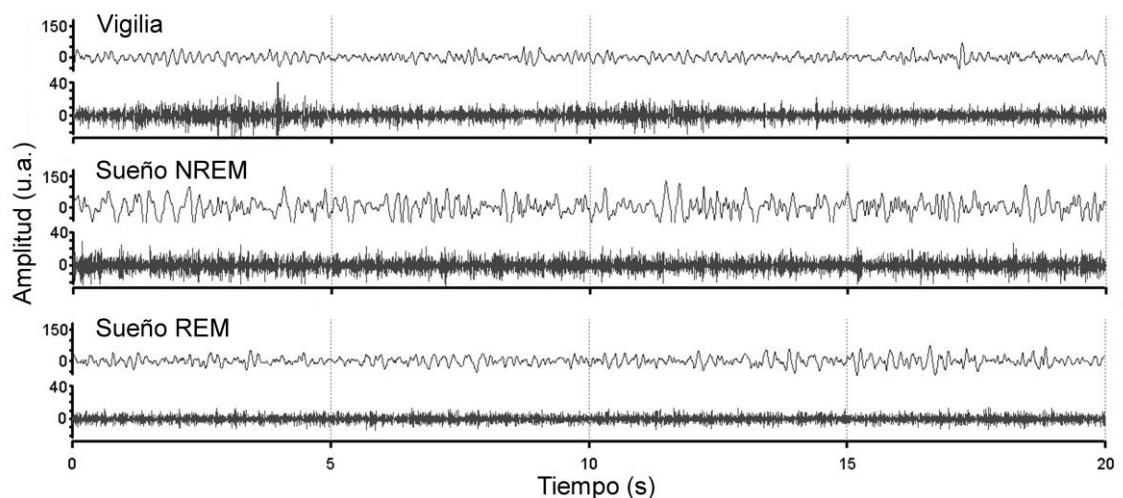


Fig. 5.5.- Registro EEG y EMG durante los estados del ciclo sueño vigilia. En la figura se muestran 20 segundos de registro de cada estado del ciclo sueño vigilia. El trazo superior corresponde al registro de EEG y el inferior, al EMG. La amplitud se muestra en unidades arbitrarias (u.a.).

Una vez comenzado el protocolo de inyecciones, se observó que aparecían alteraciones electroencefalográficas o descargas epilépticas (DE) a partir del primer día de inyección de PTZ durante la vigilia, que no se correspondían con espigas de actividad muscular o artefactos. Estas manifestaciones electroencefalográficas, de menor frecuencia y mayor amplitud que el EEG de vigilia, se pudieron reconocer durante todo el protocolo de kindling y en todas las ratas (figuras 5.6 y 5.7). A diferencia de los estados del sueño, durante las DE se mantenía alto el tono muscular. Para caracterizar las DE, se realizó un análisis espectral de las DE registradas en el primer día de administración de PTZ y se comparó con los perfiles espectrales de los estados del ciclo sueño vigilia de los días basales (figura 5.8). La comparación muestra

que las descargas epilépticas se diferencian significativamente de la vigilia y el sueño NREM en las bandas delta, theta y betas; mientras que con el sueño REM, no hubo diferencias significativas en estas bandas, salvo en dos frecuencias (14,5 y 19 Hz). Dado que estas diferencias espectrales de las descargas con el sueño REM son menores, la presencia de tono muscular y la transición directa desde vigilia a la descarga epiléptica, fueron criterios adicionales para identificarlas.

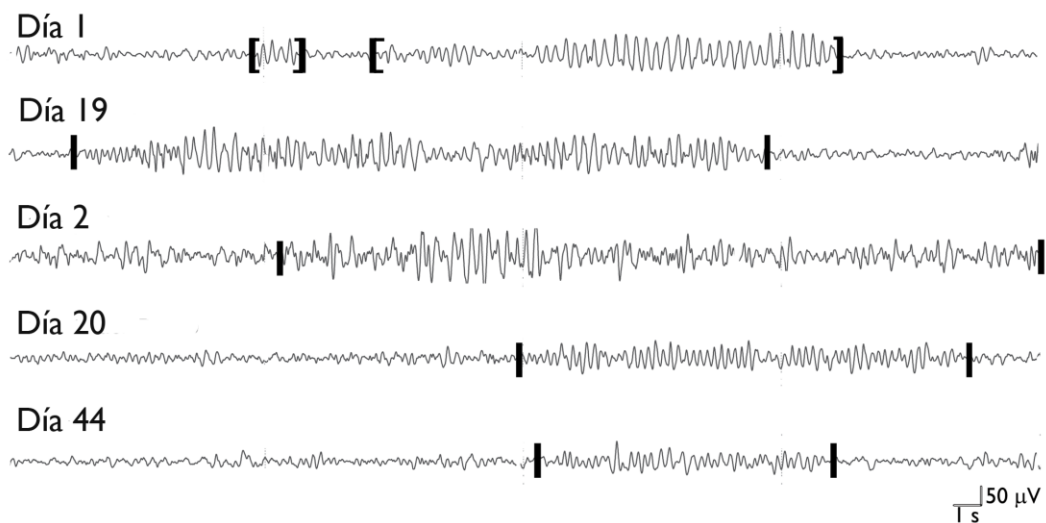


Fig. 5.6.- Registros de descargas epilépticas durante y después del protocolo de kindling. En la figura se muestran segmentos de 20 s de registros EEG en los días de inyección de PTZ (días 1 y 19), días de no inyección (días 2 y 20) y 25 días después de la última inyección de PTZ (día 44). Entre barras se destacan las descargas epilépticas. Durante el día 1, se observan dos DE sucesivas separadas por más de un segundo, por lo que se consideraron eventos independientes. En este caso, se señalan entre paréntesis cuadrados.

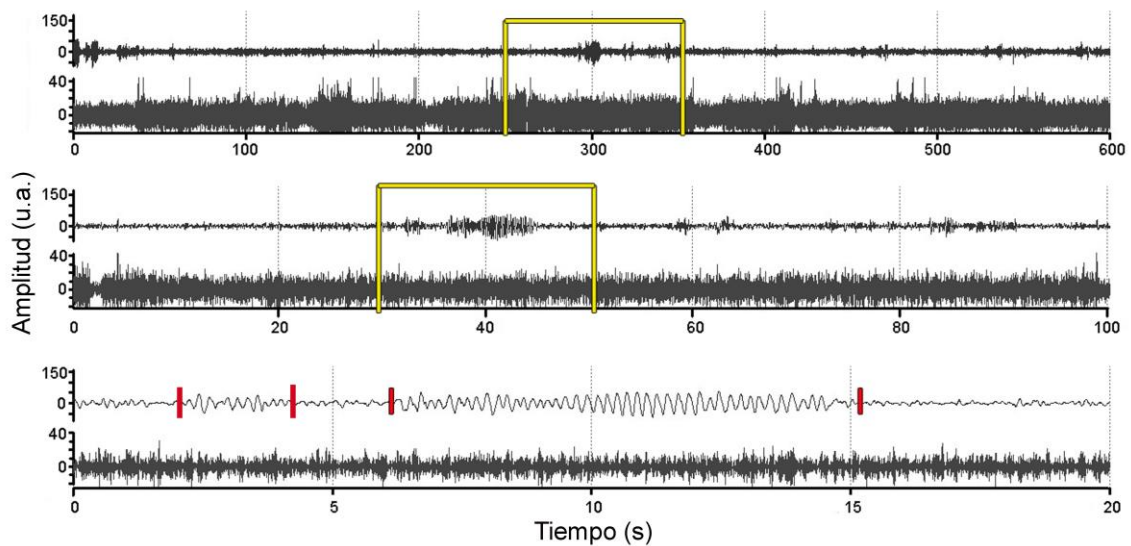


Fig. 5.7.- Las descargas epilépticas se producen en vigilia. En la figura se muestra un registro de vigilia, a diferentes escalas temporales. En la parte superior se observan 10 minutos de vigilia, en el cual se destacan en amarillo los 100 segundos que se muestran en el centro de la figura y en éste se destaca en amarillo, los 20 segundos que se muestran en el trazado inferior, donde se destaca con barras rojas el tiempo inicial y final de dos descargas epilépticas de distinta duración. La amplitud se muestra en unidades arbitrarias (u.a.).

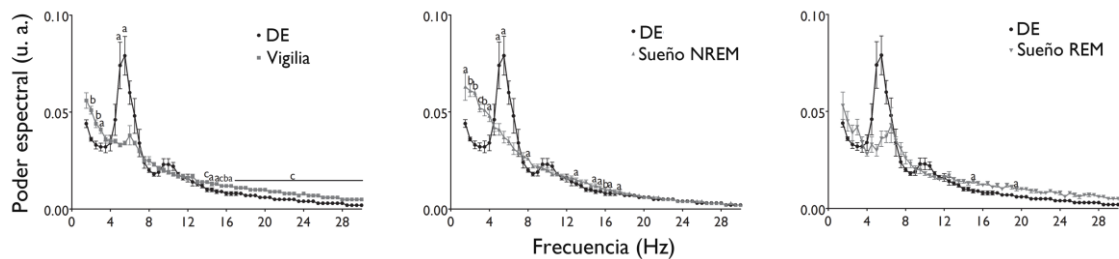


Fig. 5.8.- Comparación del perfil espectral de las descargas epilépticas con el perfil de los estados del ciclo sueño vigilia. Se muestra la curva del perfil espectral de cada estado del ciclo sueño vigilia, obtenido durante los días de línea base (promedio de segmentos de registro de 5 s), versus el perfil espectral promedio de las DE en el primer día de administración de PTZ. A la izquierda se muestra la vigilia; en el centro, el sueño NREM; y a la derecha, el sueño REM. El poder espectral se muestra en unidades arbitrarias (u.a.). Se comparó cada una de las frecuencias mediante la prueba de t pareada de dos colas, a: $p < 0,05$, b: $p < 0,01$, c: $p < 0,001$ ($n=5$).

Después de establecer que las DE ocurren durante la vigilia, se graficó el curso temporal de su incidencia durante las dos horas de registro.

5.2.2.- El número de descargas epilépticas es mayor en los días de inyección y decaen linealmente después del inicio del registro

En total, se analizaron 6310 descargas epilépticas, 5791 en los días de inyección de PTZ y 519 en los días de no inyección.

Se comparó el número de descargas epilépticas en los días de inyección de PTZ con los días de no inyección, observándose que en los días de inyección se producen $1,26 \pm 0,1$ versus $0,19 \pm 0,02$ DE/min vigilia en los días de no inyección $p < 0,001$ (figura 5.9).

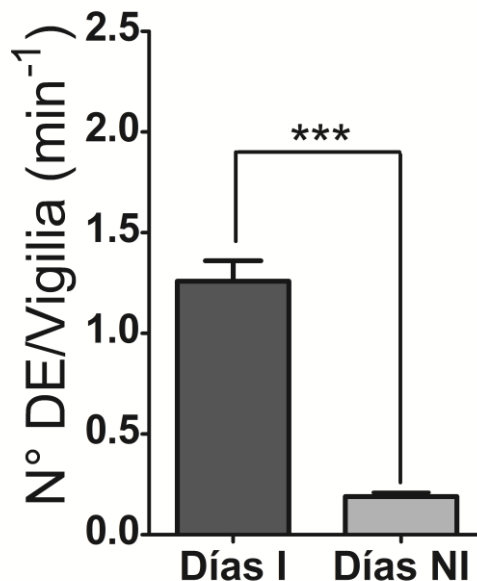


Fig. 5.9.- Número de descargas epilépticas por minuto de vigilia en los días de inyección (I) y no inyección (NI). El análisis estadístico corresponde al test de Student pareado de dos colas, $p < 0,001$, $n = 5$.

Las tablas 5.1 y 5.2 muestran el número de descargas epilépticas por día de protocolo.

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5
1	78	22	78	70	47
3	87	6	126	32	-
5	103	25	59	101	104
7	99	81	52	69	126
9	123	68	252	84	67
11	94	174	195	137	119
13	145	89	320	148	138
15	164	187	117	99	127
17	200	191	166	43	97
19	170	223	228	135	126

Tabla 5.1.- Número de descargas epilépticas en los días de inyección de PTZ. En la tabla se muestra el número de descargas epilépticas en cada día de inyección de PTZ. Los días marcados con – corresponden a días de registro no considerados en los resultados.

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5
2	6	4	0	1	-
4	5	2	6	3	-
6	18	11	3	-	8
8	15	8	7	-	-
10	20	14	6	2	12
12	8	17	0	4	16
14	18	37	16	3	16
16	3	36	15	4	23
18	6	39	8	2	31
20	15	19	5	4	23

Tabla 5.2.- Número de descargas epilépticas analizadas en los días de no inyección de PTZ. En la tabla se muestra el número de descargas epilépticas en cada día de no inyección de PTZ. Los días marcados con – corresponden a días de registro no considerados en los resultados.

Para visualizar el curso temporal de las descargas epilépticas durante las dos horas de registro, se calculó el número promedio de descargas epilépticas en 10 minutos de registro, durante las dos horas de registro, tanto en los días de inyección de PTZ como en los días de no inyección. En cada caso, se graficó el porcentaje promedio de descargas epilépticas por cada 10 minutos con respecto al total de ese día de registro. Estos resultados se muestran en la figura 5.10, donde se observa que las DE decaen linealmente a partir de los 20 ó 30 minutos de registro hasta el fin del registro a las 2 horas.

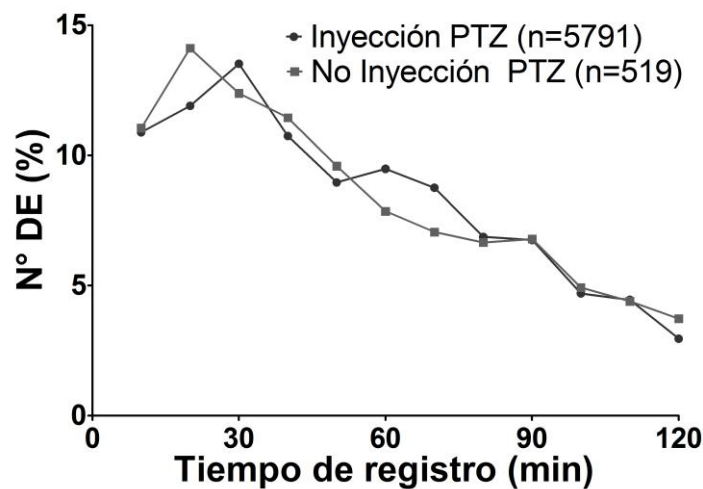


Fig. 5.10.- Porcentaje de descargas epilépticas por 10 minutos a lo largo de dos horas de registro. Se calculó el porcentaje de descargas epilépticas en los días de inyección (●) y en los días de no inyección (■) de PTZ, con respecto al total observado en cada día.

La mayor concentración de descargas epilépticas en la primera hora de registro post-inyección era esperables pues se correlacionan con la vida media del PTZ de 116 minutos. Además, la mayor incidencia de descargas epilépticas al comienzo del registro en días de inyección y no inyección probablemente se deba a que las ratas recién conectadas y trasladadas a las cámaras de registro están despiertas, reflejando que la vigilia se correlaciona positivamente con la ocurrencia de descargas epilépticas, aún en ausencia de PTZ. En general, las ratas duermen más durante los días de no inyección, lo que concuerda con la menor incidencia de descargas epilépticas en estos días. Esto se ve reflejado en las tablas 5.3 a 5.6, que muestran la cantidad de sueño

NREM y REM por rata a lo largo del protocolo. Así, de las dos horas de registro, en los días de inyección se observa $4,6\pm 2,0\%$ de sueño NREM y $0,1\pm 0,1\%$ de sueño REM mientras que en los días de no inyección estos valores corresponden a $26,6\pm 10,1\%$ y $2,0\pm 1,1\%$, respectivamente (figura 5.11).

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Total
1	9,0	3,2	5,3	0	0	3,5±3,4
3	16,8	12,9	4,3	3,7	-	9,4±5,6
5	1,5	0	0	0,5	13,8	3,2±5,3
7	16,0	0	0	1,7	4,9	4,5±6,0
9	17,1	0	0,2	2,9	10,0	6,0±6,6
11	15,8	7,4	0,6	7,3	0,8	6,4±5,6
13	14,3	0	0	2,1	3,9	4,1±5,3
15	12,8	0	0	0	1,9	2,9±5,0
17	15,6	0	0	1,9	0	3,5±6,1
19	13,4	0	0	0	0,7	2,8±5,3
						4,6±2,0

Tabla 5.3.- Porcentaje de Sueño NREM en los días de inyección de PTZ. En la tabla se muestran los porcentajes de sueño NREM de cada rata en los días de inyección de PTZ. La columna de la derecha muestra el porcentaje de sueño promedio \pm desviación estándar por cada día. En la celda inferior se destaca en negrita el promedio de sueño NREM para los días de inyección de PTZ. Las celdas marcadas con el símbolo – no fueron consideradas en el análisis.

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Total
2	10,2	0,4	25,5	0	-	9,0±10,4
4	42,5	0	0	0	-	10,6±18,4
6	51,3	42,3	22,9	-	56,6	43,3±12,8
8	32,7	17,5	36,0	-	-	28,7±8,0
10	39,3	0	70,6	16,9	40,0	33,4±23,9
12	30,6	12,4	28,8	2,5	47,7	24,4±15,6
14	39,4	31,6	42,3	10,8	58,8	36,6±15,6
16	24,1	18,7	10,8	13,1	44,4	22,2±12,0
18	15,5	26,2	51,6	14,2	38,2	29,1±14,2
20	12,3	43,3	39,6	18,9	31,4	29,1±11,9
						26,6±10,1

Tabla 5.4.- Porcentaje de Sueño NREM en los días de no inyección de PTZ. En la tabla se muestran los porcentajes de sueño NREM de cada rata en los días de no inyección de PTZ. La columna de la derecha muestra el porcentaje de sueño promedio \pm desviación estándar por cada día. En la celda inferior se destaca en negrita el promedio de sueño NREM para los días de no inyección de PTZ. Las celdas marcadas con el símbolo – no fueron consideradas en el análisis.

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Total
1	0	0,6	0,5	0	0	0,2±0,3
3	0,3	0,2	0	0	-	0,1±0,1
5	0	0	0	0	0,6	0,1±0,2
7	0	0	0	0	0	0,0±0,0
9	0	0	0	0	0,4	0,1±0,2
11	0	0	0	0	0	0,0±0,0
13	0	0	0	0	0,1	0,0±0,0
15	0	0	0	0	0	0,0±0,0
17	0	0	0	0	0	0,0±0,0
19	0	0	0	0	0	0,0±0,0
						0,1±0,1

Tabla 5.5.- Porcentaje de Sueño REM en los días de inyección de PTZ. En la tabla se muestran los porcentajes de sueño REM de cada rata en los días de inyección de PTZ. La columna de la derecha muestra el porcentaje de sueño promedio \pm desviación estándar por cada día. En la celda inferior se destaca en negrita el promedio de sueño NREM para los días de inyección de PTZ. Las celdas marcadas con el símbolo – no fueron consideradas en el análisis.

Día	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Total
2	0	0	2,7	0	-	0,7±1,2
4	7,2	0	0	0	-	1,8±3,1
6	8,6	5,2	1,6	-	1,6	4,2±2,9
8	4,0	0,7	3,5	-	-	2,7±1,4
10	1,4	0	1,4	0,4	0,7	0,8±0,6
12	0,4	1,5	2,1	0	1,6	1,1±0,8
14	2,7	5,8	2,8	0	4,6	3,2±2,0
16	2,6	3,2	0	0,5	0	1,3±1,4
18	2,3	5,8	2,0	0,7	2,0	2,6±1,7
20	2,1	5,3	1,1	0,7	1,3	2,1±1,7
						2,0±1,1

Tabla 5.6.- Porcentaje de Sueño REM en los días de no inyección de PTZ. En la tabla se muestran los porcentajes de sueño REM de cada rata en los días de no inyección de PTZ. La columna de la derecha muestra el porcentaje de sueño promedio \pm desviación estándar por cada día. En la celda inferior se destaca en negrita el promedio de sueño NREM para los días de no inyección de PTZ. Las celdas marcadas con el símbolo – no fueron consideradas en el análisis.

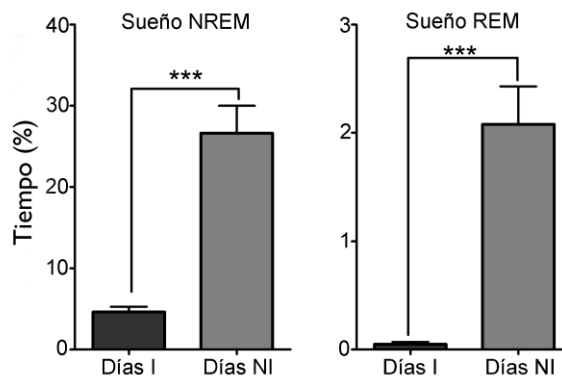


Fig. 5.11.- Sueño durante el kindling. La figura muestra el porcentaje del tiempo total de registro correspondiente a sueño NREM (izquierda) y sueño REM (derecha), durante los días de inyección de PTZ (días I) y de no inyección (días NI). Los datos fueron comparados con el Test de Student pareado de dos colas. *** $p < 0,001$.

A continuación, se analizó la duración de las DE. En la figura 5.12 se muestra, el histograma de las duraciones de las descargas epilépticas en los días de inyección de PTZ y de no inyección. El número de descargas epilépticas se expresó en porcentaje con respecto al total de descargas en los días de inyección y de no inyección. La distribución de las duraciones en ambos días es muy similar, ya que aproximadamente el 97% de las DE duran entre 1 y 15 segundos. El rango de duraciones en los días de inyección de PTZ se encuentra entre 10 y 50,1 s; mientras que, en los días de no inyección, la duración oscila entre 1,1 y 29,7 s.

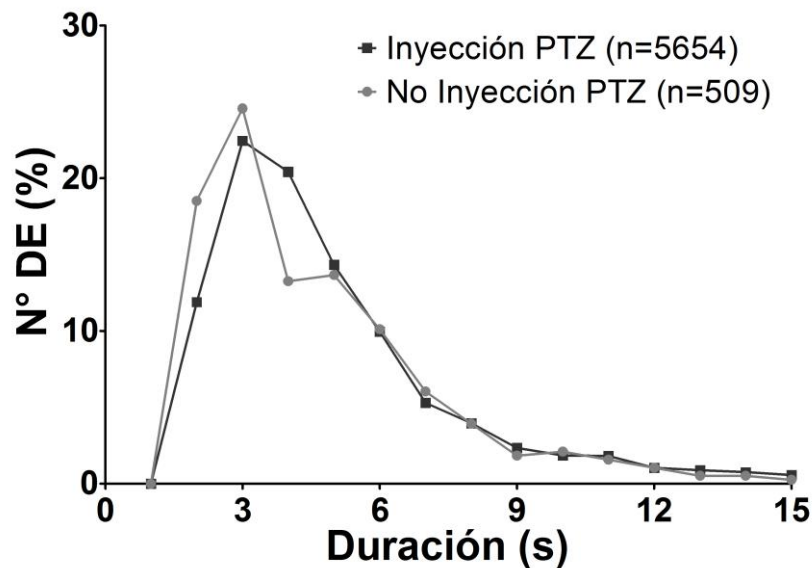


Fig. 5.12.- Histograma de Frecuencia Relativa (% con respecto al total de descargas epilépticas en días de inyección o no inyección) de las duraciones de las descargas epilépticas. En el gráfico se observa el porcentaje de la distribución de las duraciones de las descargas epilépticas en los días de inyección (■) y en los días de no inyección de PTZ (●).

5.2.4.- El número de descargas epilépticas por minuto de vigilia progresa de manera diferente en los días de inyección de PTZ y no inyección.

Para estudiar la progresión de las descargas epilépticas a lo largo del kindling, se separaron los días de inyección de PTZ de los de no inyección. Mediante ANOVA de medidas repetidas con factor de corrección de Huynh-Feldt ϵ se determinó

que existen diferencias significativas en el número de descargas epilépticas por minuto de vigilia, entre ambos tipos de días. Por lo tanto, se compararon pares de días sucesivos de inyección y no inyección mediante la prueba de t pareada. Este análisis arrojó que a partir de la quinta inyección, el número de descargas epilépticas es mayor en los días de inyección (Figura 5.13).

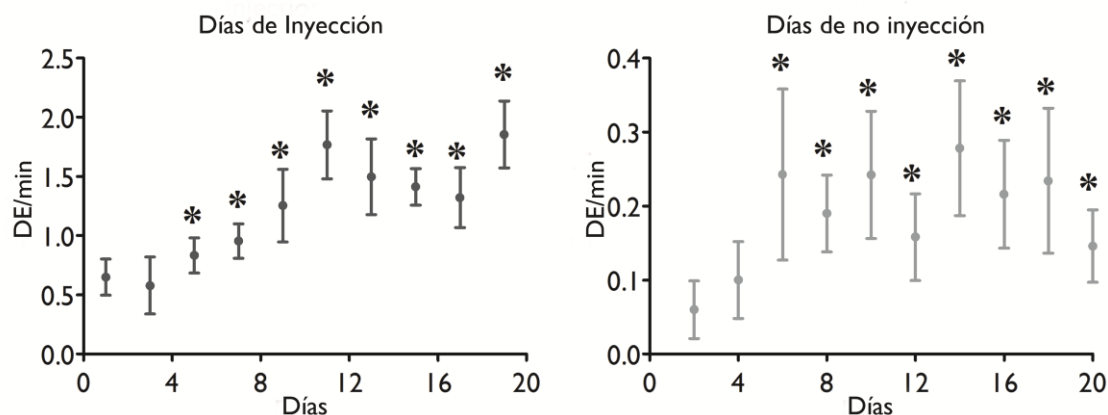
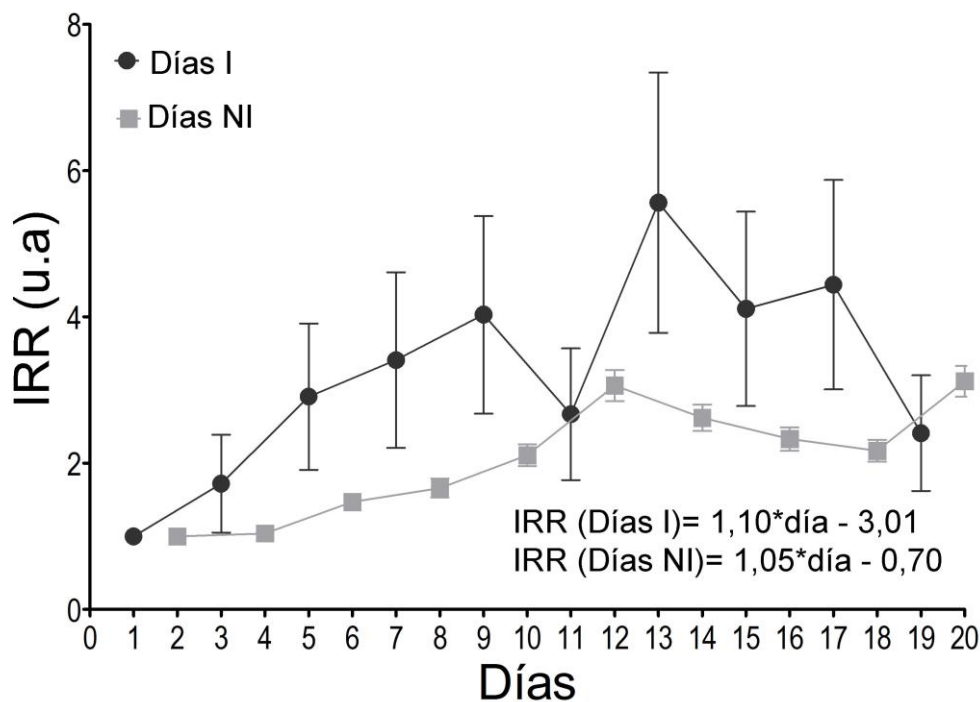


Fig. 5.13.- Número de descargas epilépticas durante el kindling. La figura muestra el número de descargas epilépticas en 10 minutos de vigilia durante los días de inyección de PTZ (izquierda) y de no inyección (derecha). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas con post-test de bonferroni. * $p < 0,05$ (n=5) Nota: las escalas del eje Y son diferentes.

Se determinó la probabilidad de incidencia de una descarga epiléptica, mediante un modelo mixto para una respuesta de Poisson para medidas anidadas. Este análisis nos permitió describir la tasa de aumento de la probabilidad de ocurrencia de una descarga epiléptica, respecto al primer día de cada grupo; de este modo, se determinó que esta tasa incrementa un $10,85 \pm 0,52\%$ en los días de inyección y un $5,36 \pm 1,71\%$, en los días de no inyección. Además, Poisson nos permite determinar la magnitud en la que influyen factores, como día del kindling y la administración de PTZ, sobre la probabilidad de registrar una descarga epiléptica, resultando en que ambos factores tienen influencia significativa sobre ésta, siendo la administración de PTZ capaz de incrementar esta probabilidad $7,64 \pm 0,35$ veces (figura 5.14).



Modelo de Distribución de Poisson

	IRR	Error Est.	Z	P> Z
día	1,11	0,01	22,28	0,000
inyección	7,65	0,35	44,31	0,000
Cte	-3,10			

Fig. 5.14.- Representación gráfica de la probabilidad de registrar descargas epilépticas en cada día del kindling. El gráfico muestra la tasa de variación (IRR) de la probabilidad de observar descargas epilépticas en los días de inyección de PTZ (gris oscuro), respecto al día 1 (IRR=1), y en los días de no inyección de PTZ (gris claro), respecto al día 2 (IRR=1). La tabla inferior muestra los valores de los factores del modelo.

5.2.5.- La duración promedio de las descargas epilépticas es mayor en los días de administración de PTZ, en relación a los días de no inyección.

Al evaluar las duraciones promedio de las descargas epilépticas por día durante el protocolo, se encontró que éstas no cambian durante los días de inyección de PTZ ni no inyección, considerados nuevamente en forma separada para este análisis (figura 5.15). Sin embargo, al comparar la duración del total de las descargas epilépticas

(5791 en los días de inyección y 517 en los días de no inyección), se observa que las descargas epilépticas son de mayor duración en los días de inyección ($4,6\pm 0,7$ s) versus no inyección ($3,5\pm 0,4$ s), $p < 0,05$ (figura 5.16).

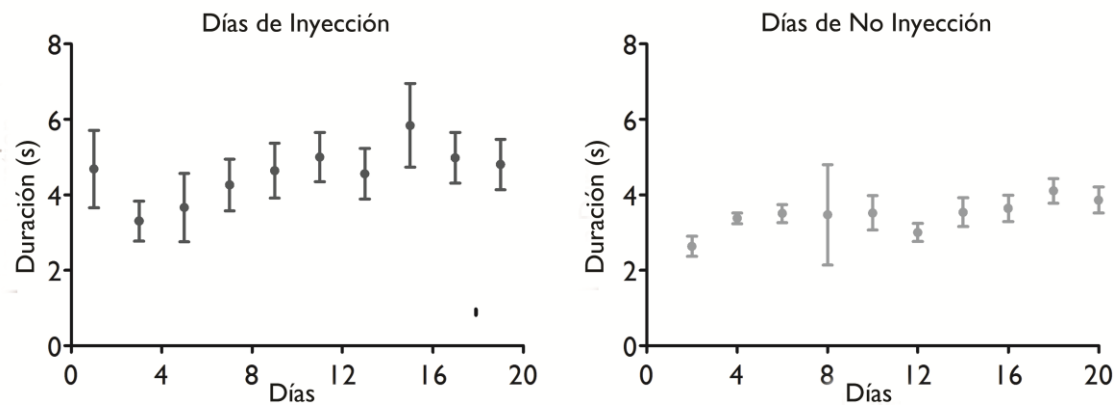


Fig. 5.15.- Duración Promedio de las descargas epilépticas durante el kindling. Se observa la evolución de la duración de las descargas epilépticas durante los días de inyección (izquierda) y los días de no inyección (derecha). Los datos fueron analizados por ANOVA de medidas repetidas en ambos grupos de días, sin diferencias estadísticamente significativas. (n=5)

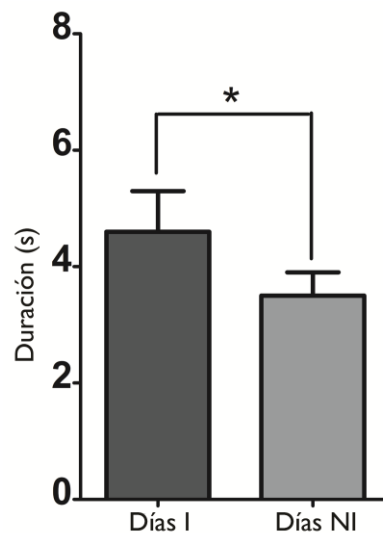


Fig. 5.16.- Duración Promedio de las descargas epilépticas. Se observa el promedio de los duraciones del total de las descargas epilépticas analizadas en los días de inyección (I) y no inyección (NI), comparadas por test de Student pareado de dos colas, $*p < 0,05$. (n=5).

5.2.6.-. El poder espectral de la banda theta varía con el progreso del kindling farmacológico con PTZ.

Se determinaron las frecuencias que componen las DE en los días de kindling. Para ello, se dividió el espectro de frecuencias, que es continuo, en 5 bandas o rangos de frecuencias (tabla 4.7). Se calculó su contribución relativa al espectro total. Esto se comparó con el poder espectral de las bandas promedio de vigilia, registrada durante la línea base (figura 5.17). Posteriormente, se calculó el poder espectral de cada banda durante los días de kindling, separando los datos en los días de inyección y no inyección, mediante un modelo mixto de medidas repetidas, anidadas en las ratas (figura 5.18). Para graficar las tendencias de los poderes espectrales a lo largo del registro, en la figura 5.19 se muestran los perfiles espectrales de la vigilia basal, además del primer y del último día de administración de PTZ y de los días de no inyección.

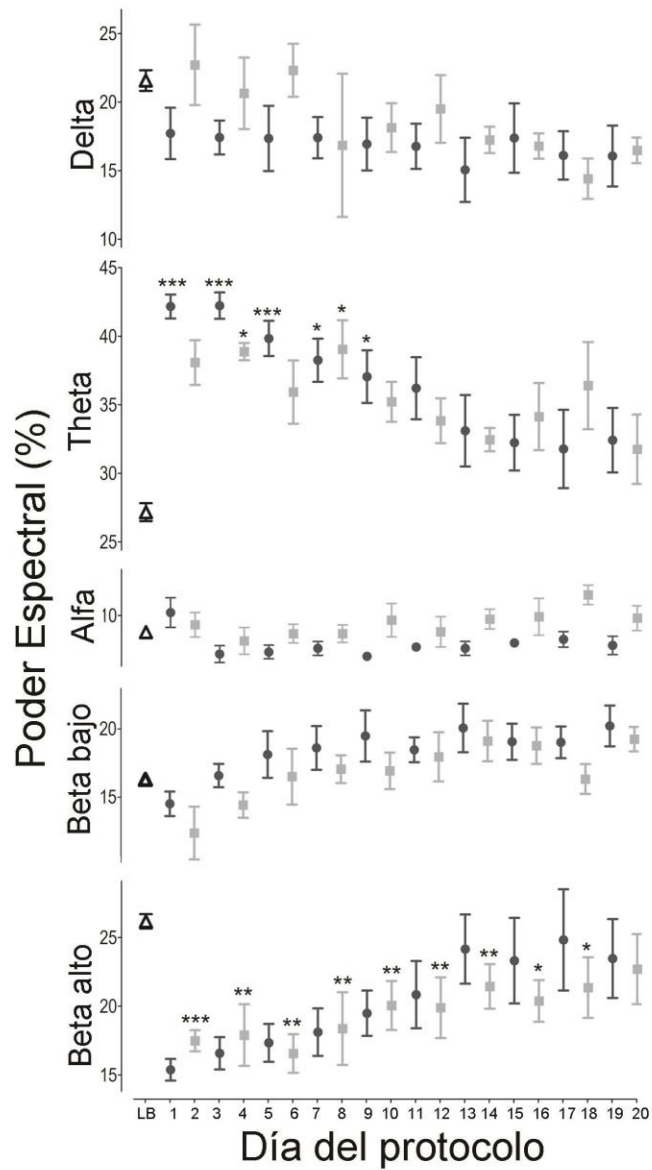


Fig. 5.17.- Análisis espectral de las bandas de frecuencia de las descargas epilépticas. En la figura se observa el poder espectral promedio de cada banda de frecuencias a lo largo de los días de registro. El símbolo Δ representa el registro basal, símbolo \bullet los días de administración de PTZ y el símbolo \blacksquare los días intermedios. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ al comparar cada día del protocolo con la línea base, con ANOVA de una vía con post test de Bonferroni. (n=5)

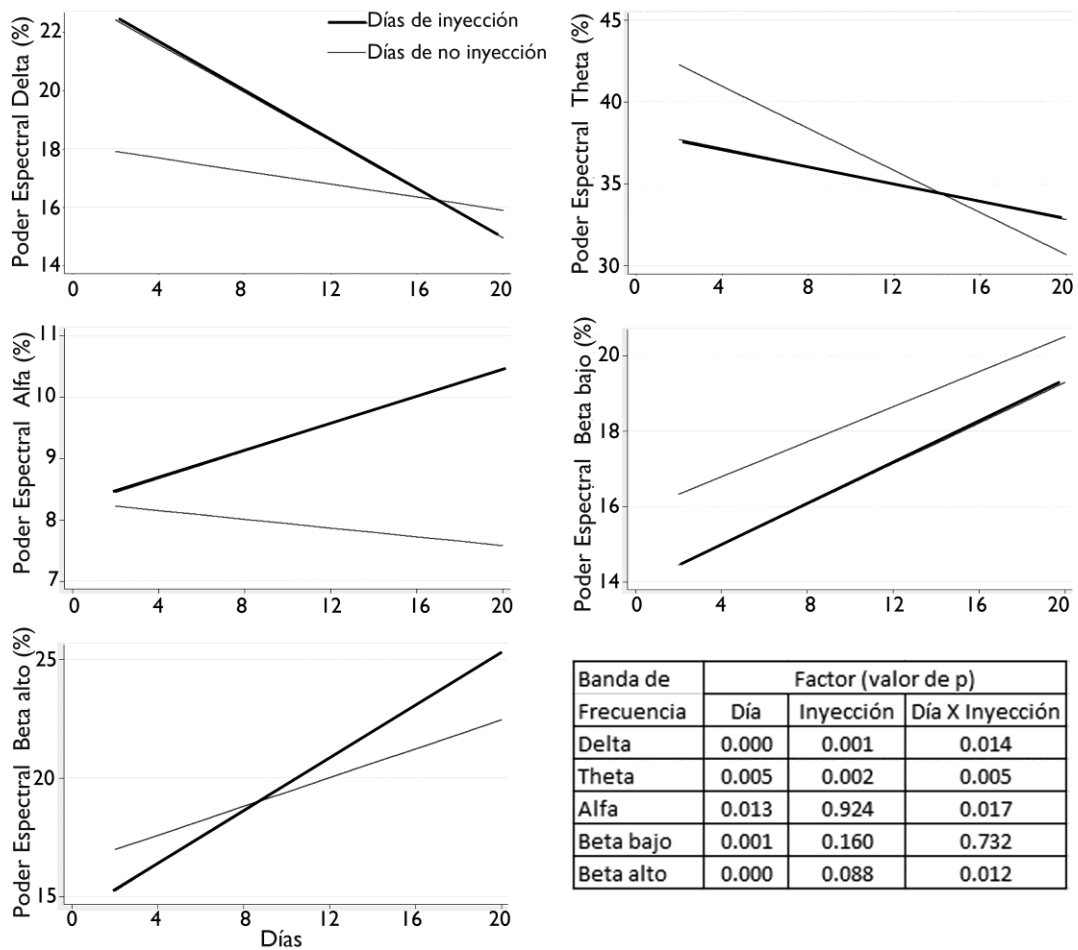


Fig. 5.18.- Tendencia de los poderes espectrales de las bandas del EEG durante el kindling. La figura muestra las tendencias de los poderes espectrales de las bandas del EEG, calculadas por un modelo mixto de medidas repetidas anidadas. El recuadro muestra los valores de p de los factores: día, inyección y la interacción de ambos: delta disminuyó 0,79 puntos en los días de inyección y 0,24 puntos en los días de no inyección; theta disminuyó 0,49 puntos en los días de inyección y 1,3 puntos en los días de no inyección; alfa aumentó 0,21 puntos por día de inyección, pero no varió en los días no inyección; beta bajo aumentó 0,49 puntos por inyección y por día de no inyección; beta alto se incrementó 0,59 puntos por inyección y 1,12 puntos por día de no inyección. (n=5)

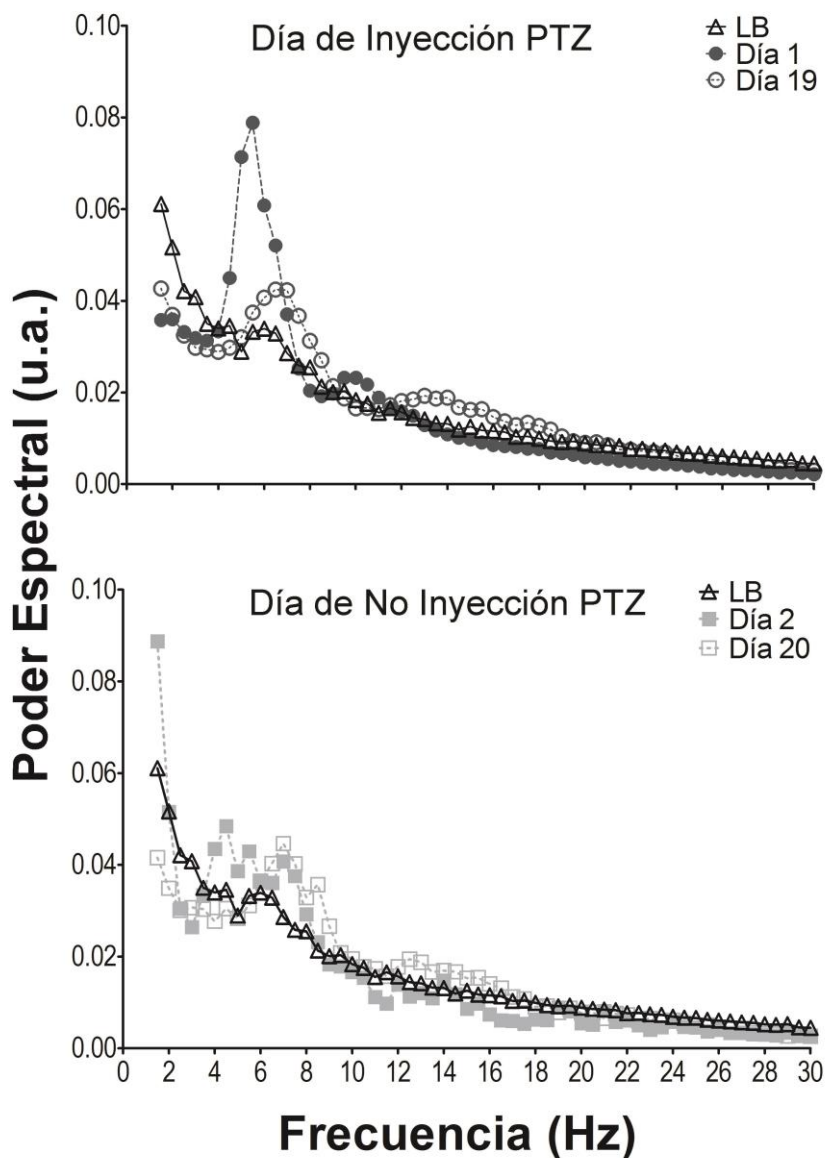


Fig. 5.19.- Perfiles espectrales de las descargas epilépticas durante el kindling farmacológico con PTZ. Se compararon los perfiles espectrales de la vigilia (Δ), con el perfil espectral de las descargas epilépticas del primer (\bullet) y último día (\circ) de inyección de PTZ (gráfico superior) y con el perfil espectral de las descargas epilépticas del primer (\blacksquare) y último día (\square) de no inyección (gráfico inferior). Las barras de error fueron eliminadas para obtener una mejor visualización.

Para evaluar si el proceso de epileptogénesis era progresivo, se analizó si después de un período de 25 días después de finalizado el protocolo de kindling aún se observaban DE, y cuáles eran sus características espectrales.

5.3.- CARACTERIZACIÓN DE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS POSTERIOR AL KINDLING FARMACOLÓGICO CON PTZ.

Para determinar si los efectos del kindling farmacológico con PTZ son sostenidos en el tiempo, se registró el EEG 25 días después de la última administración de PTZ, vale decir, el día 44, y se comparó con el día 20 del protocolo. Los resultados muestran que el número de descargas epilépticas aumenta y, en contraste, la duración promedio se mantiene constante (figura 5.20)

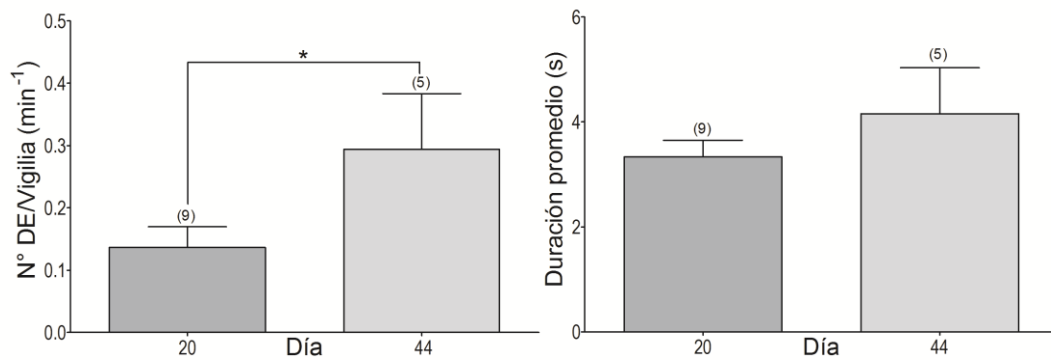


Fig. 5.20.- Número y duración promedio de las descargas epilépticas post kindling farmacológico con PTZ. A la izquierda, se observa el número de descargas epilépticas por minuto de vigilia en los días 20 (gris oscuro) y 44 (gris claro) del protocolo. A la derecha, las duraciones promedios de las descargas epilépticas. . * $p < 0,05$ en test de Student no pareado de dos colas. El número de ratas utilizado se muestra entre paréntesis sobre cada barra.

Al analizar el perfil espectral de las descargas epilépticas del día 20 y 44 y compararlo con la vigilia de la línea base, se observa que la banda theta aumenta en el día 44 (figura 5.21). Los perfiles espectrales se muestran en la figura 5.22.

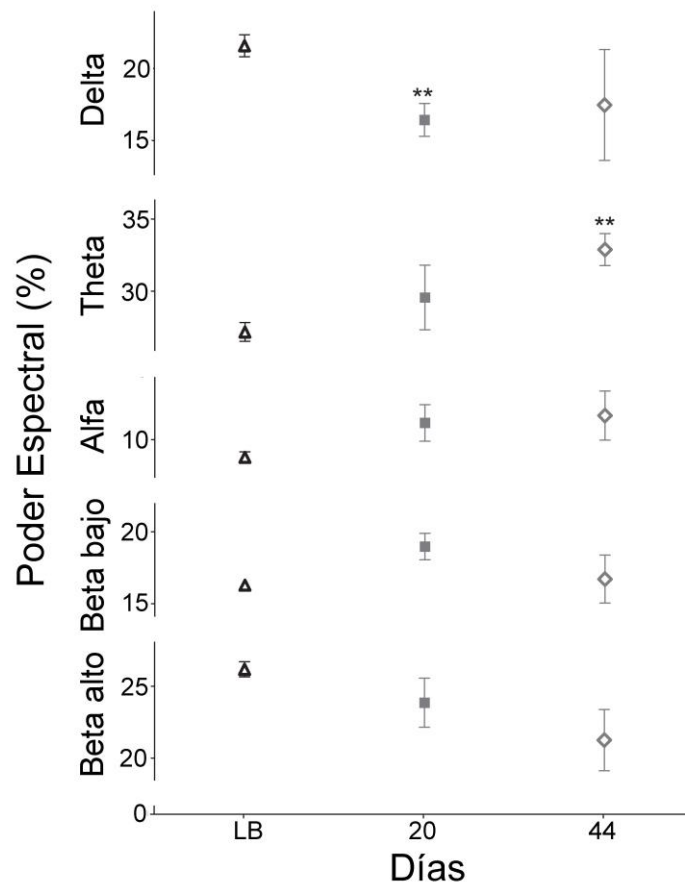


Fig. 5.21.- Comparación del poder espectral de las bandas de frecuencias en el día 44 con los días basal y 20. Los símbolos representan: vigilia de la línea base (Δ), descargas epilépticas registradas en el día 20 (\blacksquare) y en el día 44 (\diamond). ** $p < 0,01$ analizado con test de Student no pareado de dos colas. (n: LB=5; día 20=9; día 44=6)

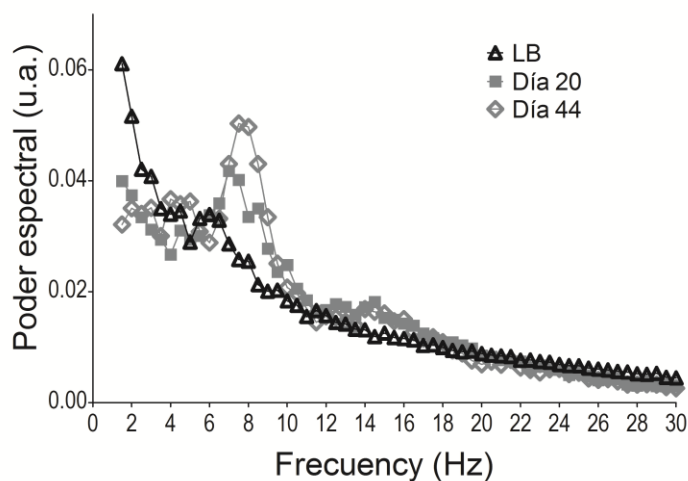


Fig. 5.22.- Poder espectral de las descargas epilépticas posteriores al kindling farmacológico con PTZ. Se observa el perfil espectral de la vigilia de la línea base (Δ), en el día 20 (\blacksquare) y en el día 44 (\diamond). Las barras de error fueron eliminadas para una mejor visualización.

5.4.- MODULACIÓN DE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS POR NO.

La caracterización del kindling con PTZ se realizó para evaluar posibles mecanismos que modulan la epileptogénesis y la excitabilidad neuronal. Como el papel del NO en la literatura es controversial, se decidió modular sus niveles localmente en la corteza cerebral, en forma unilateral. Para ello, se inhibió una de las isoformas implicadas en la síntesis de NO, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Esto se logró inyectando 7-NI por la cánula de inyección. Posteriormente, se aplicó el antagonista selectivo del R-NMDA MK-801, lo que pretende evaluar la participación de este receptor en el efecto de NO. En otra sesión de registro, se administró SNAP, un dador de NO, por la cánula. Los controles correspondieron a inyección del mismo volumen de aLCR.

En la siguiente tabla se muestra el número de descargas epilépticas analizadas en los experimentos de modulación de los niveles de NO, tanto en animales sometidos a kindling con PTZ como en animales control (tabla 5.7).

Rata	Tipo Rata	aLCR	7-NI	MK-801	aLCR	SNAP
1	Salina	0	3	0	0	0
2	Salina	0	5	0	0	2
3	Salina	0	2	0	0	0
4	PTZ	2	6	2	-	-
5	PTZ	7	13	4	-	-
6	PTZ	3	3	2	9	4
7	PTZ	9	6	4	11	7
8	PTZ	5	3	2	5	4
9	PTZ	6	3	7	18	16
10	PTZ	1	0	1	6	1
Totales		33	54	24	49	34

Tabla 5.7.- Número de descargas epilépticas analizadas en los experimentos de modulación de los niveles de NO. La tabla muestra las descargas epilépticas registradas por rata, en cada experimento. Los datos marcados con el símbolo – corresponden a experimentos no realizados.

La posición de las cánulas de inyección fue chequeada después de finalizar el experimento, como se muestra en la figura 5.23. Así, se pudo corroborar que las cánulas estaban localizadas en la corteza primaria somatosensorial, 6 de ellas en la región que controla las patas traseras y 1 en la región del tronco.

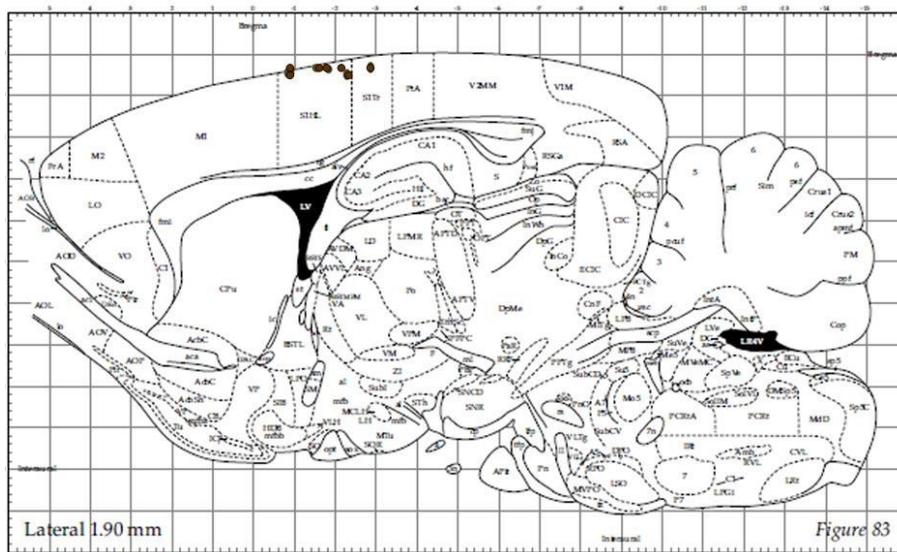


Fig. 5.23.- Posiciones de las cánulas de inyección. S1HL: corteza primaria somatosensorial, región patas traseras. S1Tr: corteza somatosensorial primaria, región del tronco (Esquema tomado de Paxinos, 2008).

Como se verá más adelante, 7-NI fue capaz de inducir descargas epilépticas. En la siguiente figura, se muestra un registro, tanto ipsi- como contra-lateral, obtenido posterior a la administración de 7-NI por una de las cánulas implantadas (figura 5.24). Al analizar la amplitud de ambos registros, se observó, que la amplitud de las descargas epilépticas en el registro del hemisferio ipsilateral a la administración de 7-NI es $1,15 \pm 0,05$ mayor que en el hemisferio contralateral ($p < 0,01$).

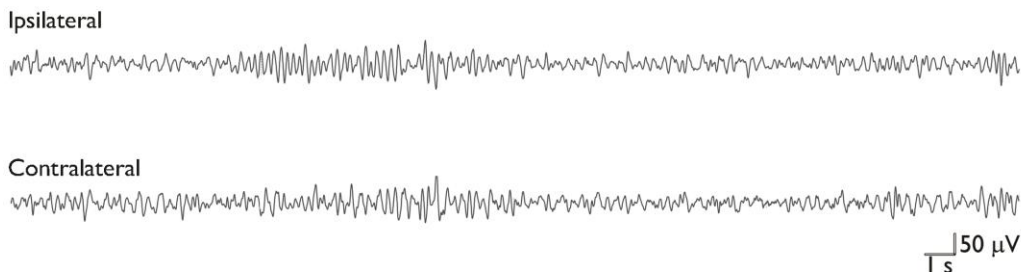


Fig. 5.24.- Registro de EEG posterior a la administración de 7-NI. En la figura se muestran 20 segundos de registro electroencefalográfico con la presencia de una descarga epiléptica, posterior a la administración de 7-NI. El registro superior muestra el canal correspondiente a la corteza en que fue inyectado el 7-NI; mientras que el registro inferior, corresponde a la corteza contralateral, en el mismo tiempo.

5.4.1.- La administración intracortical de 7-NI induce descargas epilépticas en ratas controles y en ratas sometidas a kindling farmacológico.

En la figura 5.25 se muestra que la administración intracortical de 7-NI (300 μ M) es capaz de inducir DE en ratas controles y en ratas sometidas a kindling farmacológico. En cambio, al aplicar MK-801 (5mg/mL), 90 minutos después de la administración de 7-NI, las descargas epilépticas son inhibidas (figura 5.26).

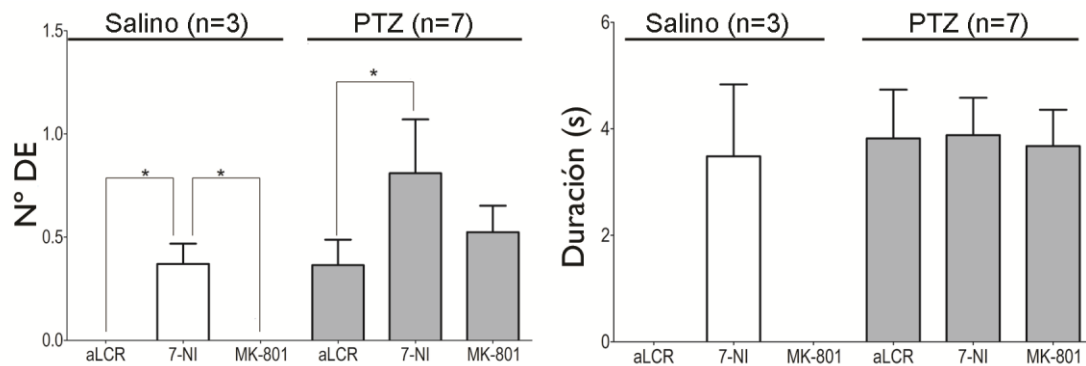


Fig. 5.25.- La inhibición de la nNOS induce un aumento en el número de descargas epilépticas. A la izquierda se muestra el número de descargas epilépticas por minuto presentes en cada condición experimental. Las ratas control (salino) no presentaron descargas epilépticas en el registro basal ni después de la administración de MK-801. A la derecha se muestran las duraciones de las descargas epilépticas, que no presentaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales. Entre paréntesis se observa el número de ratas utilizadas en cada experimento. * $p < 0,05$ en ANOVA de una vía con post test de Bonferroni.

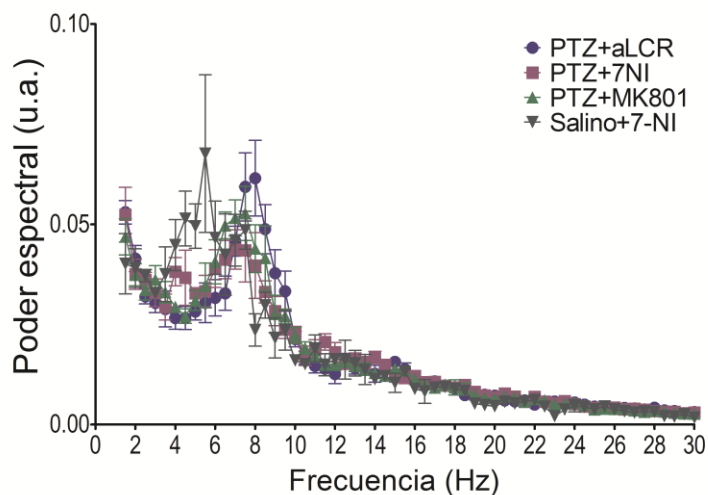


Fig. 5.26.- Perfil espectral de descargas epilépticas en presencia de 7-NI. Se muestran los perfiles espectrales de las descargas epilépticas inducidas con 7-NI en las ratas control (salino) y en las ratas sometidas a kindling tratadas con aLCR, 7-NI y MK-801. No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas punto a punto con el test de Student de dos colas.

5.4.2.- La administración intracortical de SNAP disminuye la duración de las descargas epilépticas.

Como la inhibición de síntesis de NO induce un aumento de descargas epilépticas, se realizó la prueba inversa, que fue determinar el efecto del aumento del NO intra-cortical al utilizar SNAP, lo que debería inhibir las descargas epilépticas. La administración localizada de SNAP (200 μ M) en la corteza cerebral en ratas PTZ, en que se cuantificaron las descargas epilépticas cada 10 minutos posterior a su administración, disminuye el número de descargas epilépticas en forma significativa sólo a los 20 minutos; mientras que la duración promedio de las descargas epilépticas es significativamente menor durante los 30 minutos posteriores a la administración de SNAP (figura 5.27). En las ratas controles sólo se producen dos descargas epilépticas en una sola rata, a los 42 y 88 minutos con duración promedio de 4,8 s.

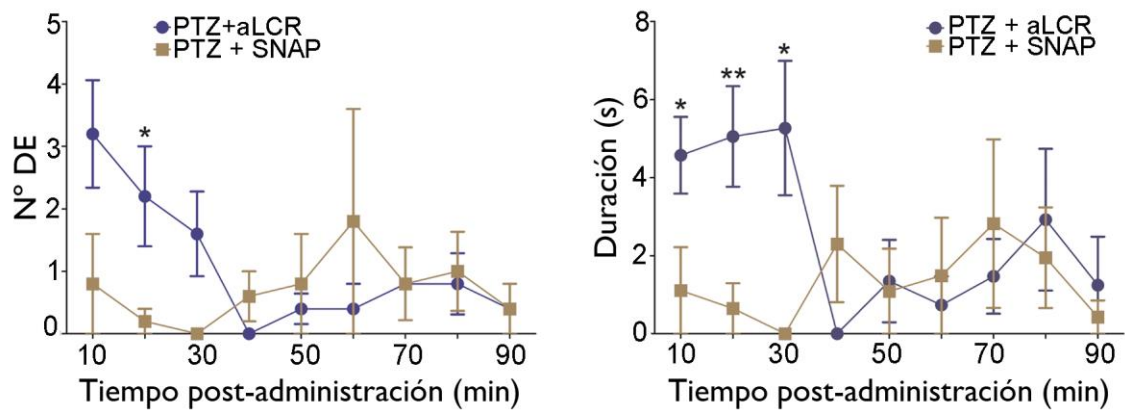


Fig. 5.27.- El dador de NO, SNAP, disminuye la duración de las descargas epilépticas. A la izquierda se muestra el número promedio de descargas epilépticas \pm EE cada 10 minutos de registro en las ratas sometidas a kindling tratadas con aLCR (●) y con SNAP (■). A la derecha se muestran las duraciones de estas descargas epilépticas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en Test de Student pareado. (n=5)

El perfil espectral de las descargas epilépticas inducidas por SNAP en las ratas sometidas a kindling no difiere significativamente del perfil espectral inducido por el kindling mientras que el perfil de las descargas epilépticas de la rata control no es evaluable estadísticamente (figura 5.28).

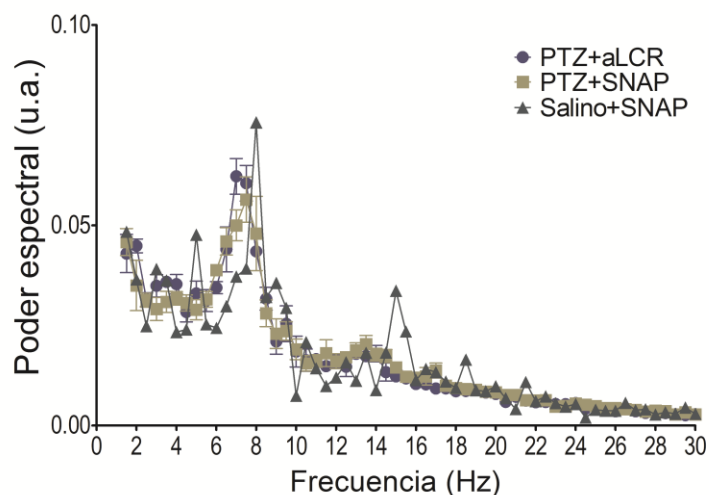


Fig. 5.28.- Perfil espectral de las descargas epilépticas de ratas con niveles corticales de NO aumentados. Se muestran los perfiles espectrales de las descargas epilépticas inducidas con SNAP en ratas control y sometidas a kindling con aLCR y SNAP. No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar cada frecuencia entre las 3 condiciones con el test de Student.

En resumen, en la corteza somatosensorial la inhibición de la producción de NO induce un aumento de descargas epilépticas mientras que un dador de NO induce principalmente descargas epilépticas de mayor duración. Con esto se muestra que los niveles de NO modulan la excitabilidad neuronal en la corteza cerebral, lo que se refleja en una modulación de número y duración de las descargas epilépticas.

6.- DISCUSIÓN

El principal aporte de la presente tesis es la caracterización electroencefalográfica del kindling farmacológico con PTZ, lo que permitió una evaluación objetiva de mecanismos subyacentes y de intervenciones terapéuticas tendientes a inhibir la epileptogénesis. Este modelo nos permitió establecer que NO modula la duración y número de descargas epilépticas en la corteza cerebral.

A continuación se discutirán los principales resultados de esta tesis y las proyecciones que se desprenden de este trabajo.

6.1.- MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA

En este trabajo, utilizamos el antagonista GABAérgico PTZ para inducir descargas epilépticas. Los antagonistas GABAérgicos son ampliamente utilizados experimentalmente para inducir epilepsia [66, 67, 69, 92-94]. Las neuronas inhibitorias son, en general, interneuronas que residen en todas las estructuras neurales, en las cuales actúan localmente. Estas estructuras se conectan a través de neuronas de proyección, que son excitadoras. Un esquema general de esta organización se muestra en la figura 6.1. Así, el bloqueo de la neurotransmisión inhibitoria lleva a hiperexcitabilidad generalizada en los circuitos centrales. Los antagonistas GABAérgicos más utilizados en modelos de epilepsia son PTZ, bicuculina, penicilina y picrotoxina [93, 95]. Estos fármacos bloquean al receptor ionotrópico para GABA, R-GABA_A. La bicuculina actúa mediante antagonismo competitivo; mientras que PTZ y picrotoxina mediante antagonismo no competitivo. Penicillina no tiene un mecanismo de acción claro, aunque se sabe que está mediado por este receptor [96]

Similarmente, los agonistas glutamatérgicos desestabilizan el equilibrio entre excitación e inhibición, favoreciendo la ocurrencia de descargas epilépticas. Entre éstos se encuentran el ácido kaínico, que al actuar como agonista de receptores glutamatérgicos induce convulsiones. Las lesiones patológicas inducidas por ácido

kaínico en el lóbulo temporal incluyen esclerosis hipocampal y pérdida de interneuronas GABAérgicas [97]. A pesar de que los compuestos mencionados son capaces de inducir ELT, los mecanismos subyacentes no son idénticos en cuanto a áreas cerebrales preferentemente implicadas, manifestaciones conductuales etc. [66, 69, 80] Así es como también la epilepsia es considerada un síndrome altamente heterogéneo.

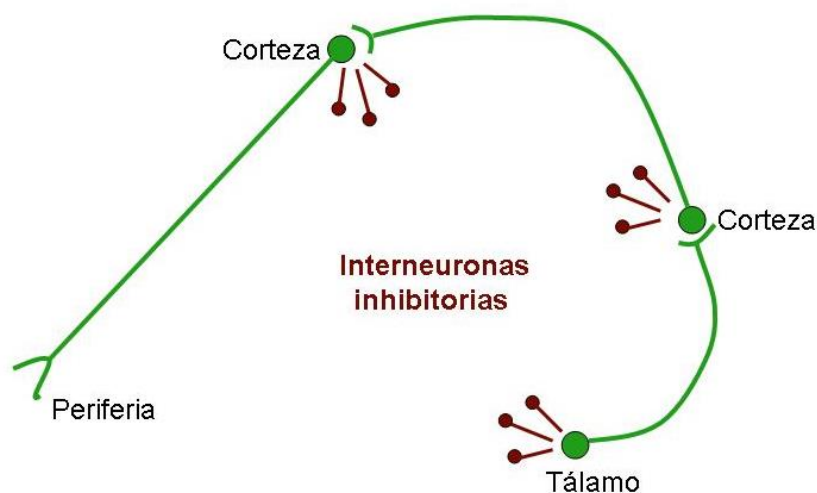


Fig. 6.1.- Esquema de la modulación de circuitos excitadores por interneuronas inhibitorias. En el esquema se señalan en verde las neuronas excitadoras y en café las interneuronas inhibitorias, que son bloqueadas por agentes como el PTZ.

En pacientes, la injuria cerebral rara vez consiste en un estímulo farmacológico. En general, los estímulos más habituales en pacientes son más complejos y de más difícil estandarización. Un ejemplo extremo son los traumas craneanos. Por ello, se acepta que los modelos animales basados en fármacos, si bien reproducen el síntoma final de la patología (crisis epilépticas), pueden ser particulares en cuanto a los mecanismos de epileptogénesis implicados. En general, un buen modelo animal para el estudio de la epileptogénesis en la ELT debería presentar las siguientes características [95, 97]:

- Desarrollar crisis epilépticas espontáneas y recurrentes.
- Inducir crisis epilépticas conductualmente similares a las desarrolladas por los pacientes en cada tipo de epilepsia a estudiar, en este caso, la ELT.

Como discutimos más abajo, estas características se cumplen en el modelo de kindling farmacológico con PTZ, ampliamente usado en la literatura (ver tabla 6.1). Uno de los inconvenientes de todos los modelos animales es que el factor edad no se ajusta a la realidad, dado que los pacientes con ELT son de distintos grupos etarios mientras que en modelos animales, con la intención de generar reproducibilidad, se estandariza la edad de inicio del tratamiento.

La caracterización electroencefalográfica, especialmente en el dominio de frecuencia, es escasa. Más aún, PTZ en dosis bajas se caracteriza principalmente por inducir episodios similares a crisis de ausencia con detención repentina de movimientos y/o fijación de la mirada [80, 98], de manera que la detección de cambios basados en la conducta no son fáciles de pesquisar, siendo por ello más imprecisas las interpretaciones de intervenciones con potencial terapéutico.

Referencia	Modo de Admin.	Dosis PTZ (mg/Kg)	Cepa	Caracterización		
				Conducta	EEG	DE
Fanselow & cols. [99]	1 Dosis i.p.	40	Long Evans	No	Si	No
Marescaux & cols. [100]	1 Dosis i.p.	10 y 20	Wistar	No	Si	Si
Rocha & cols. [101]	1 Dosis i.p.	30	Wistar	Si	No	No
Beig & cols. [102]	1 Dosis a i.p.	50	Wistar	No	Si	No
Min & cols. [103]	1 Dosis i.p.	45	SD	No	Si	Si
Ben-Ari & cols. [104]	1 Dosis i.p.	60	Wistar	No	Si	No
Itoh & cols. [105]	1 Dosis i.p.	60	Wistar	Si	Si	No
Golarai & cols. [106]	Infusión i.v.	24	SD	No	Si	No
Luttjohan & cols. [80]	Bolo i.v. e Infusión i.v.	20 10 c/15 min	Wistar	Si	Si	No
Kobayashi & cols. [107]	Infusión i.v.	N.D.	Wistar	No	Si	No

Jutkiewicz & cols. [108]	>2 dosis i.p.	32, 56	SD	Si	Si	No
Rocha & cols. [101]	25 dosis i.p.	30	Wistar	Si	No	No
Cremer & cols. [109]	7 dosis i.p.	40	Wistar	Si	No	No
Itoh & cols. [105]	11 dosis i.p.	40	Wistar	Si	No	No
Schmoll & cols. [110]	>3 dosis i.p.	20, 30 y 50	SD	Si	No	No

Tabla 6.1.- Crisis epilépticas inducidas con PTZ en ratas adultas. La tabla muestra algunos estudios de caracterización conductual de crisis epilépticas (conducta), registros electroencefalográficos (EEG) y análisis espectral de descargas epilépticas (DE), inducidas con PTZ. SD: Sprague Dawley; N.D.: no declarado.

Como se desprende de la tabla 6.1, PTZ es usado en un amplio rango de dosis en la literatura. Esta variabilidad en las dosis utilizadas nos llevó a realizar un análisis conductual con 3 dosis administradas de manera repetitiva (20, 30 y 40 mg/kg), lo que representa un proceso de kindling farmacológico. El progreso en la intensidad de las crisis fue similar en todas las ratas. Sólo una rata, tratada con 40 mg/Kg de PTZ murió durante una convulsión.

En parte, muchas divergencias en la literatura se explican porque los parámetros farmacocinéticos del PTZ son dependientes de la especie, a pesar de que ninguno de los metabolitos de PTZ encontrados en orina y en plasma ha mostrado actividad farmacológica [76]. En el caso de esta tesis, el hecho de analizar electroencefalográficamente las descargas epilépticas en días de inyección (es decir, en presencia de PTZ), de no inyección (en virtual ausencia de PTZ) y 25 días más tarde (en ausencia de PTZ) se traduce en un claro aporte en el tema.

En cuanto a los aspectos conductuales después de administración de dosis agudas de PTZ, a partir de los 20 mg/Kg se manifiestan crisis epilépticas que aumentan en intensidad hasta los 125 mg/Kg [72, 105]. Interesantemente, André y colaboradores observaron que PTZ 20 mg/kg induce episodios de inmovilidad asociados a descargas epilépticas, similares a nivel descriptivo a las encontradas por

nosotros [72]. Las ratas que se trataron con 20 mg/Kg no progresaron hasta una crisis generalizada (grados 5 y 6), probablemente por diferencias metodológicas, ya que, en el trabajo de Schmoll las inyecciones a esta misma dosis son diarias [110], lo que debido a las características farmacocinéticas de PTZ podría generar una acumulación de las dosis administradas. Consistentemente, las ratas que tratamos a dosis más altas (30 y 40 mg/Kg), manifestaron grados de crisis epilépticas mayores que las ratas tratadas con 20 mg/Kg.

Las ratas evaluadas conductualmente manifestaron su primera crisis de manera casi inmediata después de la administración de PTZ (desde 5 segundos), como es también reportado por otros autores [67, 80, 110]. Estas crisis continúan intermitentemente y en forma decreciente después de la inyección, como también lo reflejan nuestros resultados [34].

Las crisis epilépticas tienden a ocurrir a determinadas horas del ciclo circadiano, lo que depende de la fisiopatología de la epilepsia. Así, la ELT en humanos tiene un patrón diurno (es decir, ocurre durante la fase luz) mientras la epilepsia frontal es nocturna [111-114]. Se piensa que los estados del ciclo sueño vigilia tienen un efecto modulador sobre la incidencia de crisis epilépticas [112]. Además del estado conductual, otros factores relacionados con variables circadianas podrían modular la probabilidad de ocurrencia de crisis epilépticas, generando patrones circadianos más complejos [115-117].

Sorprendentemente, en las ratas, que son animales nocturnos (es decir, están activas durante la oscuridad) las crisis epilépticas inducidas por PTZ también ocurren durante la fase luz, a pesar que la susceptibilidad al efecto del PTZ es menor durante esta fase [118]. Como el sueño de la rata es fragmentado, ello no impide que las descargas epilépticas ocurran durante la vigilia en la fase luz. Esto es un tópico interesante a analizar, para lo cual sería necesario realizar registros de EEG de días completos, posterior al término del kindling, estudios que aún no están disponibles en la literatura. Así, se determinaría el patrón circadiano de las descargas epilépticas.

6.2 Caracterización electroencefalográfica del kindling con PTZ

Los trabajos en que se caracterizan las anomalías del EEG inducidas por una inyección de PTZ reportan la presencia de poliespigas de mayor amplitud y menor frecuencia que el registro basal [80, 93, 108]. Las poliespigas reflejan una alta sincronía de la actividad neuronal [93, 99] que se puede deber a la falta de inhibición sobre las neuronas excitadoras. La mejor caracterización encontrada en la literatura, muestra descargas epilépticas inducidas con una dosis única de 20 mg/Kg de PTZ. Éstas se manifiestan en el rango de frecuencias entre 6 y 9 Hz y se desarrollan progresivamente durante los primeros 20 minutos post inyección, resultados que son consistentes con los nuestros. Su duración promedio es de 1,5 s y desaparecen entre los 120 a 180 minutos post administración de PTZ [100]. El estudio de Andre y colaboradores muestra que las características de amplitud y frecuencia de las descargas epilépticas, inducidas por una dosis aguda de PTZ, son dosis dependientes [72]. Estudios adicionales también apoyan nuestros hallazgos [80, 93, 99, 100, 108], pudiendo así concluir que desde el punto de vista descriptivo, nuestras observaciones son consistentes con la literatura.

En nuestro modelo, el aumento en el poder de esta banda refleja la participación del hipocampo en las descargas epilépticas. Ello confirma una vez más la hipótesis de que diversas estructuras cerebrales son diferencialmente susceptibles a un insulto que afecta a todo el cerebro, como lo es la aplicación sistémica de PTZ.

En cuanto al curso temporal de los cambios en el perfil espectral, la banda theta disminuye a lo largo de los días de inyección de PTZ. Esto podría deberse al desarrollo de tolerancia o de adaptaciones al agente farmacológico, aunque en la literatura hay datos disímiles al respecto. Por un lado, no se observan cambios en la afinidad ni en el número de sitios de unión al R-GABA_A [109]; mientras que, hay otro estudio que muestra disminución en el número de sitios de unión, pero no hay diferencias en la afinidad a este receptor [101]. Además, se ha reportado que PTZ induce cambios en el número de sitios de unión de receptores glutamatérgicos. Así, el receptor kaínico disminuye sus sitios de unión en la amígdala, el giro dentado y CA1. Por otro lado,

aumentan los R-NMDA en la membrana en estas mismas estructuras [109], constituyendo posibles mecanismos de cambios de excitabilidad hipocampal. Otra alternativa para explicar este fenómeno se puede deber a procesos homeostáticos endógenos, tendientes a contrarrestar el daño hipocampal. El aumento de banda theta en el día 44 comparado con el día 20 indicaría que los mecanismos homeostáticos de reparación y defensa han sido superados por un proceso epileptogénico progresivo.

6.3.- PERSISTENCIA DE LOS EFECTOS DEL KINDLING CON PTZ

En un modelo de ELT se establecen circuitos neuronales hiper-excitables, capaces de producir descargas epilépticas en forma espontánea y recurrente. Por esta razón, las ratas sometidas a kindling con PTZ fueron registradas 25 días después de la última administración. Observamos que las descargas epilépticas siguen presentes, aumentando su número mientras que la duración permanece constante, si se compara con el día 20 del protocolo. Estos datos son consistentes con la idea que el fenómeno de kindling induce modificaciones sostenidas en el tiempo y que además tienden a amplificarse. Además, el análisis espectral de las descargas epilépticas del día 44 reflejó un aumento de la banda theta en relación al último día de kindling, apoyando la idea una reorganización dinámica de los circuitos hipocampales.

6.4.- EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LAS DESCARGAS EPILÉPTICAS

La administración de PTZ altera el estado redox de las células, [122-124], favoreciendo el estrés oxidativo. Una dosis única de PTZ puede inducir mayor peroxidación de los lípidos del tejido cerebral en ratas [123]. El NO, sumado al estrés oxidativo inducido por PTZ, genera el ión nitrosonio, el cual es capaz de nitrar componentes celulares y llevar a neurotoxicidad [46, 54]. Por otro lado, en sinaptosomas de corteza se ha demostrado que la concentración de glutatión (GSH) está aumentada 7 veces, en relación al hipocampo, posterior al kindling (datos no publicados). Esto podría dar cuenta, en parte, de la diferente susceptibilidad de estas estructuras al efecto del NO.

Se ha observado que el pretratamiento sistémico, vale decir, utilizando administraciones subcutáneas, intraperitoneales o intravenosas de inhibidores selectivos de la nNOS, previo a una inyección de PTZ, disminuye las crisis epilépticas [125, 126]. Por otro lado, en un tratamiento con administraciones repetitivas de PTZ, la administración sistémica de 7-NI disminuyó el grado de crisis epiléptica máxima alcanzada [127]. En ratas de menor edad tratadas con una dosis aguda de PTZ, el efecto de 7-NI administrado por una vía sistémica depende de la etapa del desarrollo, de tal manera que, en ratas de 10 días tiene efecto pro-epileptogénico y en las de 21 días no tiene efecto [121]. Al contrario, inhibidores no específicos administrados por vía intraperitoneal de la NOS tienen efecto antiepiléptico en ratones adultos tratados con una dosis única de PTZ [64], mientras que el pretratamiento con dadores de NO e inhibidores específicos e inespecíficos de la nNOS en ratones tratados con infusión i.v. de PTZ, no tiene efecto sobre el número o el grado de las crisis epilépticas [59]. Todos estos antecedentes controversiales apoyan nuestra idea que el NO tiene efectos específicos en diferentes estructuras cerebrales que se podrían entender mediante la modulación localizada, como se hizo en la presente tesis.

En otros estudios, en que se inducen convulsiones con dosis únicas de ácido kaínico y picrotoxina, la administración sistémica de 7-NI tiene efecto proconvulsivante y aumenta la mortalidad de las ratas [119]. En otro estudio con ácido kaínico, el 7-NI sistémico tiene efecto antiepileptogénico [120]. Por otro lado, el uso de L-NAME, inhibidor de las 3 isoformas de NOS, tiene efecto proconvulsivante en los modelos agudos con PTZ y picrotoxina [64, 119, 121]. Cuando la estrategia para elevar NO es el uso por vía intraperitoneal de L-arginina, el sustrato de las NOS en ratas P10 y P21 sometidas a dosis única de PTZ, se observa un efecto proconvulsivo [121]. El SNAP no ha sido utilizado *in vivo* para estos fines.

En el Laboratorio de Neurociencias se encontró que NO inhibe la excitabilidad de cultivos primarios de neuronas corticales pero no hipocampales, lo que se acompañó de un efecto diferencial sobre la sobrevida neuronal: mientras que en cultivos corticales NO favoreció la sobrevida, en cultivos hipocampales la disminuyó [57, 130]. Por otro lado, Calabrese propone que los niveles bajos de NO son neuroprotectores y los

niveles altos neurotóxicos [54]. El estudio realizado en el Laboratorio de Neurociencias, muestra que los niveles de NO medidos fueron similares en ambos tipos de cultivo [57]. Por otro lado, los blancos del NO pueden ser diferenciales en ambas estructuras. Se sabe que una de las vías de neuroprotección está mediada por la S-nitrosilación de la subunidad GluN2A del R-NMDA [55], que sólo se observa en la corteza. Este papel neuroprotector del NO en neuronas corticales es consistente con el efecto de 7-NI, que aumentó el número de las descargas epilépticas. Además, estas descargas fueron inhibidas por la administración de MK-801, sugiriendo el R-NMDA favorece en la excitación neuronal. Por otro lado, la administración de SNAP, inhibió la duración de descargas durante los primeros 30 minutos siguientes a su administración. A pesar de que la vida media de SNAP es mayor a 30 minutos, esta inhibición es menor probablemente por la difusión de este compuesto.

Estos resultados nos permiten asignar un rol antiepileptogénico al NO en la corteza cerebral, reflejando un claro aporte al estudio de los efectos diferenciales del NO, dado que no existen en la literatura antecedentes al respecto. En un futuro, será necesario realizar experimentos tendientes a dilucidar el mecanismo molecular involucrado en este efecto. Esto permitiría proponer nuevos blancos terapéuticos que actualmente no se considera en la terapia farmacológica de la epilepsia, como se comenta a continuación.

6.4.- FARMACOTERAPIA ACTUAL

En la ELT los fármacos de primera elección son carbamazepina, lamotrigina, topiramato, oxycarbazepina, levetiracetam y zonisamida. Ninguno de ellos muestra efectividad superior en relación a los otros. Un gran número de pacientes con ELT se hace refractario a ellos y, a pesar de la terapia, presenta crisis epilépticas. Una de las teorías de farmacoresistencia en ELT es la pérdida de sensibilidad en algunos blancos terapéuticos. Por ejemplo, la carbamazepina produce un bloqueo dependiente del uso de la actividad del canal de sodio. Por otro lado, una reorganización de los subtipos de receptores GABA-A en el hipocampo de los pacientes, lleva a una disminución de la potencia de los fármacos que aumentan la inhibición GABAérgica [131].

Los principales mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos incluyen modulación de la actividad de canales de sodio, calcio y potasio [11, 92]. Sus efectos están orientados a disminuir la excitabilidad neuronal, y sus efectos secundarios abarcan desde trastornos gastrointestinales hasta reacciones idiosincráticas graves [132]. Para una mejor comprensión de los mecanismos de acción de los fármacos y sus efectos adversos, éstos se resumieron en la tabla 6.2.

Familia	Mecanismo de acción	Efectos Adversos
Sulfonamidas:		
Acetazolamida [132, 133]	Inhibición de la anhidrasa carbónica	Hematológicos, dermatológicos y reacciones idiosincráticas sistémicas
Carisbamato [134]	Bloqueo de canales de sodio activados por voltaje	Dolor de cabeza, diplopía, vértigo, mareos, somnolencia, náuseas, vómitos, trastornos de la marcha, coordinación anormal
Zonisamida [135]	Bloqueo de los canales de sodio, bloqueo de los canales de calcio tipo T, potenciación GABAérgica e inhibición de anhidrasa carbónica	Somnolencia, mareos, ataxia, dolor de cabeza, dificultad para concentrarse, deterioro de la memoria, agitación, irritabilidad, diplopía, confusión, depresión, náuseas, anorexia, pérdida de peso, nefrolitiasis, hipertermia, oligohidrosis, erupciones cutáneas, discrasias sanguíneas y otras reacciones de hipersensibilidad
Felbamato [132, 136]	Bloqueo de canales de sodio, potenciación de R-GABA _A , antagonismo de los R-NMDA	Toxicidad hepática, anemia aplásica, insomnio, dolor de cabeza, anorexia, pérdida de peso, fatiga, mareos, letargo, alteración del ánimo y del comportamiento, ataxia, trastornos visuales, erupción, síntomas gastrointestinales
Topiramato [137]	Bloqueo de canales de sodio; inhibición de R-GABA _A , inhibición de R-AMPA; inhibición de canales de calcio de alta tensión, inhibición de anhidrasa carbónica	Mareos, ataxia, dolor de cabeza, parestesia, temblor, somnolencia, disfunción cognitiva, confusión, agitación, amnesia, depresión, labilidad emocional, náuseas, diarrea, diplopía, pérdida de peso

Familia	Mecanismo de acción	Efectos Adversos
<i>Benzodiazepinas:</i>		
Clobazam, clonazepam, clorazepato, nitrazepam, diazepam, midazolam, lorazepam [132, 138, 139]	Potenciación de R-GABA _A . También pueden inhibir canales de sodio.	Sedación, alteración del comportamiento y del ánimo, disminución cognitiva, depresión respiratoria, hipotensión
<i>Pirrolidonas:</i>		
Brivaracetam [140]	Bloqueo de canales de sodio activados por voltaje	Dolor de cabeza, somnolencia, fatiga, náuseas y discinesia
Levetiracetam [141]	Bloqueo de receptores de calcio y de sodio activados por voltaje	Mareos, diplopía, ataxia, visión borrosa, somnolencia, insomnio, dolor de cabeza, náuseas, astenia, erupción cutánea y otras reacciones de hipersensibilidad
Piracetam [142]	No claro	Mareos, insomnio, náuseas, malestar gastrointestinal, hiperkinesia, aumento de peso, temblores, agitación, somnolencia, erupción
<i>Succinamidas:</i>		
Etosuximida [132, 143]	Inhibición de canales de calcio tipo T	Síntomas gastrointestinales, somnolencia, ataxia, diplopía, dolor de cabeza, mareos, hipo, sedación, alteraciones del comportamiento, reacciones psicóticas agudas, síntomas extrapiramidales, discrasias sanguíneas, erupción cutánea, síndrome similar al lupus, reacciones idiosincrásicas
<i>Carbamazepina y derivados:</i>		
Carbamazepina [132, 144]	Bloqueo de canales de sodio activados por voltaje	Somnolencia, fatiga, mareos, ataxia, diplopía, visión borrosa, discinesia, reacciones idiosincrásicas, hiponatremia, arritmias cardíacas, disminución de la densidad mineral ósea

Familia	Mecanismo de acción	Efectos Adversos
Oxcarbazepina [145]	Bloqueo de receptores de calcio, tipo P y N, y de sodio activados por voltaje	Mareos, diplopía, ataxia, somnolencia, dolor de cabeza, erupción, trastornos gastrointestinales, fatiga, hiponatremia
<i>Derivados de Aminoácidos:</i>		
Pregabalina [146]	Bloqueo de canales de calcio	Mareos, somnolencia, ataxia, astenia, aumento de peso, disturbios visuales, dificultad para concentrarse, temblor, edema periférico
Retigabina [147]	Activación de canales de potasio dependientes de voltaje	Mareos, somnolencia, fatiga, confusión, disartria, ataxia, temblores, visión borrosa, náuseas, dificultad para orinar, retención de orina
Vigabatrina [148]	Inhibición irreversible de la GABA transaminasa	Estrechamiento irreversible del campo visual, aumento de peso, sedación, fatiga, mareos, visión doble o borrosa, nistagmus, ataxia, parestesias, amnesia, depresión, psicosis, agresión, confusión, estupor, somnolencia, insomnio, hiperactividad, agitación, hipotonía, hipertonía, agravamiento de las crisis mioclónicas y otros tipos de crisis generalizadas, trastornos gastrointestinales
Tiagabina [149]	Inhibición de la recaptación de GABA	Mareos, astenia, nerviosismo, temblor, dificultades para concentrarse, depresión, problemas de lenguaje, exacerbación de crisis epilépticas (convulsiones mioclónicas y de ausencia)
Gabapentina [132, 150]	Bloqueo de canales de sodio, potenciación de R-GABA _A .	Somnolencia, mareos, ataxia, dolor de cabeza, temblor, diplopía, náuseas, vómitos, rinitis, edema en las piernas, aumento de peso

Familia	Mecanismo de acción	Efectos Adversos
Otros:		
Fenitoína [132, 151]	Bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje	Ataxia, mareos, letargo, sedación, dolor de cabeza, disfunción cognitiva, discinesia, encefalopatía aguda, reacciones de hipersensibilidad, toxicidad hepática, discrasias sanguíneas, vasculitis, hiperplasia gingival, deficiencia de ácido fólico, anemia megaloblástica, deficiencia de vitamina K, disminución de inmunoglobulinas, cambios de humor, depresión, acné, hirsutismo, neuropatía periférica, osteomalacia, hipocalcemia, disfunciones hormonales, pérdida de la libido, miopatía, alteraciones del tejido conectivo, pseudolinfoma, efectos teratogénicos
Rufinamida [152]	Bloqueo de canales de sodio dependientes de potencial de acción	Mareos, dolor de cabeza, náuseas, somnolencia, diplopía, visión borrosa, fatiga y ataxia
Lacosamida [153]	Bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, puede interactuar con colapsina 2 (CRMP-2)	Mareos, dolor de cabeza, náuseas, diplopía.
Lamotrigina [132, 154]	Bloqueo de canales de calcio y de sodio activados por voltaje, inhibición glutamatérgica	Mareos, diplopía, ataxia, visión borrosa, somnolencia, insomnio, dolor de cabeza, náuseas, astenia, erupción cutánea y otras reacciones de hipersensibilidad
Estiripentol [155]	Probable potenciación de la actividad GABAérgica	Somnolencia, ataxia, temblor, hipotonía, distonía, hiperactividad, agresividad y otros trastornos de conducta, insomnio, náuseas, anorexia, pérdida de peso, vómitos y alteraciones hematológicas
Ácido Valproico [132, 156]	No claro. Probable potenciación GABAérgica, atenuación de la excitación glutamatérgica, bloqueo de canales de calcio tipo T	Temblores, sedación, astenia, encefalopatía, síntomas extrapiramidales, náuseas, vómitos, hiperamonemia, aumento de peso, síndrome del ovario poliquístico, pérdida del cabello, alteración de las plaquetas y trastornos de la coagulación, toxicidad hepática, efectos teratogénicos

Tabla 6.2.- Fármacos antiepilépticos. La tabla muestra el mecanismo de acción y los efectos adversos de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia. Ninguno de ellos se relaciona con regulación de niveles de NO.

Las terapias antiepilépticas deberían considerar todos los nuevos hallazgos acerca de los mecanismos celulares y moleculares implicados en el control de la excitabilidad neuronal. En el caso de la presente tesis, se podrían proponer terapias tendientes a aumentar los niveles corticales de NO, así como disminuirlos en el hipocampo. Por cierto, estas terapias revisten mayor complejidad que un simple tratamiento farmacológico y podrían incluir estimulación localizada de circuitos neuronales, terapia celular, nanoterapias, etc. Por otra parte, la identificación de los blancos del NO, como por ejemplo las proteínas modificadas por S-nitrosilación, podría aumentar la especificidad de los tratamientos. En este caso, la terapia debería estar dirigida a la(s) proteína(s) río debajo de NO. Así, en el laboratorio se encontró que las proteínas S-nitrosiladas en el hipocampo (y que probablemente se relacionan con excitotoxicidad) son diferentes a las proteínas modificadas en la corteza cerebral (probablemente relacionadas con mecanismos neuroprotectores). Una vez que se conozca el papel funcional de estas proteínas en la ELT, se podría proponer el tipo de intervención óptima. También, el patrón circadiano de las descargas epilépticas, que en la ELT humana ocurren durante la fase de actividad, sugiere que el esquema de administración de la terapia debe ser en horarios adecuados. Así, en el caso de fármacos debería tender a la obtención de concentraciones máximas en los horarios en los cuales la probabilidad de ocurrencia de la crisis es máxima.

Un modelo de epileptogénesis, estandarizado como el presentado en esta tesis, es decir, en el cual la epilepsia se instala de manera gradual y controlada, permitiría evaluar nuevas terapias anticonvulsivas en las distintas etapas de su desarrollo [94, 157]. También permitiría estudiar cambios plásticos subyacentes al aumento en la excitabilidad neuronal durante la epileptogénesis [69, 158]. Este estudio permitió caracterizar con mayor precisión el kindling farmacológico con PTZ, que a pesar de su extenso uso, no existía hasta el momento (tabla 6.1).

7.- CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La caracterización del kindling farmacológico con PTZ permitió generar una herramienta útil para manipulaciones farmacológicas de la epileptogénesis. En este caso, la modulación de los niveles corticales de NO sugieren que NO tiene un rol antiepiléptogénico en la corteza cerebral.

8.- REFERENCIAS

1. WHO, ILAE, and IBE, *Atlas: Epilepsy Care in the World*, 2005, WHO Library Cataloguing-in-Publication Dat.
2. Engel, J. and T.A. Pedley, *What Is Epilepsy?*, in *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, J. Engel and T.A. Pedley, Editors. 2008, Lippincott Williams & Wilkins. p. 1-7.
3. Chang, B.S. and D.H. Lowenstein, *Epilepsy*. N Engl J Med, 2003. **349**(13): p. 1257-66.
4. Fisher, R.S., et al., *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. Epilepsia, 2005. **46**(4): p. 470-2.
5. Berg, A.T. and I.E. Scheffer, *New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century*. Epilepsia, 2011. **52**(6): p. 1058-62.
6. Berg, A.T., et al., *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. Epilepsia, 2010. **51**(4): p. 676-85.
7. Shorvon, S., *The etiological classification of epilepsy*, in *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon causes in Adults and Children*, S. Shorvon, F. Andermann, and R. Guerrini, Editors. 2011, Cambridge University Press. p. 21-23.
8. Shorvon, S.D., *The etiologic classification of epilepsy*. Epilepsia, 2011. **52**(6): p. 1052-7.
9. Engel, J., Jr., *Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?* Neuroscientist, 2001. **7**(4): p. 340-52.
10. Engel, J., P. Williamson, and H.G. Wieser, *Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis*, in *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, J. Engel and T.A. Pedley, Editors. 2008, Lippincott Williams & Wilkins. . p. 2479-2486.
11. Avoli, M., et al., *Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain*. Prog Neurobiol, 2005. **77**(3): p. 166-200.
12. Leppik, I.E., et al., *Basic research in epilepsy and aging*. Epilepsy Res, 2006. **68 Suppl 1**: p. S21-37.
13. Blume, W.T., et al., *Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology*. Epilepsia, 2001. **42**(9): p. 1212-8.
14. Shorvon, S., *Introduction to the concept of symptomatic epilepsy*, in *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adult and Children* S. Shorvon, F. Andermann, and R. Guerrini, Editors. 2011, Cambridge University Press. p. 113-117.
15. Engel, J., Jr., *The goal of epilepsy therapy: no seizures, no side effects, as soon as possible*. CNS Spectr, 2004. **9**(2): p. 95-7.
16. Cendes, F. and M.E. Morita, *Hippocampal Sclerosis*, in *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adult and Children*, S. Shorvon, F. Andermann, and R. Guerrini, Editors. 2011, Cambridge University Press. p. 363-372.

17. Cavazos, J.E. and D.J. Cross, *The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy*. *Epilepsy Behav*, 2006. **8**(3): p. 483-93.
18. Kandel, E.R. and S.A. Siegelbaum, *Synaptic Integration*, in *Principles of Neural Science*, E.R. Kandel, J.H. Schwartz, and T.M. Jessell, Editors. 2000, McGraw-Hill Companies, Inc. p. 207-228.
19. Jorgensen, E.M., *GABA*. *WormBook*, 2005: p. 1-13.
20. Kennedy, M.B., *The postsynaptic density*. *Curr Opin Neurobiol*, 1993. **3**(5): p. 732-7.
21. Ziff, E.B., *Enlightening the postsynaptic density*. *Neuron*, 1997. **19**(6): p. 1163-74.
22. Madden, D.R., *The structure and function of glutamate receptor ion channels*. *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(2): p. 91-101.
23. Coutinho, V. and T. Knopfel, *Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties*. *Neuroscientist*, 2002. **8**(6): p. 551-61.
24. du Bois, T.M. and X.F. Huang, *Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: relevance to schizophrenia*. *Brain Res Rev*, 2007. **53**(2): p. 260-70.
25. Fox, K., et al., *The effect of visual experience on development of NMDA receptor synaptic transmission in kitten visual cortex*. *J Neurosci*, 1992. **12**(7): p. 2672-84.
26. Massey, P.V., et al., *Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression*. *J Neurosci*, 2004. **24**(36): p. 7821-8.
27. Sattler, R., et al., *Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein*. *Science*, 1999. **284**(5421): p. 1845-8.
28. Siegel, G.J., *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. 7th ed. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xxiv, 992 p.
29. Luscher, B., T. Fuchs, and C.L. Kilpatrick, *GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses*. *Neuron*, 2011. **70**(3): p. 385-409.
30. Moss, S.J. and T.G. Smart, *Constructing inhibitory synapses*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(4): p. 240-50.
31. Bormann, J., *The 'ABC' of GABA receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(1): p. 16-9.
32. Calver, A.R., C.H. Davies, and M. Pangalos, *GABA(B) receptors: from monogamy to promiscuity*. *Neurosignals*, 2002. **11**(6): p. 299-314.
33. Siddiqui, A.H. and S.A. Joseph, *CA3 axonal sprouting in kainate-induced chronic epilepsy*. *Brain Res*, 2005. **1066**(1-2): p. 129-46.
34. Tian, F.F., et al., *Mossy fiber sprouting, hippocampal damage and spontaneous recurrent seizures in pentylenetetrazole kindling rat model*. *Acta Neurol Belg*, 2009. **109**(4): p. 298-304.
35. Liu, Z., et al., *Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study*. *Neuroreport*, 1997. **8**(8): p. 2019-23.
36. Ueda, Y., et al., *Glutamate excess and free radical formation during and following kainic acid-induced status epilepticus*. *Exp Brain Res*, 2002. **147**(2): p. 219-26.
37. Delorenzo, R.J., D.A. Sun, and L.S. Deshpande, *Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy*. *Pharmacol Ther*, 2005. **105**(3): p. 229-66.

38. Ebert, U., C. Brandt, and W. Loscher, *Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat*. *Epilepsia*, 2002. **43 Suppl 5**: p. 86-95.
39. Meldrum, B.S., *First Alfred Meyer Memorial Lecture. Epileptic brain damage: a consequence and a cause of seizures*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997. **23**(3): p. 185-201; discussion 201-2.
40. Eid, T., et al., *Glutamate and astrocytes--key players in human mesial temporal lobe epilepsy?* *Epilepsia*, 2008. **49 Suppl 2**: p. 42-52.
41. Lee, S., et al., *Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. **47**(1-2): p. 183-94.
42. Koyama, R. and Y. Ikegaya, *To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus*. *Neuroscientist*, 2005. **11**(4): p. 282-7.
43. Horch, H.W., *Local effects of BDNF on dendritic growth*. *Rev Neurosci*, 2004. **15**(2): p. 117-29.
44. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 677-736.
45. Poo, M.M., *Neurotrophins as synaptic modulators*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(1): p. 24-32.
46. Guix, F.X., et al., *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. *Prog Neurobiol*, 2005. **76**(2): p. 126-52.
47. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
48. Chabrier, P.E., C. Demerle-Pallardy, and M. Auguet, *Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(8-9): p. 1029-35.
49. Kovacs, R., et al., *Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices*. *J Neurosci*, 2009. **29**(26): p. 8565-77.
50. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
51. Schulz, J.B., et al., *Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo*. *J Neurosci*, 1995. **15**(12): p. 8419-29.
52. Huang, P.L. and E.H. Lo, *Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals*. *Prog Brain Res*, 1998. **118**: p. 13-25.
53. Iwakiri, Y., et al., *Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(52): p. 19777-82.
54. Calabrese, V., et al., *Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(10): p. 766-75.
55. Choi, Y.B., et al., *Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(1): p. 15-21.
56. Lipton, S.A., *Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide*. *Trends Neurosci*, 1993. **16**(12): p. 527-32.

57. Sandoval, R., et al., *Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons*. J Neurochem, 2011. **118**(5): p. 760-72.
58. Kambe, Y., et al., *Insensitivity to glutamate neurotoxicity mediated by NMDA receptors in association with delayed mitochondrial membrane potential disruption in cultured rat cortical neurons*. J Neurochem, 2008. **105**(5): p. 1886-900.
59. Akula, K.K., A. Dhir, and S.K. Kulkarni, *Nitric oxide signaling pathway in the anti-convulsant effect of adenosine against pentylenetetrazol-induced seizure threshold in mice*. Eur J Pharmacol, 2008. **587**(1-3): p. 129-34.
60. Delwing, D., C.S. Bavaresco, and A.T. Wyse, *Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration*. Brain Res, 2008. **1193**: p. 120-7.
61. El-Abhar, H.S. and H.M. El Gawad, *Modulation of cortical nitric oxide synthase, glutamate, and redox state by nifedipine and taurine in PTZ-kindled mice*. Epilepsia, 2003. **44**(3): p. 276-81.
62. Penix, L.P., W. Davis, and S. Subramaniam, *Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents*. Epilepsy Res, 1994. **18**(3): p. 177-84.
63. Noyan, B., M.S. Jensen, and G. Danscher, *The lack of effects of zinc and nitric oxide in initial state of pilocarpine-induced seizures*. Seizure, 2007. **16**(5): p. 410-6.
64. Alexander, C.B., et al., *Further studies on anti- and proconvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents*. Eur J Pharmacol, 1998. **344**(1): p. 15-25.
65. Leite, J.P., N. Garcia-Cairasco, and E.A. Cavalheiro, *New insights from the use of pilocarpine and kainate models*. Epilepsy Res, 2002. **50**(1-2): p. 93-103.
66. Jefferys, J.G., *Models and mechanisms of experimental epilepsies*. Epilepsia, 2003. **44 Suppl 12**: p. 44-50.
67. Kupferberg, H., *Animal models used in the screening of antiepileptic drugs*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 4**: p. 7-12.
68. Holmes, G.L. and Q. Zhao, *Choosing the correct antiepileptic drugs: from animal studies to the clinic*. Pediatr Neurol, 2008. **38**(3): p. 151-62.
69. Bertram, E., *The relevance of kindling for human epilepsy*. Epilepsia, 2007. **48 Suppl 2**: p. 65-74.
70. Stafstrom, C.E. and T.P. Sutula, *Models of epilepsy in the developing and adult brain: implications for neuroprotection*. Epilepsy Behav, 2005. **7 Suppl 3**: p. S18-24.
71. Saffen, D.W., et al., *Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(20): p. 7795-9.
72. Andre, V., et al., *Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(6): p. 2094-106.
73. Szyndler, J., et al., *Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures*. Epilepsy Behav, 2009. **16**(2): p. 216-24.

74. Haberer, L.J. and G.M. Pollack, *Central nervous system uptake kinetics of pentylenetetrazol in the developing rat*. Biopharm Drug Dispos, 1991. **12**(1): p. 59-71.
75. Esplin, D.W. and D.M. Woodbury, *The fate and excretion of C14-labeled pentylenetetrazol in the rat, with comments on analytical methods for pentylenetetrazol*. J Pharmacol Exp Ther, 1956. **118**(2): p. 129-38.
76. Ramzan, I.M. and G. Levy, *Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylenetetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. **234**(3): p. 624-8.
77. Tatum, H.J. and F.L. Kozelka, *Distribution, excretion, and rate and site of detoxification of metrazol*. J Pharmacol Exp Ther 1941. **72**(3): p. 284-290.
78. Marcucci, F., et al., *Brain levels of metrazol determined with a new gas chromatographic procedure*. Eur J Pharmacol, 1971. **16**(2): p. 219-21.
79. Racine, R.J., *Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972. **32**(3): p. 281-94.
80. Luttjohann, A., P.F. Fabene, and G. van Luijtelaaar, *A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats*. Physiol Behav, 2009. **98**(5): p. 579-86.
81. Vivaldi, E.A., et al., *On-line analysis of biosignals for the automation of total and specific sleep deprivation in the rat*. Biol Res, 2008. **41**(4): p. 439-52.
82. Le, C.T., *Introductory Biostatistics*. 2003, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
83. Cavada, G. *Bioestadística*. Available from: <https://www.u-cursos.cl/medicina/2007/2/FOBIOEST1/1/.../136795</cite>.
84. Dunn, O.J. and V.A. Clark, *Basic Statistics A Primer for the Biomedical Sciences*. Fourth ed. 2009, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
85. Arnau, J., A. Blanco, and J.L. Losada, *Estimación de la precisión de un diseño multivariable de medidas repetidas*. Anales de psicología, 1991. **7**(1): p. 85-104.
86. Arnau, J. and R. Bono, *Estudios longitudinales, modelos de diseño y análisis*. Escritos de Psicología, 2008. **2**(1): p. 32-41.
87. Camfield, C.C., P., *Benzodiazepines used primarily for chronic treatment (clobazam, clonazepam, clorazepate and nitrazepam)*, in *The treatment of epilepsy*, S.P. Shorvon, E.; Engel, J., Editor. 2009, Wiley-Blackwell.
88. Ato, M. and J.J. López, *Análisis de covarianza en diseño de medidas repetida: el riesgo de una interpretación*. Anuario de Psicología, 1992. **55**: p. 91-108.
89. *Análisis de varianza factorial. El procedimiento Modelo lineal general: Univariante*. Available from: http://www.ucm.es/info/socivmyt/paginas/D_departamento/materiales/analisis_d atosyMultivariable/15anova2_SPSS.pdf.
90. Racine, R., V. Okujava, and S. Chipashvili, *Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972. **32**(3): p. 295-9.
91. Racine, R.J., *Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972. **32**(3): p. 269-79.
92. Loscher, W., *Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans*. Eur J Pharmacol, 2009. **610**(1-3): p. 1-11.

93. Fisher, R.S., *Animal models of the epilepsies*. Brain Res Brain Res Rev, 1989. **14**(3): p. 245-78.
94. Fariello, R.G., *Critical review of the animal models of generalized epilepsies*. Ital J Neurol Sci, 1995. **16**(1-2): p. 69-72.
95. Loscher, W. and D. Schmidt, *Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations*. Epilepsy Res, 1988. **2**(3): p. 145-81.
96. Yamazaki, S., et al., *Intracerebroventricular injection of the antibiotic cefoselis produces convulsion in mice via inhibition of GABA receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **74**(1): p. 53-9.
97. Sarkisian, M.R., *Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders*. Epilepsy Behav, 2001. **2**(3): p. 201-216.
98. Snead, O.C., 3rd, *Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents*. J Neural Transm Suppl, 1992. **35**: p. 7-19.
99. Fanselow, E.E., A.P. Reid, and M.A. Nicolelis, *Reduction of pentylenetetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation*. J Neurosci, 2000. **20**(21): p. 8160-8.
100. Marescaux, C., et al., *A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures*. Epilepsia, 1984. **25**(3): p. 326-31.
101. Rocha, L., R.F. Ackermann, and J. Engel, Jr., *Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study*. Epilepsy Res, 1996. **24**(2): p. 65-72.
102. Beig, M.I., et al., *Simultaneous recording of electroencephalogram and blood pressure in conscious telemetered rats during ictal state*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **56**(1): p. 51-7.
103. Min, B.K., et al., *Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic EEG activity*. BMC Neurosci, 2011. **12**: p. 23.
104. Ben-Ari, Y., et al., *Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy*. Neuroscience, 1981. **6**(7): p. 1361-91.
105. Ito, M., T.H. Chiu, and H.C. Rosenberg, *Effects of pentylenetetrazol on GABA-A/benzodiazepine/picrotoxinin receptor complexes in rat brain regions*. Neurochem Res, 1986. **11**(5): p. 637-46.
106. Golarai, G., J.E. Cavazos, and T.P. Sutula, *Activation of the dentate gyrus by pentylenetetrazol evoked seizures induces mossy fiber synaptic reorganization*. Brain Res, 1992. **593**(2): p. 257-64.
107. Kobayashi, N., Y. Hoshi, and M. Tamura, *A perfused rat brain model maintaining the connection between the central and peripheral nervous systems*. J Neurosci Methods, 2004. **132**(2): p. 191-8.
108. Jutkiewicz, E.M., et al., *The convulsive and electroencephalographic changes produced by nonpeptidic delta-opioid agonists in rats: comparison with pentylenetetrazol*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(3): p. 1337-48.
109. Cremer, C.M., et al., *Pentylenetetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain*. Neuroscience, 2009. **163**(1): p. 490-9.

110. Schmoll, H., et al., *Kindling status in sprague-dawley rats induced by pentylenetetrazole: involvement of a critical development period*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 1027-34.
111. Hofstra, W.A., et al., *Timing of temporal and frontal seizures in relation to the circadian phase: A prospective pilot study*. Epilepsy Res, 2011.
112. Quigg, M., *Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy*. Epilepsy Res, 2000. **42**(1): p. 43-55.
113. Pavlova, M.K., S.A. Shea, and E.B. Bromfield, *Day/night patterns of focal seizures*. Epilepsy Behav, 2004. **5**(1): p. 44-9.
114. Hofstra, W.A., et al., *Temporal distribution of clinical seizures over the 24-h day: a retrospective observational study in a tertiary epilepsy clinic*. Epilepsia, 2009. **50**(9): p. 2019-26.
115. Quigg, M., et al., *Effects of circadian regulation and rest-activity state on spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy*. Epilepsia, 2000. **41**(5): p. 502-9.
116. Karafin, M., et al., *Bimodal ultradian seizure periodicity in human mesial temporal lobe epilepsy*. Seizure, 2010. **19**(6): p. 347-51.
117. Durazzo, T.S., et al., *Temporal distributions of seizure occurrence from various epileptogenic regions*. Neurology, 2008. **70**(15): p. 1265-71.
118. Eidman, D.S., M.A. Benedito, and J.R. Leite, *Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats*. Physiol Behav, 1990. **47**(5): p. 853-6.
119. Kirkby, R.D., et al., *Factors determining proconvulsant and anticonvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents*. Epilepsy Res, 1996. **24**(2): p. 91-100.
120. Gupta, R.C. and W.D. Dettbarn, *Prevention of kainic acid seizures-induced changes in levels of nitric oxide and high-energy phosphates by 7-nitroindazole in rat brain regions*. Brain Res, 2003. **981**(1-2): p. 184-92.
121. de Vasconcelos, A.P., et al., *Role of nitric oxide in pentylenetetrazol-induced seizures: age-dependent effects in the immature rat*. Epilepsia, 2000. **41**(4): p. 363-71.
122. Dilliogluligil, M.O., et al., *Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues*. Brain Res Bull, 2010. **83**(6): p. 356-9.
123. Obay, B.D., et al., *Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model*. Peptides, 2008. **29**(3): p. 448-55.
124. Akbas, S.H., A. Yegin, and T. Ozben, *Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues*. Clin Biochem, 2005. **38**(11): p. 1009-14.
125. Kaneko, K., et al., *Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR*. Magn Reson Med, 2002. **48**(6): p. 1051-6.
126. Itoh, K., et al., *Magnetic resonance and biochemical studies during pentylenetetrazole-kindling development: the relationship between nitric oxide, neuronal nitric oxide synthase and seizures*. Neuroscience, 2004. **129**(3): p. 757-66.

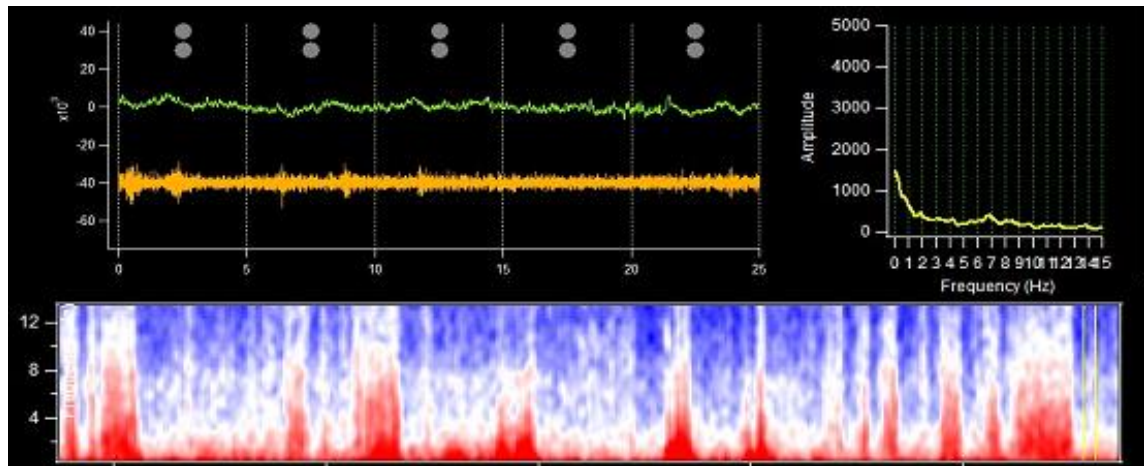
127. Han, D., et al., *Involvement of nitric oxide in pentylenetetrazole-induced kindling in rats*. J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 792-8.
128. Chuang, Y.C., et al., *Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat*. Neuropharmacology, 2007. **52**(5): p. 1263-73.
129. de Vasconcelos, A.P., et al., *Role of nitric oxide in cerebral blood flow changes during kainate seizures in mice: genetic and pharmacological approaches*. Neurobiol Dis, 2005. **18**(2): p. 270-81.
130. Keynes, R.G., S. Duport, and J. Garthwaite, *Hippocampal neurons in organotypic slice culture are highly resistant to damage by endogenous and exogenous nitric oxide*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(5): p. 1163-73.
131. Chayasirisobhon, S., *The mechanisms of medically refractory temporal lobe epilepsy*. Acta Neurol Taiwan, 2009. **18**(3): p. 155-60.
132. Armijo, J.A., *Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos*, in *Farmacología Humana*, J. Florez, Editor. 1997, Masson S. A.
133. Neufeld, M., *Acetazolamide*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
134. Novak, G. and M.J. Brodie, *Carisbamate*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
135. Wroe, S.J., *Zonisamide*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
136. Leppik, I.E. and J.R. White, *Felbamate*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
137. Cross, J.H. and C.J. Riney, *Topiramate*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
138. Camfield, C. and P. Camfield, *Benzodiazepines used Primarily for Chronic Treatment (Clobazam, Clonazepam, Clorazepate and Nitrazepam)*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
139. Trinka, E., *Benzodiazepines used Primarily for Emergency Treatment (Diazepam, Lorazepam and Midazolam)*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
140. von Rosienstel, P. and E. Peruca, *Brivaracetam*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
141. French, J. and F. Tonner, *Levetiracetam*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
142. Shorvon, S., *Piracetam*, in *The treatment of epilepsy*, S.P. Shorvon, E.; Engel, J., Editor. 2009, Wiley-Blackwell.
143. Glauser, T.A. and E. Peruca, *Ethosuximide*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
144. Sillampää, M., et al., *Carbamazepine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
145. Faught, E. and N. Limdi, *Oxcarbazepine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
146. Rheims, S. and P. Ryvlin, *Pregabalin*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.

147. Mansbach, H. and M. Baulac, *Retigabine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
148. Krämer, G. and G. Wohlrab, *Vigabatrine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
149. Kälviäinen, R., *Tiagabine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
150. Somerville, E. and A. Michell, *Gabapentine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
151. Eadie, M.J., *Phenytoin*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
152. Biton, V., *Rufinamide*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
153. Sachdeo, R., *Lacosamide*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
154. Matsuo, F. and A. Riaz, *Lamotrigine*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
155. Eriksson, K. and T. Keränen, *Stiripentol*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
156. Bourgeois, B.F.D., *Valproate*, in *The treatment of epilepsy*, S. Shorvon, E. Peruca, and J. Engel, Editors. 2009, Wiley-Blackwell.
157. De Deyn, P.P., et al., *Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants*. *Epilepsy Res*, 1992. **12**(2): p. 87-110.
158. Represa, A., G. Le Gall La Salle, and Y. Ben-Ari, *Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats*. *Neurosci Lett*, 1989. **99**(3): p. 345-50.

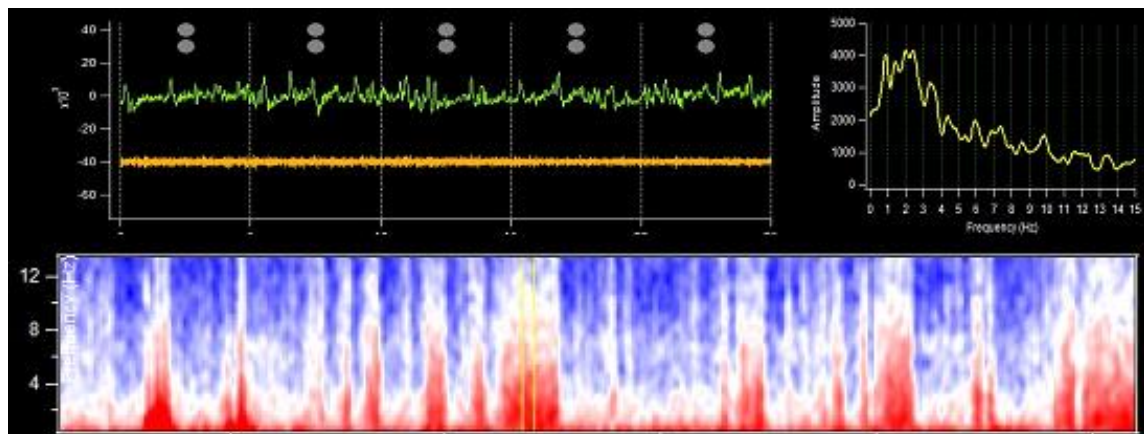
9.- ANEXOS

9.1.- Estados del Ciclo Sueño Vigilia

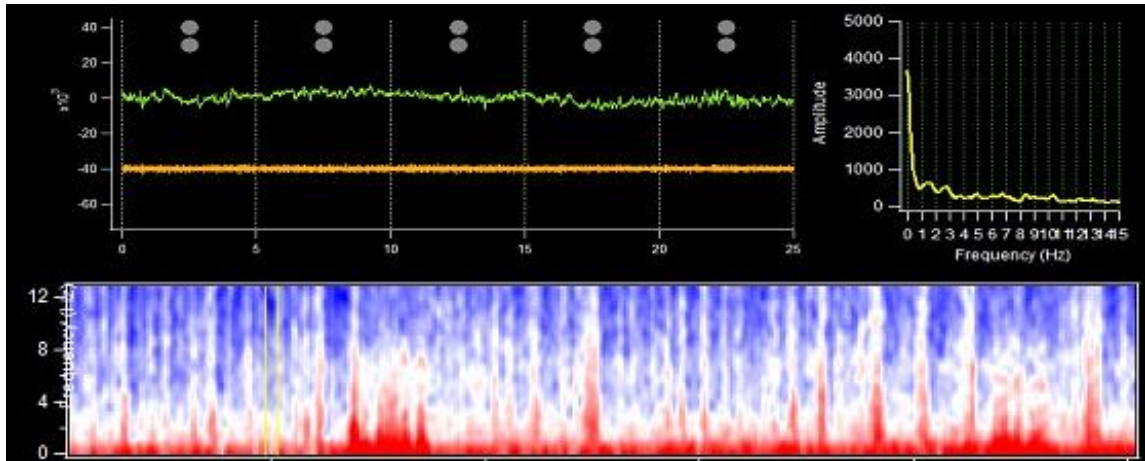
Vigilia:



Sueño NREM:

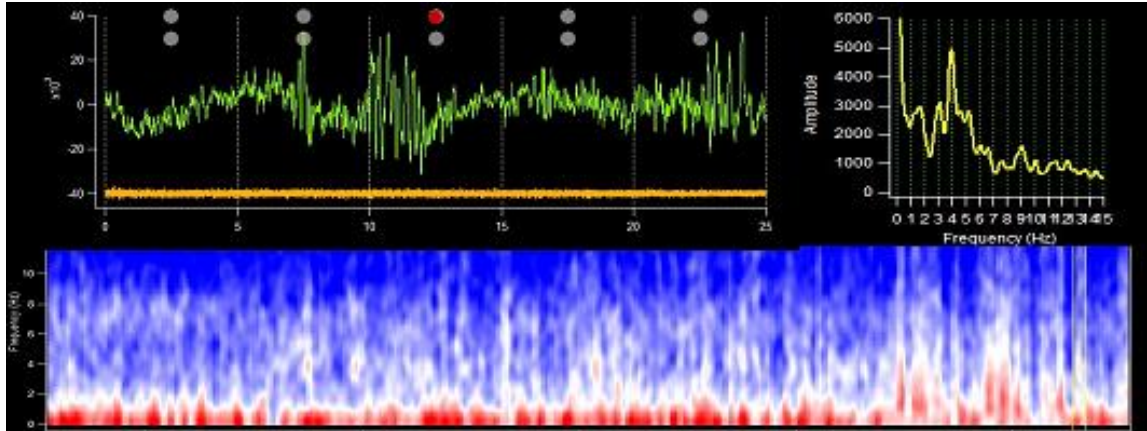


Sueño REM:



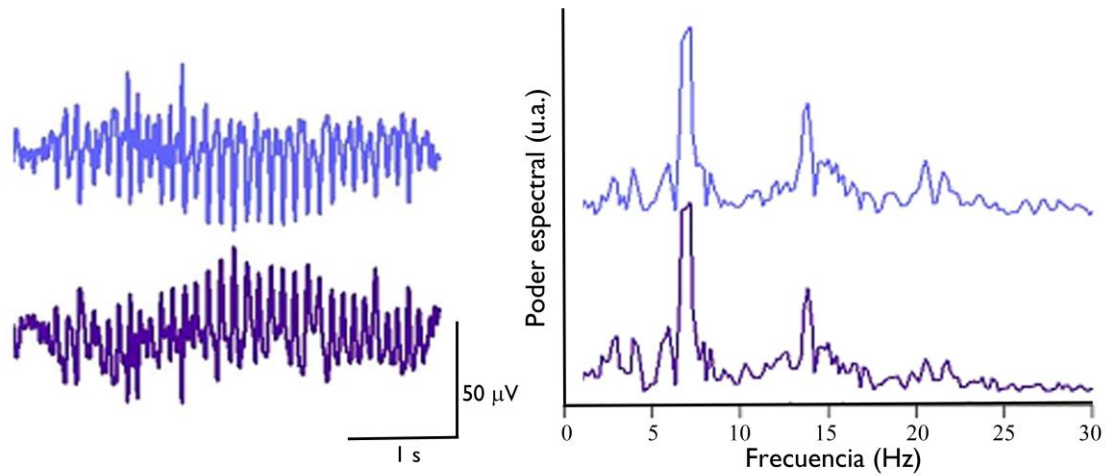
Las 3 siguientes figuras anteriores muestran los estados del ciclo sueño vigilia. A la izquierda de cada figura se observa una serie temporal de 5 épocas de 5 segundos cada una, donde la señal en verde corresponde al canal 0 del EEG y la señal en naranja, al EMG; a la derecha, el perfil espectral correspondiente a las 5 épocas de la serie temporal; abajo, el espectrograma de una hora de registro (60 min), donde las barras amarillas muestran el espectro de la serie temporal mostrada.

9.2.- Espectrograma de una descarga epiléptica



Arriba a la izquierda se observa una serie temporal de 5 épocas de 5 segundos cada una, donde la señal en verde corresponde al registro del EEG y la señal en naranja, al EMG, y el punto rojo señala la época en que se produce la descarga epiléptica; a la derecha, la densidad espectral correspondiente a las 5 épocas de la serie temporal; abajo, el espectrograma de una hora de registro (60 min), las líneas amarillas paralelas señalan la época en que se produce la descarga.

9.3.- Canales de registro de EEG.



A la derecha de la figura se muestra el registro electroencefalográfico de una descarga epiléptica en los dos canales de EEG y a la derecha los perfiles espectrales correspondientes. En celeste se muestra el canal EEG0 y en morado el canal EEG1 (ver tabla 4.6).

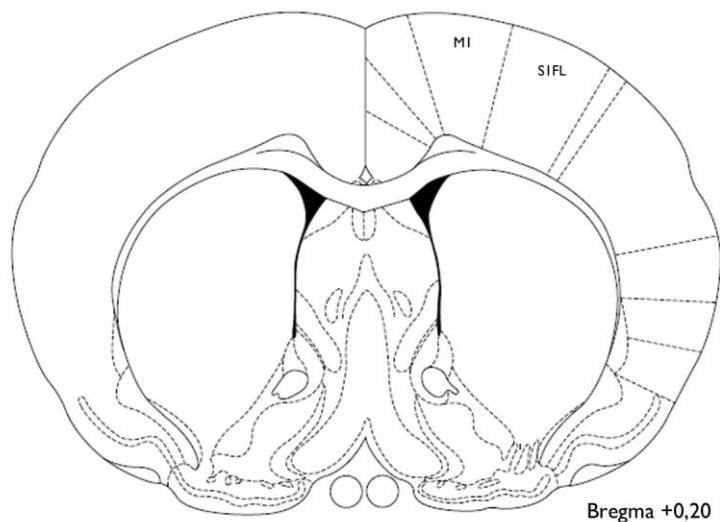
9.4.- Posiciones de las cánulas corticales

A continuación se muestran fotos representativas de las posiciones de las cánulas en el cerebro de la rata, posteriores a los experimentos de modulación de los niveles corticales de NO.

La primera figura muestra un corte coronal del cerebro de rata (tomada del atlas de Paxinos & Watson 1998). En ella se destacan las dos regiones en que se ubicaron las cánulas:

- M1: corteza motora primaria.
- S1FL: corteza somatosensorial primaria, región de las patas delanteras.

Las siguientes figuras muestran cortes coronales del cerebro de las ratas sometidas a los experimentos mencionados, obtenidas con microscopía electrónica con el objetivo 2.5X y zoom 3,6 de la cámara. En ellas, la posición de la cánula está marcada por la flecha negra. La primera de ellas muestra la cánula posicionada en la corteza M2 y la segunda, en S1FL.



Cánula en corteza M1:



Cánula en S1FL:

