

Señalización celular en el hipocampo epiléptico

I. Ferrer

CELL SIGNALING IN THE EPILEPTIC HIPPOCAMPUS

Summary. Cell signaling commanding death or survival in human epileptic hippocampus is difficult to trace because of the long interval between the beginning of symptoms and the sampling of damaged cerebral tissue for neuropathological examination. Intraperitoneal injection of the glutamate analogue kainic acid (KA) is a useful tool to analyze the effects of seizures and the excitotoxic damage in the rodent hippocampus. KA acts on NMDA and KA receptors, whereas it has little impact on AMPA receptors. Neurons of the hilus and CA3 neurons are primary targets of KA, although parvalbumin-containing GABAergic neurons are less vulnerable than glutamatergic neurons. Immediate responses to KA are hsp-70 mRNA induction and HSP-70/72 protein expression, as well as c-fos and c-jun mRNA, and c-Fos and c-Jun protein expression in the hippocampus. Yet increased c-Fos and c-Jun expression is not a predictor of cell death or cell survival. In contrast, the tissular plasminogen activator (tPA) and the membrane Fas/Fas-L signaling pathway probably have a role in facilitating cell death following KA injection. The involvement of other pathways remains controversial. Increased expression of the pro-apoptotic Bax together with decreased Bcl-2 suggests Bax-mediated apoptosis. Activation of the mitochondrial pathway includes leakage of cytochrome c to the cytosol and activation of the caspase cascade leading to apoptosis. However, other studies have emphasized the limited expression of caspase-3, the main executioner of apoptosis, and the relevance of necrosis as the main form of cell death following KA excitotoxicity. Phosphorylation-dependent activation of several kinases, including MAPK, p-38 and JNK/SAPK, and their substrates has been found in KA-treated animals. Decreased CREBp expression is associated with cell death whereas increased ATF-2P and Elk-1P are associated with cell survival. Trophic factors probably do not play a significant role during the early stages of hippocampal damage but they are important in the remodeling of the granule cells and the sprouting of mossy fibers to the molecular layer of the dentate gyrus. This abnormal regeneration, in turn, facilitates seizure recruitment and the chronic maintenance of convulsions. [REV NEUROL 2002; 34: 544-50]

Key words. Apoptosis. Bcl-2. Caspases. Fas. HSP-72. Kainic acid. Kinases. Necrosis. Seizures.

Clásicamente se conoce la esclerosis temporal mesial como una causa frecuente de epilepsia tónico-clónica generalizada. Las lesiones asociadas a ésta consisten en una pérdida neuronal y astrocitosis en la capa piramidal de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo y de subpoblaciones neuronales del hilio de la circunvolución dentada. Las neuronas granulares de la circunvolución dentada se conservan mejor. Las lesiones no se limitan al hipocampo propio, ya que existe pérdida neuronal en la corteza parahipocámpica y fenómenos de rebrote axonal de las fibras musgosas a la zona interna de la capa molecular de la circunvolución dentada [1].

No se conoce bien el fenómeno de inicio lesional en la esclerosis mesial porque el examen neuropatológico tiene lugar en fases frecuentemente muy avanzadas de la historia clínica, en la que se han sucedido múltiples episodios con daño neuronal acumulativo. Sin embargo, el estudio cuidadoso de cerebros epilépticos obtenidos *post mortem*, así como de las muestras de resección quirúrgica realizadas en personas con epilepsia resistente a tratamiento farmacológico, ha permitido una aproximación a los fenómenos residuales del hipocampo epiléptico. Ello incluye el examen de subpoblaciones neuronales susceptibles y resistentes, el estudio de expresión de receptores de neurotransmisores y el desarrollo de fenómenos plásticos, particularmente en la circun-

volución dentada, los cuales provocan circuitos excitadores que favorecen la progresión de la epilepsia.

El estudio de hipocampos epilépticos humanos no permite, sin embargo, conocer la secuencia de acontecimientos que llevan a la pérdida neuronal y a la regulación de los fenómenos plásticos. Por ese motivo se han diseñado diferentes modelos animales utilizando estimulaciones eléctricas o farmacológicas, entre las que se encuentra la administración sistémica del análogo del glutamato ácido kaínico.

HIPOCAMPO EPILEPTICO HUMANO

Un aspecto importante en el daño epiléptico es la afectación selectiva de subpoblaciones neuronales. En el hilio de la circunvolución dentada, las neuronas inmunorreactivas para somatostatina, neuropéptido Y y sustancia P son particularmente vulnerables [2,3]. Por el contrario, las neuronas que contienen las proteínas ligantes de calcio parvalbúmina o calbindina D28k, resultan ser resistentes. Las neuronas granulares de la circunvolución dentada y las interneuronas de CA1 y CA3 son inmunorreactivas para calbindina D28k. Además, las neuronas no piramidales del hipocampo inmunorreactivas para parvalbúmina aparecen conservadas. Estos datos sugieren que la expresión de proteínas ligantes de calcio protege las células frente a la entrada masiva de calcio [4]. Estos datos concuerdan con la conservación de neuronas de hipocampo inmunorreactivas para decarboxilasa del ácido glutámico en el hipocampo epiléptico humano [5]. Por otra parte, se ha descrito una conservación de las neuronas hilares que contienen acetilcolinesterasa y conservación de esta actividad enzimática en las fibras de la zona interna de la capa molecular de la circunvolución dentada. Sin embargo, existe una pérdida de acetilcolinesterasa en el hipocampo propio y en la zona externa de la capa molecular de la circunvolución dentada [6].

Recibido: 27.09.01. Acepta dotrasrevisiónexternasinmodificaciones: 05.11.01.

Unidad de Neuropatología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Príncipes de España. Universidad de Barcelona. Hospitalet de Ll., Barcelona, España.

Correspondencia: Dr. Isidro Ferrer. Unidad de Neuropatología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Príncipes de España. Feixa Llarga, s/n. E-08907 L'Hospitalet de Ll., Barcelona. E-mail: iferrer@sakma.es

Presentado en el I Congreso de la Liga Española contra la Epilepsia, celebrado en Bilbao del 14 al 17 de noviembre de 2001.

© 2001, REVISTA DE NEUROLOGÍA

El estudio de receptores para neurotransmisores ha mostrado una reducción de receptores GABA_A (GABA-adrenérgicos) mediante autorradiografía e inmunohistoquímica. También se ha observado una reducción de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y de receptores kaínico en CA3, CA1 e hilio, pero aumento de la expresión en la circunvolución parahipocámpal, lo que sugiere circuitos aberrantes excitadores en el hipocampo epiléptico humano. La reducción de receptores y modificaciones en el ligamiento de los receptores NMDA en el hipocampo propio se ha comprobado en otros estudios, en los que, paralelamente, se ha encontrado un aumento de ligamiento a receptores del ácido amino-metil-propiónico (AMPA) en la capa molecular de la circunvolución dentada [7-15].

La pérdida de neuronas hilares lleva consigo una pérdida de dianas para las fibras granulares que parece activar un rebrote de fibras musgosas a la zona interna de la capa molecular de la circunvolución dentada [16-19]. Esto se acompaña de un aumento de expresión de la forma activa de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM), que interviene en procesos de migración neural, crecimiento dendrítico y ramificación axonal. La aparición de fenómenos plásticos depende, en parte, de señalizaciones con factores tróficos y sus receptores específicos. Este aspecto tiene repercusiones terapéuticas en el caso de tratamiento con factores tróficos. La expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se modifica en la esclerosis mesial y el BDNF aumenta la actividad de sinapsis excitadoras en el hipocampo epiléptico. El posible efecto beneficioso de BDNF resulta dudoso [21-27].

EXCITOTOXICIDAD CON ÁCIDO KAÍNICO. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La administración sistémica (por ejemplo, inyección intraperitoneal) de ácido kaínico, un análogo del glutamato, en dosis convulsionantes, produce daño excitotóxico en las neuronas piramidales del hipocampo propio y en el hilio de la circunvolución dentada, pero no en las neuronas granulares de ésta. El daño depende de la dosis, de la especie y de la cepa de los animales, pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de fibras gliales. Por ese motivo, el paradigma de administración sistémica de ácido kaínico se ha considerado un buen modelo para el estudio de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, cuyo sustrato neuroanatómico es la esclerosis temporal mesial [28-34].

El tratamiento previo con MK-801, un antagonista no competitivo de receptores NMDA, reduce las convulsiones y el daño neuronal, lo que sugiere la implicación de receptores NMDA en el daño inducido por ácido kaínico [35-37]. Por el contrario, la administración de NBQX, un antagonista de receptores AMPA, parece tener poco o nulo efecto sobre el daño excitotóxico. Puesto que NBQX tiene alta afinidad por AMPA pero muy poca por receptores cainato, puede inferirse que la lesión por ácido kaínico se produce por actuación del ácido kaínico sobre receptores específicos con implicación extendida a receptores NMDA [38-40].

La mayor concentración de receptores cainato se encuentra en las neuronas de la región CA3 del hipocampo. También se ha descrito la activación sináptica de receptores cainato en interneuronas (neuronas inhibitorias) del hipocampo [41-44]. La presencia de receptores de glutamato GluR6 en las sinapsis de las fibras musgosas parece mediar la actuación de ácido kaínico, ya que los ratones nulos para GluR6 son más resistentes al daño

excitotóxico [45]. Asimismo se ha señalado la activación de interneuronas en distintas regiones del hipocampo, que parece estar mediada, en parte, por receptores GluR5 [46]. La generación de convulsiones tónico-clónicas generalizadas a consecuencia de la estimulación por ácido kaínico depende de receptores cainato, pero en particular de la activación repetitiva de las fibras aferentes y de la inhibición tónica de las interneuronas. El destino final del sistema sometido a una activación doble –de las neuronas excitadoras glutamatérgicas (neuronas piramidales o de proyección) y de neuronas inhibitorias gabérgicas (neuronas no piramidales o de circuito-local)– puede dar lugar a la entrada masiva de calcio en las células diana y desencadenar la muerte celular por necrosis [47-51].

Tanto las neuronas excitadoras como las inhibitorias son susceptibles al ataque excitotóxico, si bien la presencia de parvalbúmina, una proteína con capacidad de actuar como tampón de las entradas masivas de calcio al interior de las neuronas, confiere un mayor grado de resistencia a las interneuronas frente al ataque excitotóxico [52,53].

Uno de los primeros cambios después de la administración de ácido kaínico es la inducción de ARN mensajero (ARNm) para hsp-70 y la expresión de la proteína de estrés de calor de 70 kDa (HSP-70/72) en las poblaciones neuronales sensibles del hipocampo propio, pero no de la circunvolución dentada. La expresión de esta chaperonina parece tener la función de prevenir el plegamiento anormal de proteínas nacientes en las poblaciones vulnerables al ácido kaínico. En los días siguientes, y durante dos semanas, HSP-70/72 se transporta por el árbol dendrítico y a lo largo de los axones hacia las zonas más distales. HSP 70/72 tiene un papel protector, aunque no consigue rescatar por sí misma a las células de la muerte excitotóxica. La sobreexpresión de HSP-70 *in vivo* protege del daño excitotóxico. Niveles excesivamente altos de HSP-72 pueden ser nocivos para las células [52-58].

También, de modo temprano, existe inducción de ARNm de c-Fos y c-Jun en las regiones vulnerables del hipocampo propio y en la circunvolución dentada después de tres a cinco horas de la inyección de ácido kaínico [59,60]. Por lo que se refiere a la transcripción a proteína, se encuentra un aumento de expresión del factor de transcripción c-Fos a tres horas en el hipocampo propio y en la circunvolución dentada. La inmunorreactividad para c-Fos decrece a las seis horas en la circunvolución dentada, pero permanece alta en el hipocampo propio. Ello ha sugerido que la muerte celular puede asociarse a niveles altos y mantenidos de expresión de c-Fos, pero también se ha demostrado que el incremento prolongado de c-Fos no tiene un carácter predictivo y no se requiere para que se produzca daño neuronal excitotóxico [36,61-64]. También se encuentra un aumento de la expresión de c-Jun en el hipocampo propio y en la circunvolución dentada durante 24 horas después del ataque excitotóxico. El significado del aumento de c-Jun resulta contradictorio, ya que se ha señalado como marcador de muerte celular retardada secundaria a convulsiones epilépticas, o como un posible marcador de supervivencia neuronal frente al ataque excitotóxico [60,63,65,66].

Respecto a la señalización a través de la membrana celular, es interesante conocer que la serina proteasa extracelular, activador tisular del plasminógeno (tPA), parece ser necesaria para producir muerte celular, ya que ratones nulos para tPA o para plasminógeno son relativamente resistentes al daño excitotóxico. Este efecto parece mediado por la interacción de tPA con laminina, una proteína de la matriz extracelular [67-70].

También relacionado con la señalización a través de la membrana celular se encuentra un aumento de la expresión de Fas-L, ligando específico del receptor Fas, en el hipocampo y en las células granulares de la circunvolución dentada tres horas después de la inyección de ácido kaínico [71]. Mientras que en esta última región la expresión de Fas-L decrece seis horas después de la inyección de ácido kaínico, la inmunorreactividad para Fas-L se mantiene en el hipocampo propio. Este aspecto resulta relevante, ya que la unión de Fas-L y Fas activa el dominio de muerte de Fas, al que se une FADD, activando a su vez a caspasa-8. La activación de caspasa-8 actúa sobre las caspasas efectoras, quienes ejecutan la muerte por apoptosis. La utilización de ratones nulos para Fas aporta datos sustanciales para conocer el papel del sistema Fas/Fas-L en la señalización de muerte celular excitotóxica. Estudios preliminares con ratones Fas^{-/-} sometidos a inyección intraperitoneal de ácido kaínico han mostrado convulsiones, pero menor daño excitotóxico en las regiones diana, lo que indica un papel mediador de la vía de señalización Fas/Fas-L en este modelo de daño excitotóxico. Sin embargo, la presencia de Fas y de Fas-L no es suficiente para desencadenar la cascada de muerte celular por apoptosis porque las neuronas del hipocampo propio mueren, mientras que las neuronas de la circunvolución dentada sobreviven [Ferrer I, Domínguez I, Puig B, datos no publicados].

El papel que desempeñan los miembros de la familia Bcl-2 resulta todavía poco claro. Un estudio preliminar mostró reducción de proteína Bcl-2 y aumento de ARNm para Bax en el hipocampo del ratón después de la inyección sistémica de ácido kaínico [72]. Estudios más precisos han encontrado, mediante *Northern blot*, una inducción del ARNm de Bax –pero no de Bcl-2 y Bcl-x– desde seis a 24 horas en el hipocampo de ratas inyectadas con ácido kaínico. La expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-x y Bax en el hipocampo propio, analizada mediante *Western blot* e inmunohistoquímica, es parecida en las células destinadas a morir y en las células que sobreviven [73]. Algunos estudios han mostrado aumento de la expresión de Bax en el hipocampo después del estímulo excitotóxico, y han especulado que Bax, agente proapoptótico, podría desempeñar un papel en la muerte excitotóxica. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica han mostrado inducción de ARNm de Bax y de proteína Bax en el hipocampo propio, pero también en la circunvolución dentada, que es resistente al daño excitotóxico [73].

Es posible que los efectos de los miembros de la familia Bcl-2 no dependan de cambios globales de las proteínas, pero sí su localización subcelular. La señalización de muerte apoptótica por la vía mitocondrial se desencadena por una unión de Bax a la membrana mitocondrial y por una liberación de citocromo c al citosol. Esta liberación comporta unión a Apaf-1 en presencia de ATP y activación de la caspasa-9, quien, a su vez, activa distintas caspasas efectoras o ejecutoras. El modo en que se produce la salida de citocromo c de la mitocondria al citosol no está claro, pero parece establecerse una interacción entre Bcl-2, Bcl-x y Bax, y los canales iónicos dependientes de voltaje que controlan la salida de citocromo c. Estudios de fraccionamiento celular han mostrado ausencia de traslocación de Bax del citosol a las membranas mitocondriales, así como ausencia de expresión de citocromo c en la fracción citosólica en ratas tratadas con ácido kaínico [Puig B, Ferrer I, datos no publicados]. Tomados en su conjunto, estos datos apoyan la respuesta de los miembros de la familia Bcl-2 frente a la administración de ácido kaínico, particularmente manifestada por un incre-

mento de Bax, junto a una ausencia de activación de la vía mitocondrial en este modelo de excitotoxicidad.

Estudios recientes han mostrado activación de las vías de proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK), del tipo cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2) en el modelo de convulsiones y excitotoxicidad por administración sistémica de ácido kaínico. La activación de esta cascada se produce vía Ras, como se demuestra mediante el análisis de activación de Ras p21, y comporta la fosforilación de ERK1 y ERK2 (MAPK) [74]. Estudios bioquímicos preliminares señalaron la activación de *JNK-1*, la fosforilación de c-Jun y la reducción de ERK y de cinasa de 38 kDa (p-38) después de la inyección de ácido kaínico [75]. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos más detallados han puesto de manifiesto diferencias regionales sustanciales y aumento de las formas fosforiladas. Así, se ha demostrado un aumento de la expresión de las formas fosforiladas (activas) de cinasas activadas por estrés (SAPK/*JNK*: JNKP) y de la forma fosforilada de p38 (p38P). MAPK y JNKP se expresan a las tres y a las seis horas en el hipocampo propio y en la circunvolución dentada. Estos cambios se siguen de la fosforilación de sustratos específicos de estas cinasas. c-MycP y c-JunP se expresan del mismo modo en el hipocampo propio y en la circunvolución dentada, mientras que la expresión de CREBP se reduce en las poblaciones vulnerables del hipocampo propio, pero se conserva en la circunvolución dentada. ATF-2P y Elk-1P se sobreexpresan únicamente en la circunvolución dentada. Estos datos indican que el mantenimiento de CREBP y la sobreexpresión de ATF-2P y Elk-1P se asocian con supervivencia celular, mientras que el destino de las neuronas que tienen expresión aumentada de c-MycP y c-JunP depende de otros factores que condicionan su progresión hacia la muerte celular o hacia la supervivencia [74].

Estos resultados no contradicen otras observaciones que indican aumento de expresión de *JNK* y de formas fosforiladas de c-Jun en poblaciones destinadas a morir. Tampoco contradicen el posible papel de c-Jun en la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales. Sin embargo, sí matizan que la sobreexpresión de estos factores no lleva inexorablemente a la muerte neuronal en el modelo de excitotoxicidad por ácido kaínico. Finalmente, es preciso señalar que ratones nulos para el gen *JNK-1* son vulnerables al daño excitotóxico, mientras que los ratones nulos para *JNK-3* son resistentes, lo que indica que *JNK-1* media en el daño excitotóxico por ácido kaínico [76].

Estudios con microscopía electrónica en las fases tempranas de convulsiones inducidas experimentalmente muestran dilatación del citoplasma de los astrocitos perivasculares y perineuronales. Ello se relaciona estrechamente con la entrada y la acumulación de calcio en las mitocondrias de las dendritas basales y en el soma de las neuronas de CA1 y CA3 pocas horas después de la administración de ácido kaínico, con recuperación a los 40 minutos del término de las convulsiones tras la administración de diazepam. También existe entrada de calcio en astrocitos y la recuperación es más lenta. Estas modificaciones son semejantes en distintos modelos de convulsiones en la rata [77,78].

El modo como mueren las neuronas después del daño excitotóxico ha constituido motivo de controversia. Clásicamente se ha considerado la muerte excitotóxica como necrosis secundaria a la entrada masiva de calcio al interior de las células [79-81]. Sin embargo, estudios posteriores han mostrado la presencia de un componente apoptótico. Esta última interpretación se basa en tres aspectos. Por una parte, en la demostración bioquímica de fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases, los cuales sugieren

activación temprana de endonucleasas y rotura del ADN en los espacios internucleosomales, más vulnerables al no estar cubiertos de histonas. Por otra parte, las células destinadas a morir se tiñen con el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado, originariamente descrito como específico para la detección de apoptosis *in situ* [82,83]. El tercer aspecto a favor de apoptosis se basa en la acumulación nuclear de p53 en neuronas vulnerables al ácido kaínico [84].

Sin embargo, los estudios con microscopio electrónico muestran un patrón que difiere de la apoptosis clásica. Las neuronas lesionadas presentan cambios en la membrana nuclear y en las membranas del citoplasma, incluyendo las del retículo endoplásmico rugoso y las del aparato de Golgi; asimismo, muestran alteraciones mitocondriales y disolución de los ribosomas. Finalmente, las células dañadas sólo presentan modificaciones en el núcleo, consistentes en la agregación granular de la cromatina en fases avanzadas. Las imágenes de apoptosis, caracterizadas por condensación extrema de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos con relativa preservación del citoplasma, se observan excepcionalmente en el modelo de excitotoxicidad por administración sistémica de ácido kaínico [85]. Además, diferentes estudios han mostrado que el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado no es específico de apoptosis, ya que la incorporación de nucleótidos marcados a los terminales 3'-OH del ADN fragmentado mediante el enzima deoxi-nucleotidil-transferasa terminal puede suceder en otras formas de muerte neuronal [86-88]. La expresión aumentada de p53 en el núcleo no necesariamente indica apoptosis.

Recientemente se ha conocido que las caspasas, cisteína proteasas que rompen uniones aspártico, desempeñan un importante papel en la muerte por apoptosis. Las caspasas comprenden miembros que tienen funciones inductoras, como la caspasa-8 y la caspasa-9, y miembros con funciones ejecutoras, como la caspasa-3 y la caspasa-7. La caspasa-3 puede activarse indistintamente a través de la vía Fas/Fas-L y caspasa-8, o a través de la vía mitocondrial por liberación de citocromo c y unión a Apaf-1, complejo que activa caspasa-9. Las caspasas se expresan de forma inactiva como procaspasas en el citoplasma de las células. La activación de caspasa-3 y también la de caspasa-7 comporta la actuación sobre distintos sustratos vitales. La destrucción de estos sustratos por múltiples cortes deriva en la muerte por apoptosis. Uno de los sustratos es poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), enzima de la membrana nuclear que se rompe específicamente por acción de la caspasa-3 y de la caspasa-7 en dos fragmentos de 89 y 27 kDa. La presencia de fragmentos de PARP de 89 kDa es, por tanto, un marcador de la función de las caspasas efectoras o ejecutoras.

Estudios en el modelo de excitotoxicidad por ácido kaínico intraperitoneal han mostrado inducción de ARNm de caspasa-3 y aumento de la expresión de procaspasa-3 en algunas neuronas de las regiones vulnerables del hipocampo [89-91]. Más aún, unas pocas neuronas expresan caspasa-3 activa (caspasa-3 hendida de 17 kDa) y activación de caspasa-3 [92]. Esto indica la participación de la vía de caspasas en ciertas neuronas del hipocampo propio y apuntan hacia la muerte celular con componente apoptótico en subpoblaciones del hipocampo. Sin embargo, los estudios con *Western blot* señalan la presencia de bandas de PARP de 89 kDa y también de bandas de menor tamaño (67 kDa), lo que indica que la fragmentación de PARP no se produce exclusivamente por activación de caspasas, sino también por actuación de otras proteasas, como predice la muerte indiscriminada por necrosis [91].

Debe tenerse en cuenta que las neuronas son células sociales que precisan de componentes suministrados por otras células para su mantenimiento y desarrollo. Se ha observado una inducción anormal de ARNm para miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico – α FGF y β FGF – y de sus receptores – Flg – después de la inducción de convulsiones por ácido kaínico en la rata [93], así como para los ARNm del factor trófico derivado de glia (GDNF) y de su receptor [94]. Otros factores son neurotrofinas que actúan sobre receptores específicos tirosincinasas. El factor derivado del cerebro (BDNF) se encuentra ampliamente distribuido por el sistema nervioso y, además de su importancia durante el desarrollo, mantiene la actividad sináptica y el trofismo de distintas poblaciones neuronales en la vida adulta. El BDNF actúa específicamente sobre los receptores TrkB, consistentes en formas enteras con el dominio intracelular – que contiene el componente catalítico – y formas truncadas, que carecen del dominio intracelular y, por tanto, de función de cinasa. El papel de estos últimos receptores parece ser el de neutralizar o bloquear la acción de BDNF en lugares donde no se precisa o es poco apropiada su función.

Estudios de ARNm han mostrado una inducción de BDNF en el hipocampo y de TrkB en la circunvolución dentada entre los 30 minutos y las cuatro horas después de la administración de ácido kaínico [95]. Sin embargo, en animales sometidos a inyección intraperitoneal de ácido kaínico en dosis convulsionantes, la expresión de BDNF se pierde en las células que van a morir en el hipocampo propio, pero permanece en poblaciones resistentes. El BDNF sólo se sobreexpresa transitoriamente en las células granulares de la circunvolución dentada seis horas más tarde de la administración de ácido kaínico [96]. La expresión del ARNm para TrkB y de proteína TrkB entera sigue un patrón semejante con reducción en poblaciones que van a perecer y aumento en poblaciones resistentes, particularmente en las prolongaciones de las células granulares de la circunvolución dentada [96,97]. Finalmente, TrkB truncado se expresa en astrocitos reactivos del *stratum oriens* y del *stratum radiatum* del hipocampo, territorios en donde la pérdida de neuronas obstaculiza cualquier intento de establecer posibles conexiones mediante fibras distantes convergentes en un foco sin dianas funcionales [96].

Este escenario apunta a un papel protector del BDNF, que es compatible con el ya conocido para el BDNF en otros modelos, y sugiere la posible utilización del BDNF como agente terapéutico en el daño excitotóxico por ácido kaínico. Se conoce el efecto protector del BDNF en modelos murinos de isquemia global y de isquemia focal. Asimismo, el BDNF protege a las neuronas cerebelosas, hipocámpales, cerebro-corticales y septales del daño excitotóxico [98,99]. Sin embargo, el resultado de la administración del BDNF es drásticamente opuesto *in vivo*. El BDNF no tiene un efecto protector frente al ácido kaínico y, por el contrario, agrava el daño excitotóxico [100].

Como resultado del daño excitotóxico, las fibras musgosas procedentes de las células granulares de la circunvolución dentada se encuentran desconectadas de sus dianas. Esta diferenciación da lugar a la producción de ramitas axonales musgosas que progresan en la región supragranular y en toda la capa molecular de la circunvolución dentada [101,102]. La formación de ramitas o *sprouting* se asocia con un incremento de la expresión de la proteína GAP-43 en la capa supragranular durante la primera semana, y en toda la capa molecular a partir de un mes [103]. Asimismo, se ha detectado incremento de la expresión de la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) en las neuronas y en la capa molecular de la circunvolución dentada y en las

fibras musgosas del hipocampo en los días siguientes a la lesión excitotóxica por ácido kaínico [104-106]. Parece probable la intervención de señales tróficas específicas en el desarrollo de estas conexiones aberrantes, aunque todavía resulta discutible el papel desempeñado por distintos factores tróficos. La presencia del

BDNF y de TrkB en las neuronas de la circunvolución dentada apoya una posible influencia sobre el trofismo de estas células en la construcción de ramitas plásticas dirigidas a reinervar zonas destruidas por el ácido kaínico [96]. Sin embargo, el rebrote de fibras musgosas no se altera en ratones nulos para el BDNF [107].

BIBLIOGRAFÍA

- Honavar M, Meldrum BS. Epilepsy. In Graham I, Lantos PL. Greenfield's neuropathology. Vol. 1. London: Arnold; 1997. p. 931-71.
- De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins SJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1989; 495: 387-95.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, De Lanerolle N, Welsh S, et al. A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1991; 29: 325-32.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic hippocampus. *J Comp Neurol* 1991; 308: 381-96.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 1989; 9: 2562-74.
- Green RC, Blume HW, Kupferschmid SB, Mesulam MM. Alterations of hippocampal acetylcholinesterase in human temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1989; 26: 347-51.
- Johnson EW, De Lanerolle NC, Kim JH, Sanderasan S, Spencer DD, Mattson RH, et al. Central and peripheral benzodiazepine receptors: opposite changes in human epileptogenic tissue. *Neurology* 1992; 42: 811-5.
- Wolf HK, Spänle M, Müller MB. Hippocampal loss of GABA_A receptor (1 subunit) in patients with chronic pharmacoresistant epilepsies. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 313-9.
- De Lanerolle NC, Sundaresan S, Brines ML. Distribution of NMDA, quisqualic acid and kainic acid receptors in the hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1990; 31: 625.
- De Lanerolle NC, Brines M, Williamson A, Kim JH, Spencer DD. Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1992; 7 (Suppl): 235-50.
- De Lanerolle NC, Brines ML, Kim JH, Williamson A, Philips MF, Spencer DD. Neurochemical remodeling of the hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy* 1992; 9: 205-19.
- De Lanerolle NC, Eid T, Von Campe G, Kovacs I, Spencer DD, Brines M. Glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 distribution shows reorganization of the epileptogenic hippocampus. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 1687-703.
- Geddes JW, Cahan LD, Cooper SM, Kim RC, Choi BH, Cotman CW. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 1990; 108: 214-20.
- McDonald JW, Garofalo EA, Hood T. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1991; 29: 529-41.
- Hosford DA, Crain BJ, Cao Z, Bonhaus DW, Friedman AH, Okazaki MM, et al. Increased AMPA-sensitive quisqualic receptor binding in epileptic human hippocampus. *J Neurosci* 1991; 11: 428-34.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK. Recurrent excitatory circuits by 'sprouted' mossy fibers into the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Epilepsia* 1988; 29: 674.
- Cascino G, Sutula T, Cavazos J, Parada I, Ramírez L. Hippocampal mossy fiber synaptic reorganization in intractable partial epilepsy: a clinicopathological study. *Epilepsia* 1988; 29: 684.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramírez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989; 26: 321-30.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 1991; 42: 351-63.
- Mikkonen M, Soininen H, Kälviäinen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M, et al. Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann Neurol* 1998; 44: 923-34.
- Mattern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuronal losses and supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 1997; 30: 53-76.
- Hashimoto K, Watanabe K, Nishimura T, Iyo M, Shirayama Y, Minabe Y. Behavioral changes and expression of heat shock protein hsp-70 mRNA, neurotrophic factor mRNA, and cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Brain Res* 1998; 804: 212-23.
- Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kamayama S, et al. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res* 1999; 818: 579-82.
- Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Montesinos SP, Abraham LA, et al. Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 2000; 418: 411-22.
- Jankowski JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizure and their sequelae. *Progr Neurobiol* 2001; 63: 125-49.
- Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 2001; 24: 47-53.
- Zhu WJ, Roper SN. Brain-derived neurotrophic factor enhances fast excitatory synaptic transmission in human epileptic dentate gyrus. *Ann Neurol* 2001; 50: 188-94.
- Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 1980; 5: 991-1014.
- Lothman EW, Collins RC. Kainic acid-induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 1981; 218: 299-318.
- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline and picrotoxin: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981; 6: 1361-91.
- Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Honykiewicz O. Kainic acid-induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 1983; 10: 1301-15.
- Sperk G, Lassmann H, Baran H, Seitelberger F, Honykiewicz O. Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res* 1985; 338: 289-95.
- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; 14: 375-403.
- Lothman EW, Bertram E, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Progr Neurobiol* 1991; 37: 1-82.
- Clifford DB, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. Ketamine, phencycline, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia*. 1990; 31: 382-90.
- Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 933-43.
- Guarnieri T, Virgili M, Villani L, Facchinetti F, Contestabile A, Mignani P. Pharmacological manipulation of the NMDA receptor differentially protects from systemic kainic acid neuropathology: evaluation through ornithine decarboxylase induction, morphology and GFAP immunohistochemistry. *Rest Neurol Neurosci* 1993; 5: 327-35.
- Moncada C, Arvin B, Le Peillet E, Meldrum S. Non-NMDA antagonists protect against kainate more than AMPA toxicity in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1991; 133: 287-90.
- Berg M, Bruhn T, Johansen FF, Diemer NH. Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: different effects of NMDA and AMPA receptor antagonists. *Pharmacol Toxicol* 1993; 73: 262-53.
- Loscher W, Lehmann H, Behl B, Seemann D, Teschendorf HJ, Hofmann HP, et al. A new pyrrol-quinoline oxalindione series of non-NMDA glutamate receptor antagonists: pharmacological characterization and comparison with NBQX and valproate in the kindling model of epilepsy. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 250-62.
- Patel S, Meldrum BS, Collins JF. Distribution of (3H) kainic acid binding sites in the rat brain: in vivo and in vitro receptor autoradiography. *Neurosci Lett* 1986; 70: 301-7.

42. Tremblay E, Represa A, Ben-Ari Y. Autoradiographic localization of kainic acid binding sites in the human hippocampus. *Brain Res* 1985; 343: 378-82.
43. Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 1997; 388: 182-6.
44. Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA. Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nature Neurosci* 1998; 1: 479-86.
45. Mulle C, Sailer A, Perg-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, et al. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 1998; 392: 601-5.
46. Cossart E, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben-Ari Y. GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nature Neurosci* 1998; 1: 470-8.
47. Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 342-51.
48. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000; 23: 580-7.
49. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-76.
50. Bading H, Segal M, Sucher NJ, Dudek H, Lipton SA, Greenberg ME. N-methyl-D-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 1995; 64: 653-64.
51. Leist M, Nicotera P. Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1998; 132: 79-125.
52. Sloviter RS. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry. Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 1989; 280: 183-96.
53. Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the 'dormant basket cell' hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1991; 1: 41-66.
54. Ferrer I, Planas AM. Induction and distribution of heat shock protein-70 messenger and protein following systemic KA injection in the rat: evidence of protein axonal transport. *Neuroscience* 1995; 69: 1111-8.
55. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez-Farré ER. KA-induced heat shock protein-70, mRNA and protein expression is inhibited by MK-801 in certain rat brain regions. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 293-304.
56. Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martín F, Ferrer I. The heat shock protein response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Progr Neurobiol* 1997; 51: 607-36.
57. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998; 44: 584-91.
58. Krebs RA, Feder ME. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 60-71.
59. Schreiber SS, Tocco G, Najm I, Thompson RF, Baudry M. Cycloheximide prevents kainate-induced neuronal death and c-Fos expression in adult rat brain. *J Mol Neurosci* 1993; 4: 149-59.
60. Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, Ferrer I. Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. *J Neurobiol* 1997; 33: 232-46.
61. Le Gal La Salle G. Long-lasting and sequential increase of c-Fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 1988; 88: 127-30.
62. Popovici T, Represa A, Crépel A, Barbin G, Beaudoin M, Ben-Ari Y. Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-Fos-like proteins in rat brain. *Brain Res* 1990; 536: 183-94.
63. Gass P, Herdegen T. Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic-neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Progr Neurobiol* 1995; 47: 257-90.
64. Kasof GM, Mandelzys A, Maika SD, Hamer RE, Curran T, Morgan JJ. Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate-early gene response in c-Fos-lacZ transgenic rats. *J Neurosci* 1995; 15: 4238-49.
65. Dragunow M, Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic cell death. *Brain Res Rev* 1995; 21: 1-28.
66. Kiessling M, Gass P. Immediate early gene expression in experimental epilepsy. *Brain Pathol* 1993; 3: 381-93.
67. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995; 377: 340-4.
68. Tsirka S, Rogove AD, Strickland S. Tissue plasminogen activator and neuronal death. *Nature* 1996; 384: 123-4.
69. Tsirka S, Rogove AD, Bugge TH, Degon JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17: 543-52.
70. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997; 91: 917-25.
71. Tan Z, Levid J, Schreiber SS. Increased expression of Fas (CD95/APO-1) in adult rat brain after kainate-induced seizures. *NeuroReport* 2001; 12: 1979-82.
72. Guillardot F, Wichert H, Zimmermann M. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett* 1995; 192: 85-8.
73. López E, Pozas E, Rivera R, Ferrer I. Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* 1999; 91: 1461-70.
74. Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B, Domínguez I, Viñals F. Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAP/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed following systemic administration of kainic acid to the adult rat. *Acta Neuropathol* 2001 (submitted).
75. Mielke K, Brecht S, Dorst A, Herdegen T. Activity and expression of JNK-1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-Jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neuroscience* 1999; 91: 471-83.
76. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK-3 gene. *Nature* 1997; 289: 865-70.
77. Evans MC, Griffiths T, Meldrum BS. Kainic acid seizures and the reversibility of calcium loading in vulnerable neurons in the hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984; 10: 285-302.
78. Griffiths T, Evans MC, Meldrum BS. Status epilepticus: the reversibility of calcium loading and the acute neuronal pathological changes in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1984; 12: 557-67.
79. Ignatowicz E, Vezzani AM, Rizzi M, D'Incalci M. Nerve cell death induced in vivo by kainic acid and quinolinic acid does not involve apoptosis. *Neuroreport* 1991; 2: 651-4.
80. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 2000; 98: 41-53.
81. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia* 2000; 41: 9-13.
82. Filipkowski R, Hetman M, Kaminska K, Kaczmarek KL. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* 1994; 5: 1538-40.
83. Pollard H, Charriaud-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J, et al. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 1994; 6: 7-18.
84. Sakhi S, Sun N, Wing LL, Mehta P, Schreiber SS. Nuclear accumulation of p53 protein following kainic acid-induced seizures. *Neuroreport* 1996; 7: 493-6.
85. Domínguez I, Blasco-Ibáñez JM, Ferrer I, Martínez-Guijarro FJ. Typology of the neuronal damage in the hippocampus of mice treated with kainic acid and diethyldithiocarbamate. *Brain Res* (submitted).
86. Ferrer I, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F, et al. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Brain Pathol* 1994; 4: 115-22.
87. Charriaud-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; 7: 61-4.
88. De Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventós J, Macaya A. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 1997; 230: 1-4.
89. Becker AJ, Guillardot F, Blümcke I, Langenndörfer D, Beck H, Wieslter OD. Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus. *Mol Brain Res* 1999; 67: 172-6.
90. Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ. Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Mol Brain Res* 1999; 70: 159-63.
91. Ferrer I, López E, Blanco R, Rivera R, Krupinski J, Martí E. Differential c-Fos and caspase expression following kainic acid excitotoxicity. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 245-56.
92. Henshall DC, Chen J, Simon RP. Involvement of caspase-3-like pro-

- tease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *J Neurochem* 2000; 74: 1215-23.
93. Bugra K, Pollard H, Charton G, Moreau J, Ben-Ari Y, Khrestchalsky M. aFGF, bFGF and Flg mRNAs show distinct patterns of induction in the hippocampus following kainate-induced seizures. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 58-66.
 94. Reeben M, Laurikainen A, Hiltunen JO, Castren E, Saarma M. The messenger RNAs for both glial cell line-derived neurotrophic factor GDNF, c-ret and GDNFR α are induced in the rat brain in response to kainate induced excitation. *Neuroscience* 1998; 83: 151-9.
 95. Dugich-Djordjevic MM, Tocco G, Lapehak PA, Pasinetti GM, Najm I, Baudry M, et al. Regionally specific and rapid increases in brain derived neurotrophic factor messenger mRNA in the adult rat fore-brain following seizures induced by systemic administration of kainate. *Neuroscience* 1992; 47: 303-15.
 96. Goutan E, Martí E, Ferrer I. BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses. *Mol Brain Res* 1998; 59: 154-64.
 97. Dugich-Djordjevic MM, Ohsawa F, Okazaki T, Mori N, Day JR, Beck KD, et al. Differential regulation of catalytic and non-catalytic trkB messenger RNAs in the rat hippocampus following seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Neuroscience* 1995; 66: 861-77.
 98. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1455-64.
 99. Cheng B, Matson MP, NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res* 1994; 640: 56-7.
 100. Rudge JS, Mather PE, Pasnikowski EM, Cai N, Corcoran T, Acheson A, et al. Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after kainic-induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp Neurol* 1998; 149: 398-410.
 101. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in the hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985; 5: 1016-22.
 102. Cronin J, Dudek FE. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res* 1988; 474: 181-4.
 103. Bendotti C, Pende M, Samanin R. Expression of GAP-43 in the granule cells of rat hippocampus after seizure-induced sprouting of mossy fiber: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 509-15.
 104. Boschert U, O'Shaughnessy C, Dickinson R, Tessari M, Bendotti C, Catsicas S, et al. Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996; 367: 177-93.
 105. Geddes JW, Hess EJ, Hart RA, Kesslak JP, Cotman CW, Wilson MC. Lesions of hippocampal circuitry define synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 1990; 38: 515-25.
 106. Martí E, Blasi J, Gómez de Aranda I, Ribera R, Blanco R, Ferrer I. Selective early induction of synaptosomal-associated protein (molecular weight 25,000) following systemic administration of kainate at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* 1999; 90: 1421-32.
 107. Bender R, Heimrich B, Meyer M, Frotscher M. Hippocampal mossy fiber sprouting is not impaired in brain-derived neurotrophic factor deficient mice. *Exp Brain Res* 1998; 120: 399-402.

SEÑALIZACIÓN CELULAR EN EL HIPOCAMPO EPILÉPTICO

Resumen. La señalización celular que manda sobre la muerte o la supervivencia en el hipocampo epiléptico humano es difícil de identificar a causa del prolongado intervalo entre el comienzo de los síntomas y el muestreo del tejido cerebral dañado para el examen neuropatológico. La inyección intraperitoneal del glutamato análogo del ácido kaínico (AK) es una herramienta útil para el análisis de los efectos de convulsiones y el daño excitotóxico en el hipocampo del roedor. El AK actúa sobre los receptores NMDA y AK, mientras que el impacto sobre los receptores AMPA es muy pequeño. Las neuronas del hilio y las neuronas CA3 son dianas primarias del AK, aunque las neuronas gabaérgicas que contienen parvalbúmina son menos vulnerables que las neuronas glutamatérgicas. Las respuestas inmediatas al AK son la inducción de hsp-70, ARNm y la expresión de la proteína HSP-70/72, junto con c-fos y c-jun ARNm, y la expresión de las proteínas c-Fos y c-Jun en el hipocampo, aunque la expresión aumentada de c-Fos y c-Jun no predice la muerte celular o la supervivencia de la misma. Por el contrario, el activador del plasminógeno tisular (tPA) y la vía de señal de la membrana Fas/FasL probablemente tenga un papel facilitador en el seguimiento de la muerte celular por la inyección de AK. La afectación de otras vías permanece controvertida. Un aumento en la expresión de Bax pro-apoptótico junto con una reducción en Bcl-2 sugiere apoptosis ayudado por Bax. La activación de la vía mitocondrial incluye el escape del citocromo c al citosol y activación de la cascada caspasa que lleva a la apoptosis. Sin embargo, otros estudios han puesto de relieve la expresión limitada de la caspasa-3, el ejecutor principal de la apoptosis, y la relevancia de necrosis como la forma principal de la muerte celular después de la excitotoxicidad del AK. La activación fosforilación dependiente de varias cinasas, entre ellas MAPK, p38 y JNK/SAPK, y sus sustratos, se ha encontrado en los animales tratados con AK. La expresión disminuida de CREBp se asocia con la muerte celular, mientras que el aumento en ATF-2P y Elk-1P se asocia con la supervivencia celular. Los factores tróficos probablemente no desempeñan un papel significativo en las etapas iniciales del daño hipocámpal, pero tienen su importancia en la remodelación de las células granulares y el brote de fibras musgosas a la capa molecular del giro dentado. Esta regeneración anómala, a su vez, facilita el 'reclutamiento' y mantenimiento crónico de las convulsiones. [REV NEUROL 2002; 34: 544-50]

Palabras clave. Ácido kaínico. Apoptosis. Bcl-2. Caspasas. Cinasas. Convulsiones. Fas. HSP-72. Necrosis.

SINALIZAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO EPILÉPTICO

Resumo. A sinalização celular que comanda a morte ou a sobrevivência no hipocampo epiléptico humano é difícil de ser traçada devido ao longo intervalo entre o início dos sintomas e a amostragem de tecido cerebral lesionado para exame neuropatológico. A injeção intraperitoneal de ácido caínico (AC), um análogo do glutamato, é uma ferramenta útil para analisar os efeitos das convulsões e da lesão citotóxica no hipocampo de roedores. O AC actua sobre os receptores NMDA e AC, enquanto que tem um impacto reduzido sobre os receptores AMPA. Os neurónios do hilo e os neurónios CA3 são os alvos primários do AC, apesar dos neurónios gabaérgicos, contentores de parvalbumina, serem menos vulneráveis do que os neurónios glutamatérgicos. As respostas imediatas ao AC são a indução mRNA hsp-70 e a expressão da proteína HSP-70/72, bem como mRNA c-fos e c-jun, e a expressão da proteína c-Fos e c-Jun no hipocampo. Logo, o aumento da expressão c-Fos e c-Jun não é um indicador da morte ou da sobrevivência da célula. Por outro lado, o activador do plasminogénio tecidular (tPA) e a via sinalizadora da membrana Fas/Fas-L têm provavelmente um papel favorecedor na morte da célula, após injeção de AC. O envolvimento de outras vias permanece controverso. A expressão aumentada do Bax pró-apoptótico, juntamente com Bcl-2 reduzido, sugere apoptose mediada pelo Bax. A activação da via mitocondrial inclui saída do citocromo c para o citosol e activação da cascata de caspase que conduz à apoptose. Contudo, outros estudos evidenciaram a expressão limitada da caspase-3, o principal executor da apoptose, e a relevância da necrose como forma principal de morte celular após excito-toxicidade AC. A activação dependente da fosforilação de diversas quinases, incluindo a MAPK, p-38 e JNK/SAPK, e respectivos substratos foi encontrada em animais tratados com AC. A expressão reduzida de CREBp está associada à morte celular, enquanto que o ATF-2P e Elk-1P estão associados à sobrevivência celular. Provavelmente, os factores tróficos não desempenham um papel importante durante as fases iniciais de lesão do hipocampo, mas são importantes na remodelação das células granulares e no rebentar das fibras mossy para a camada molecular do núcleo dentado. Esta regeneração anormal, por seu lado, favorece as convulsões e a manutenção crónica das mesmas. [REV NEUROL 2002; 34: 544-50]

Palavras chave. Ácido caínico. Apoptose. Bcl-2. Caspases. Convulsões. Fas. HSP-72. Necrose. Quinases.