

MODIFICACIONES EN LA INHIBICION RECURRENTE DEL HIPOCAMPO DE LA RATA POR LA ADMINISTRACION DE HALOTANO E ISOFLURANO

* JOSÉ DE JESÚS JARAMILLO-MAGAÑA
** JORGE BRAVO-MARTÍNEZ
** JOSÉ ANTONIO GALINDO-MORALES
*** HUGO SOLÍS-ORTIZ

RESUMEN

El presente trabajo describe los efectos de los anestésicos inhalados halotano e isoflurano sobre los potenciales provocados por la estimulación eléctrica de la corteza entorrinal y registrados en el giro dentado del hipocampo de la rata. Se utilizó el paradigma de los pulsos pares para medir el grado de inhibición recurrente secundario a la administración de dosis variables de ambos agentes anestésicos. Las concentraciones de halotano e isoflurano variaron de 0.5 - 4.0%, correspondientes a 0.5 - 1 MAC o equivalentes. Los efectos de ambos agentes sobre los potenciales provocados fueron dependientes de la concentración y su efecto fue reversible al discontinuarlos. El halotano produjo una marcada inhibición de la amplitud de la población neuronal mientras que el isoflurano produjo una facilitación de la vía monosináptica a un intervalo entre pulsos de 25 ms. La acción del halotano sobre los potenciales provocados en el giro dentado, fueron muy similares a los producidos por drogas que aumentan la inhibición mediada por GABA mientras que los producidos por isoflurano fueron muy parecidos a los provocados por drogas que facilitan la vía glutamatérgica de la corteza entorrinal. Estos datos sugieren que ambos anestésicos, tienen mecanismos de acción muy diferentes sobre la misma vía monosináptica.

Palabras clave: Anestésicos, inhalados: halotano, isoflurano. Hipocampo: inhibición recurrente, potenciales provocados, vía perforante.

SUMMARY

This paper describes the effects of halothane and isoflurane on the evoked potentials recorded in dentate gyrus of the rat hippocampus. The pulse-paired paradigm was used to evaluate the effects on recurrent inhibition during administration of halothane and isoflurane in variable concentrations equivalents to 0.5 - 1.5 MAC. The effects of both agents were related to dose and the effect was reversible with discontinuance of the anesthetics. The action of halothane on dentate gyrus evoked responses is very similar to that produces by drugs known to enhance GABA-mediated inhibition. However, the effects of isoflurane are very similar to that produces by drugs known to enhance glutamate-mediated facilitation. These data suggest that halothane and isoflurane exhibit different actions on the same monosynaptic pathway.

Key words: Anesthetics, inhalation: Halothane, isoflurane. Hippocampus: evoked potenciales, perforant pathway, recurrent inhibition.

*Médico adscrito al Departamento de Neuroanestesiología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

**Investigador asociado. Departamento de Neurofisiología. Laboratorio de Fisiología del control motor. Unidad de Investigaciones cerebrales. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

***Jefe del Departamento de Neurofisiología.

Trabajo elaborado en el Laboratorio de Fisiología del Control Motor. Departamento de Neurofisiología. Unidad de Investigaciones Cerebrales. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Correspondencia: Dr. José de Jesús Jaramillo-Magaña. Departamento de Neuroanestesiología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama. Tlalpan, 14269. México, D.F.

La anestesia es un fenómeno neurofisiológico cuyo mecanismo de producción se desconoce. Los primeros estudios emprendidos para explicar su mecanismo se realizaron alrededor de 1857 por el fisiólogo francés Claude Bernard¹. Bernard concluyó que el estado anestésico era secundario a la presencia de asfixia en el animal. Sin embargo, fueron Sowton y Sherrington en 1905^{2,3}, quienes postularon un mecanismo neurofisiológico al demostrar que la aplicación local de cloroformo directamente sobre el nervio ciático, bloqueaba la respuesta refleja motora.

La vulnerabilidad de la transmisión sináptica a los anestésicos generales la demostraron en 1952 Larrabee y Posternak⁴, al observar que muchas sustancias anestésicas inhiben la transmisión sináptica sin alterar aparentemente, la conducción del impulso nervioso. Sin embargo, no todos los anestésicos producen inhibición sináptica, ya que no todos muestran esta selectividad.

Las teorías actuales sugieren que la acción de los anestésicos a nivel de la membrana celular, se lleva a cabo en sitios lipídicos⁵ o proteicos⁶. Por lo que se han propuesto varios mecanismos biofísicos que intervienen en estos sitios. Con relación a la naturaleza exacta del sitio de acción de los anestésicos, la información disponible sugiere un cambio conformacional en la membrana celular. Este cambio estaría determinando alteraciones en los procesos de regulación de la excitabilidad neuronal⁷.

La teoría de Meyer-Overton^{8,9} sugiere que el "sitio anestésico" es de carácter hidrofóbico y que puede estar presente en la bicapa de lípidos de la membrana celular⁴. Sin embargo, se ha propuesto recientemente que este sitio puede estar en el dominio hidrofóbico de las proteínas^{5,6,10}. Actualmente existe suficiente evidencia experimental que señala que los anestésicos generales pueden actuar en múltiples sitios de la membrana celular para deprimir la transmisión excitatoria en el SNC. El mecanismo de acción que provoca anestesia puede ser diferente para cada uno de los anestésicos^{5,10-13}. Este hecho no está de acuerdo con lo que plantea la "teoría unitaria" que sugiere la existencia de un mecanismo común para todos los agentes¹⁴⁻¹⁶.

Se ha reportado que los anestésicos inhalados no tienen efecto sobre el potencial postsináptico excitatorio (EPSP) en el hipocampo *in vitro*¹⁷. Estas observaciones son compatibles con otro concepto que afirma que el estado anestésico se produce por un aumento o potenciación de los procesos inhibitorios centrales¹⁸. Por ejemplo, el potencial postsináptico inhibitorio (IPSP) en el hipocampo y la médula espinal se potencia por los barbitúricos^{19,20}, y anestésicos volátiles^{21,22}. Sin embargo, otros autores han observado una disminución de la amplitud del IPSP en el hipocampo y médula espinal después de la administración de los anestésicos^{17,23}. Aunque es posible que la inhibición del SNC sea la principal acción provocada por los anestésicos, existe suficiente

evidencia que señala también la producción de facilitación de la transmisión excitatoria²⁴⁻²⁶. Esta facilitación puede observarse en registros electroencefalográficos en donde se puede apreciar un patrón de activación en el EEG²⁷.

Además, cada uno de los anestésicos produce efectos específicos sobre la actividad eléctrica cerebral. Sin embargo, no ha sido observado un mecanismo neurofisiológico común para todos los agentes. Estas observaciones no apoyan la tradicional teoría unitaria de la anestesia^{2,14-16}, y es probable que existan múltiples acciones en diferentes sitios selectivos de la membrana neuronal^{13,28}.

Diferentes agentes anestésicos (inhalados y barbitúricos), hiperpolarizan las neuronas de la médula espinal y del hipocampo²⁹ y existe una correlación entre la concentración requerida para producir hiperpolarización y la necesaria para producir anestesia. Otros autores, han reportado que el halotano, isoflurano y enflurano, des-polarizan las neuronas hipocámpales, y postulan que el principal mecanismo de acción de estos anestésicos podría ser la inhibición de la descarga espontánea a través de acciones sobre el umbral de la población de espigas^{30,31}.

El propósito de este trabajo es el de investigar el efecto del halotano e isoflurano sobre el mecanismo de inhibición recurrente en el hipocampo. Este mecanismo constituye un fenómeno electrofisiológico bien establecido y que puede valorarse de manera objetiva con la técnica de estímulos pares y el registro de potenciales provocados en el hipocampo. Asimismo, permite valorar el grado de facilitación a corto plazo en el giro dentado, y de esta forma estudiar el modo de respuesta a corto plazo de la célula granulosa en el giro dentado, la dominancia de la facilitación o inhibición interneuronal durante la anestesia producida por diferentes concentraciones de halotano o isoflurano y cuantificar el grado de facilitación o inhibición provocada por estos dos anestésicos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar con peso promedio de 250 - 350 g (Colonia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía) anestesiadas con Ketamina (50 mg/kg) IP., y relajadas con pancuronio (1.0 mg/kg). Se colocaron en un aparato esterotáxico y se ventilaron artificialmente con una mezcla de aire enriquecido con oxígeno ($\text{FiO}_2 = 0.6$). La temperatura corporal se mantuvo constante durante todo el experimento en $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por medio de un colchón térmico. Se infiltró la piel del cráneo con lidocaína al 1%. Se expuso el cráneo y se realizaron dos trepanos bifrontales para la colocación de electrodos de EEG, y dos trepanos para permitir la colocación del electrodo de registro y estimulación. Se colocó un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable (diámetro 0.3 mm) aislado, excepto en la punta (electrodo de esti-

mulación), en la corteza entorrinal izquierda (AP 7.5 mm, Lat 5.0 mm, V 4.0 mm con respecto a bregma). Una micropipeta de vidrio de borosilicato llena con azul de pontamina 2.5% en KCl 2 M y con resistencia de 10 - 20 M Ω , sirvió como electrodo de registro y se colocó en el giro dentado (DG) del hipocampo ipsilateral al electrodo de estimulación (AP 3.5 mm, Lat 3.0 mm, V 3.5 mm, con respecto a bregma; Fig 1A). La profundi-

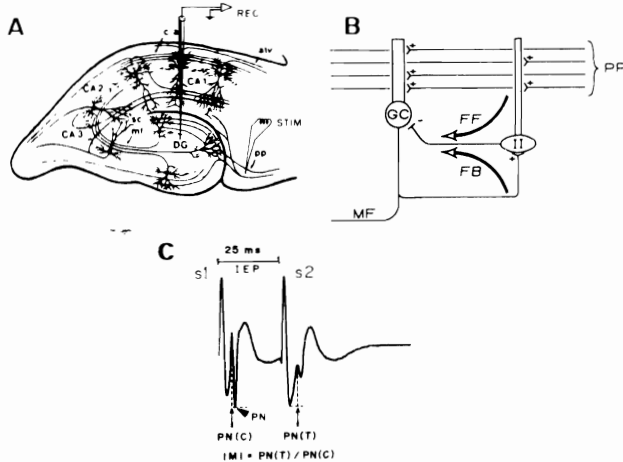


Figura 1.: Inhibición recurrente y estímulos pares en el hipocampo. A: Diagrama del hipocampo que muestra la colocación del electrodo de estimulación (STIM) en la vía perforante (pp) de la corteza entorrinal y el electrodo de registro (REC) en el giro dentado (DG). El circuito inhibitorio se ilustra esquemáticamente en B, el cual muestra tanto las vías de alimentación anterógrada: feed-forward (FF) y la inhibición recurrente: feedback (FB). Los potenciales provocados extracelulares de campo y los parámetros de los pulsos pares, se muestran en C. Cuando un pulso de estimulación eléctrica (s1), se aplica a la vía perforante, un número de células granulosas (GC), interneuronas inhibitorias (II) y neuronas de inhibición anterógrada (FF), se activan y se genera un potencial de campo. La amplitud de la población de espigas (población neuronal: PN), representa el número de células granulosas que descargan sincrónicamente en respuesta a s1. El disparo de estas células granulosas, activa subsecuentemente la vía de retroalimentación negativa (inhibición recurrente: FB) que junto con la FF liberan GABA para inhibir la descarga de las células granulosas por un corto periodo de tiempo (15-40 ms). La intensidad de la inhibición puede valorarse por la aplicación de un segundo estímulo (s2) a la vía perforante, mientras que la inhibición debida a s1, aún es efectiva. El intervalo entre pulsos (IEP), es el tiempo entre s1 y s2. El segundo estímulo genera otro potencial de campo que muestra una inhibición de la amplitud de la población neuronal (PN) por el estímulo de prueba: PN(T). La inhibición interneuronal o facilitación a corto plazo medida por la prueba de pulsos pares, se expresa por el índice de pulsos pares, o índice de máxima inhibición (IMI), que es igual a: $IMI = PN(T) / PN(C)$. alv: alveus; ca: fibras comisurales de asociación; mf: fibras musgosas; sc: colaterales de Schaffer; Ca1 - 4 neuronas hipocampaes piramidales.

dad final de los electrodos se determinó por las características del potencial de campo extracelular³². Se registraron los potenciales de campo extracelulares en el DG como respuesta a estímulos (0.15 - 0.4 ms, 1 - 40 V,

0.1 Hz), en la corteza entorrinal ipsilateral al electrodo de registro. En este sitio, los potenciales de campo extracelulares tienen una respuesta caracterizada por una deflexión positiva y una deflexión negativa correspondiente a la descarga sincrónica: población neuronal (PN), Fig. 1C. La amplitud de esta respuesta corresponde a la población neuronal (PN), y es proporcional al número de células granulosas que descargan en forma sincrónica por la aplicación del estímulo³³. Los potenciales se amplificaron y se observaron en un osciloscopio y se alimentaron a través de una interfase analógica digital a una computadora para su promediación y análisis. Se promediaron 10 respuestas para cada fase del experimento. Para la colocación final del electrodo de registro, se aplicó un estímulo hasta obtener la máxima amplitud del potencial provocado. Posteriormente, se dejó transcurrir un periodo de 30 - 40 minutos para que se iniciara la obtención de los datos y para evitar interacciones entre la ketamina y los anestésicos inhalados. Se aplicaron pulsos pares para obtener respuestas al primer y segundo estímulo (s1 y s2 respectivamente). Estos dos estímulos se aplicaron a la vía perforante (PP) de la corteza entorrinal. El grado de inhibición recurrente se valoró mediante el índice de máxima inhibición (IMI) que es la razón de la amplitud del potencial neuronal del segundo potencial provocado (PN (T)) a la amplitud del potencial neuronal del primer potencial provocado (PN(C)), $IMI = PN(T) / PN(C)$ ³³⁻³⁵ (Fig. 1C). Los potenciales registrados extracelularmente en la capa granular del DG, provocados por la estimulación de la corteza entorrinal, constan de dos componentes que corresponden a eventos neuronales diferentes pero relacionados entre sí. El primer componente positivo del potencial corresponde a la despolarización del árbol dentrítico de la célula granular, en respuesta al neurotransmisor excitatorio liberado por las terminales de la vía perforante y el segundo componente corresponde a la descarga sincrónica de la población neuronal (PN) de muchas células granulosas en respuesta a la despolarización dentrítica. La amplitud del potencial que implica la despolarización de la población neuronal es proporcional al número de células granulosas que se activan por un estímulo dado. La inhibición recurrente es mediada por interneuronas inhibitorias del giro dentado y puede valorarse con el método de estímulos pares, que mide la relación de la amplitud del potencial provocado por el primer estímulo (C: condicionante) y la amplitud del segundo potencial provocado por el estímulo (T: prueba). El IMI es normalmente menor que 1 y tomará valores mayores cuando hay disminución de la inhibición recurrente. Fig. 1B. (Solís-Ortiz H, Bravo-Martínez J, Galindo-Morales JA: Modificación de la inhibición recurrente por la estimulación eléctrica iterativa o por la aplicación local de fármacos convulsionantes al hipocampo. En: Epilepsia. Brailowsky S, Velasco M (eds), en prensa). Ya que el grado de inhibición varía, tanto en función de la inten-

sidad del estímulo como con el intervalo entre pulsos (IEP), este último se mantuvo fijo en 25 ms³³, Fig. 1C). Para probar el efecto de los anestésicos inhalados sobre los procesos inhibitorios en el DG del hipocampo, después del periodo permitido para la estabilización de la preparación, dos grupos de animales fueron anestesiados con halotano ($n = 3$) o isoflurano ($n = 3$). El orden de administración de los anestésicos inhalados (AI) fue de mayor a menor concentración para prevenir deterioros en la preparación.³⁶ Cada animal fue anestesiado con sólo uno de los anestésicos y sirvió como su control. Los anestésicos fueron administrados en vaporizadores compensados a flujo, presión y temperatura (Mark III, Cyprane Co, LTD para halotano o isoflurano), a un flujo constante de 600 ml/min en oxígeno al 100%. El dial del vaporizador se colocó inicialmente 50% sobre el nivel deseado durante 15 minutos mínimo, para obtener un equilibrio más rápido y se mantuvo a la concentración deseada al menos durante 15 min antes de hacer una medición fisiológica. Los rangos probados de los anestésicos fueron de 0.5 - 4.0% de fracción inspirada (Fi V/V). Pasaron al menos 15 minutos entre cambios en el cambio de la concentración del anestésico y las mediciones subsecuentes. Se evaluó la respuesta a los estímulos pares en condiciones basales (control) y a 1, 2 y 3% de los anestésicos inhalados correspondientes a valores MAC determinados³⁷, así como a los 15 y 30 min después de suspender la administración del anestésico (recuperación). Se calculó el porcentaje de cambio respecto al control de la amplitud del primer potencial y de la amplitud del segundo potencial, así como la relación $PN(T) / PN(C)$. Se construyeron curvas del índice máximo de inhibición (IMI) contra la concentración de cada uno de los anestésicos y durante su periodo de recuperación. Los resultados fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba "t" de student pareada. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa, y se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de la muestra ($\bar{X} \pm DSM$). Al final de los experimentos se depositó una marca de colorante (azul de pontamina) en el DG por medio de una corriente de 20 μA durante 15 - 20 min. Se perfundió al animal con 100 ml de solución salina intracardiaca y posteriormente con 300 - 400 ml de formol al 10%. Se extrajo el cerebro y se almacenó durante 24 hrs en una solución de formol al 10%. Se realizaron cortes coronales de 40 μm en un microtomo por congelación y se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina antes de su tinción con tionina al 1%³⁴. Este procedimiento permitió examinar el sitio donde se encontraba el electrodo de registro.

RESULTADOS

La estabilidad hemodinámica de los animales fue un

factor importante durante el desarrollo de los experimentos. No se presentaron variaciones importantes, especialmente durante los cambios en la concentración de los anestésicos. La administración de isoflurano provocó cambios electroencefalográficos acordes con los reportados en la literatura³⁶. Con la concentración del 1%, se observó un aumento en el voltaje y frecuencia del EEG, que evolucionó a brotes de supresión eléctrica a concentraciones del 2%, hasta el silencio electroencefalográfico (Isoflurano 3%), o supresiones de la actividad eléctrica por más de 30 s de duración. Para halotano, la actividad eléctrica fue parecida a la producida por isoflurano al 1 y 2%²⁷.

RESPUESTA DEL POTENCIAL DE CAMPO A LA ESTIMULACION DE PULSOS PARES.

En la Fig. 2 se muestran los registros típicos del po-

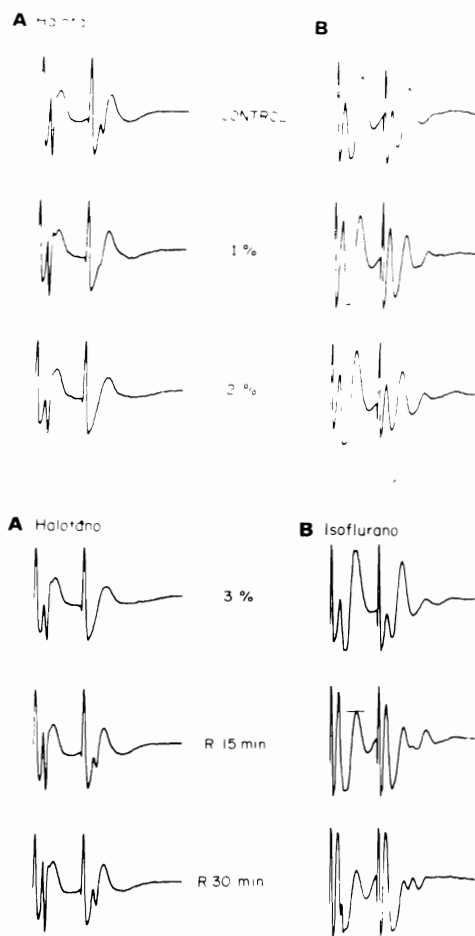


Figura 2.: Halotano e isotlurano produjeron cambios dependientes de la concentración sobre los potenciales de campo extracelulares registrados a la estimulación con pulsos pares. 2A: bloqueo de la aparición del PN(T) a concentraciones variables de halotano y aparición del PN(T) después de suprimir su administración. 2B: aumento en la amplitud de ambos potenciales PN(C) y PN(T) con la administración de isoflurano y durante su recuperación.

tencial de campo extracelular obtenidos durante la estimulación de la vía perforante (corteza entorrinal), al giro dentado ipsilateral. La estimulación de esta vía provocó un aumento en la amplitud del potencial provocado con isoflurano y una depresión del mismo con halotano. Los registros mostrados en la Fig. 2A., ilustran el perfil de los efectos producidos por el halotano, mientras que los de la Fig. 2B., ilustran la respuesta durante la administración de isoflurano.

HALOTANO

La administración de halotano produjo una disminución de la amplitud del PN(T) de una manera dependiente de la concentración, ($p < 0.05$). La depresión de la respuesta del PN(T) fue más evidente a concentraciones bajas y mucho menor a concentraciones del 2% ($p < 0.001$; Figs. 2A y 3). A los 15 min después de suprimir la administración del halotano, las respuestas del PN(C) y del PN(T), fueron prácticamente iguales a las condiciones control del animal, mientras que a los 30 min. el PN(C) y el PN(T), aumentaron su amplitud en forma significativa sobre el control y sobre el resto de las concentraciones (Fig. 3, $p < 0.001$); nuevamente el PN(T) obtuvo su mayor amplitud a los 30 min de suprimir el anestésico ($p < 0.05$).

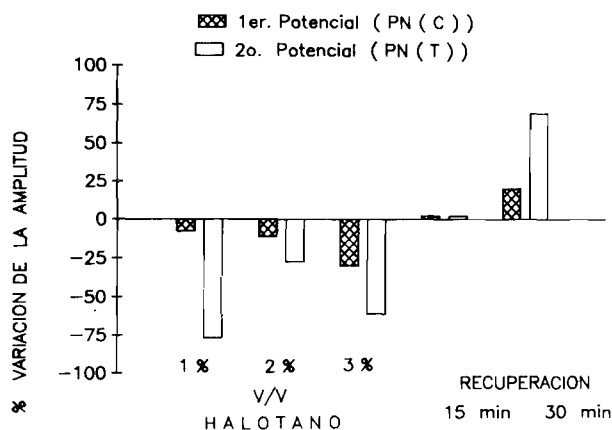


Figura 3.: Porcentaje de variación del PN(C) y del PN(T) durante la administración de halotano y después de suprimir su administración. Los cambios más importantes se produjeron en el PN(T) durante halotano al 1 y 3% y durante la recuperación, en ambos potenciales.

ISOFLURANO

La administración de isoflurano provocó un aumen-

to en la amplitud del PN(C) y del PN(T) a concentraciones del 1 y 2%, siendo menor la amplitud de ambos potenciales durante la administración de 2 y 3% ($p < 0.02$, respecto al control). El aumento de la amplitud de los potenciales durante la administración de isoflurano al 3%, no fue estadísticamente significativa respecto al resto de las mediciones (Fig. 4). Después de supri-

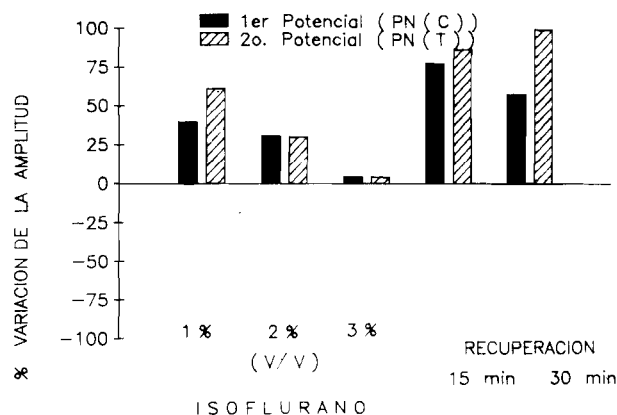


Figura 4.: Porcentaje de variación del PN(C) y del PN(T) durante la administración de isoflurano. Las variaciones más importantes ocurrieron durante la administración al 1 y 2% y durante la recuperación. Los cambios durante la administración del isoflurano fueron determinados por un aumento en la amplitud de ambos potenciales, mientras que los del halotano fueron consecuencia de una disminución en la amplitud de los mismos. Compárese con la Fig. 3.

mir la administración del anestésico (recuperación), la amplitud de ambos potenciales, fue mayor que en las condiciones de su control ($p < 0.02$); Fig. 4). El tipo de respuestas obtenidas por la administración de halotano, una depresión de los potenciales, se interpretó como una acentuada inhibición a los estímulos pares, mientras que después de la supresión del anestésico, se observó una facilitación a los estímulos pares. Con respecto al isoflurano, se observó una facilitación a los estímulos pares, que fueron dependientes de la concentración del anestésico, mayor facilitación a concentraciones bajas (1%), y menor facilitación a concentraciones del 2 y 3%. Las diferencias entre la amplitud de los potenciales durante la administración de ambos anestésicos, fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). No hubo diferencias entre la amplitud de los potenciales con la administración de ambos gases a los 30 min, después de suprimir su administración. Sin embargo, la facilitación fue mayor a los 15 min después de suprimir el isoflurano ($p < 0.01$, respecto a los 15 min después de suspender el halotano). La relación obtenida de las amplitudes del PN(T)/PN(C) con un intervalo entre pulsos fijo de 25 ms, se presenta en la Fig. 5. Esta relación, se definió como un índice máximo de inhibición (IMI). El IMI del halotano, fue siempre menor de 0.25 y se observó una

máxima depresión a concentraciones del 1% ($p < 0.05$, respecto al control), mientras que con las otras concentraciones y durante la recuperación, no sufrió modificaciones respecto al valor control ($p < 0.05$). El IMI del isoflurano, fue siempre mayor de 0.30 y disminuyó durante la administración del isoflurano al 3% ($p < 0.05$ con respecto al control). Durante la administración del isoflurano al 1% y durante la recuperación, el IMI alcanzó valores superiores que fueron significativamente diferentes con respecto al control ($p < 0.001$), y con respecto al halotano ($p < 0.05$). Al comparar el IMI del halotano contra el del isoflurano, se observó una disminución del valor del IMI con halotano al 1% y un aumento del IMI con isoflurano al 1% ($p < 0.05$). Después de suprimir los anestésicos, el IMI del halotano volvió a su valor control y del isoflurano a valores superiores al valor control, esta diferencia fue significativamente diferente entre halotano e isoflurano a los 15 y 30 min de recuperación ($p < 0.001$; Fig. 5).

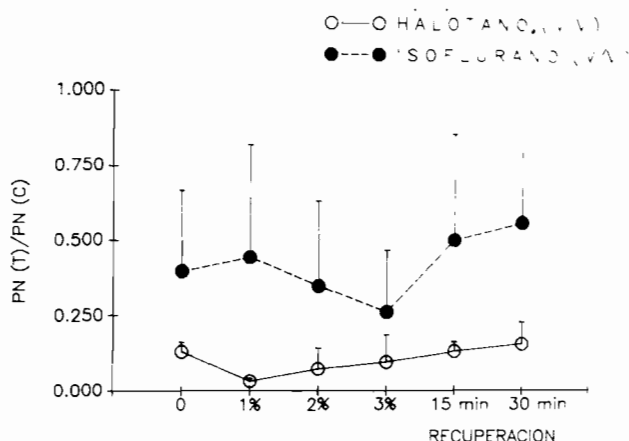


Figura 5.: Índice de pulsos pares, o índice de máxima inhibición con la administración de ambos anestésicos y después de suprimirlos. Las variaciones más importantes ocurrieron con la administración del isoflurano, significativamente diferentes respecto al IMI del halotano. (ver texto).

DISCUSION

La formación hipocampal ha sido extensamente estudiada desde el punto de vista anatómico y fisiológico^{38,42}. La mayoría de las teorías anatomofisiológicas sobre la formación hipocampal, postulan la existencia de un circuito trisináptico. En este circuito, la información neuronal que se origina en la corteza entorrinal viaja a través de la vía perforante hasta las células granulosas del

giro dentado, luego a las células piramidales de CA3 y finalmente llega a las células piramidales de CA1. Así pues, el DG está en una posición que actúa como modulador de la actividad que pasa hacia el hipocampo proveniente de la corteza entorrinal. También se ha sugerido^{43,44}, que el DG funciona como un filtro al flujo de actividad anormal del hipocampo. Ya que las amplitudes de los potenciales provocados en el giro dentado dependen del número de células granulosas activadas, la PN de 20 - 40 μV , probablemente representa la activación de un gran porcentaje o de toda la capa de células granulosas^{38, 45}. La vía entorrino hipocampal se considera generalmente como excitatoria, con el glutamato como neurotransmisor⁴⁶. Sin embargo, existe evidencia de algunas células entorrinales cuya morfología sugiere que sean de naturaleza inhibitoria, con GABA como neurotransmisor⁴⁷. Estas células inhibitorias envían proyecciones por la vía entorrino-hipocampal y pueden terminar sobre las células granulosas o piramidales o sobre interneuronas hipocampales. Algunos investigadores, han propuesto una inhibición de las neuronas inhibitorias del hipocampo⁴⁸ por esta vía. De esta forma, la poderosa excitación de las células granulosas y piramidales se genera por su excitación directa y por la inhibición simultánea de interneuronas hipocampales. Alternativamente, éstas pueden proporcionar un sustrato anatómico a la inhibición anterógrada (feedforward) de las principales células hipocampales^{49,50}.

Se ha reportado que la transmisión neuronal de la corteza entorrinal al DG, depende de estados conductuales⁵², pero las investigaciones que se realizan con animales anestesiados, no tienen que enfocar los problemas asociados con la variabilidad conductual observada con animales despiertos. Por lo que es probable que la administración de agentes anestésicos modifique la sinápsis GABAérgica en respuesta a los pulsos pares. En el presente trabajo, el halotano e isoflurano modificaron la amplitud del EPSP y de la PN, provocados por la estimulación de la vía perforante por medio del paradigma de los pulsos pares. Sin embargo, los efectos sobre las amplitudes de los potenciales, fueron diferentes para cada uno de los agentes estudiados y además, los cambios en las amplitudes dependieron de la concentración empleada. El halotano produjo una marcada depresión de la amplitud de la PN. Concentraciones equivalentes a 1 MAC, bloquearon significativamente la descarga sináptica provocada de la población de las células granulosas por la estimulación de los pulsos pares. La mayor depresión en la amplitud de la PN, se observó en el PN(T), que disminuyó en un 50 - 75% a concentraciones de 1 y 3%. La depresión del PN(C) sin embargo, mostró una correlación con la concentración del agente y fue lineal contra concentraciones de 1 al 3% (10 - 25% de depresión, Fig. 2A y 3). A los 30 min de recuperación de la anestesia, se observó un incremento en la amplitud del potencial condicionante (25% de aumento) y

del potencial de prueba (50% de aumento). Esta última respuesta puede interpretarse como una facilitación al estímulo par, es decir una facilitación de la inhibición. El halotano deprimió la descarga de espigas postsinápticas, probablemente por una acción predominantemente no sináptica, indicada por la marcada depresión de la amplitud de la PN, con poco efecto sobre el EPSP (Fig. 2A). Esta acción depresora postsináptica del halotano, semeja en alguna medida los efectos producidos por barbitúricos sobre esta vía sináptica⁵¹. Los efectos del halotano sobre la respuesta de la PN a los estímulos pares puede explicarse mediante la hipótesis que el halotano aumenta la facilitación del EPSP y el umbral para el inicio de las espigas^{50,52}. La administración de isoflurano, por otro lado, produjo siempre una facilitación de la transmisión sináptica inhibitoria, medida también por la amplitud de la PN. Durante la administración al 1%, se observó una máxima facilitación (25 - 40%), así como después de suprimir su administración. El isoflurano produjo, tanto durante su administración como durante la recuperación, un aumento en la amplitud del EPSP y de la PN. Mientras que el halotano produjo una disminución en la amplitud del PN, el isoflurano produjo el efecto totalmente opuesto: un aumento en la amplitud de la PN, tanto en el potencial condicionante como en el potencial de prueba. Una depresión y facilitación de la transmisión sináptica inhibitoria respectivamente. Estas diferencias en las acciones de ambos anestésicos, no son compatibles con un efecto común en sitios idénticos de la membrana neuronal, como lo sugiere la teoría unitaria de acción anestésica^{14,16}. Asimismo ya que estos agentes exhiben diferentes propiedades moleculares como tamaño, volumen y distribución de cargas, es probable que se unan a diferentes microdominios de la membrana, compuestos por proteínas distribuidas heterogéneamente (receptores a neurotransmisores, canales iónicos^{5,6-10}, etc.) y lípidos asociados⁵.

Los resultados del presente estudio, demuestran propiedades específicas de sitios que discriminan la estructura molecular de los anestésicos administrados. Otro aspecto del presente trabajo fue el de cuantificar el grado de inhibición o facilitación por la administración de estos dos anestésicos. Esto se determinó, por el cálculo del índice máximo de inhibición o índice de pulso par: $IMI = PN(T)/PN(C)$. Este índice varía tanto con la intensidad del estímulo como con el intervalo entre pulsos (IEP). Operacionalmente, primero hay que determinar el $PN(T)/PN(C)$ versus la intensidad del estímulo y escoger un estímulo suficiente para alcanzar un valor constante de esta relación⁵³. Una vez obtenido esto, se escoge un IEP. Esta metodología puede utilizarse sistemáticamente para comparar la potencia de la depresión a pulsos pareados entre varios estados experimentales, como la administración de diferentes fármacos^{33,35,53}. Como puede observarse en la Fig. 5, esta relación también fue diferente con la administración de ambos anestésicos.

El IMI calculado para el halotano, prácticamente no sufrió modificaciones respecto a su control, excepto en concentraciones del 1% ($p < 0.05$), y aunque esta relación estuvo muy cerca de cero, nunca se obtuvo este valor. Por lo que respecta al isoflurano, esta relación fue mucho mayor, y únicamente disminuyó con respecto al valor control con concentraciones del 2 y 3% ($p < 0.001$) en tanto que fue mayor a concentraciones del 1% y a los 15 y 30 minutos después de suprimirlo (Fig. 5). Estas observaciones son compatibles desde el punto de vista experimental con dos hechos. Primero, el halotano produjo un aumento de la transmisión sináptica inhibitoria en el SNC medida por la amplitud de la PN por la estimulación de la vía perforante hacia las células granulosas del dentado ipsilateral. Este aumento en la actividad inhibitoria, podría teóricamente haber sido facilitada por la descarga excitatoria de la vía perforante sobre el dentado, al deprimir significativamente la inhibición anterógrada (feedforward) en este sitio, o bien al facilitar la vía inhibitoria entorrino-hipocampal sobre la inhibición anterógrada⁴⁷⁻⁵⁰. Segundo, el isoflurano parece actuar mediante una disminución de la inhibición recurrente mediada por GABA, debido a sus efectos sobre el aumento en la amplitud de la PN. La recuperación del animal después del periodo anestésico, sin embargo, produjo una facilitación de la inhibición recurrente que se presentó a los 30 min para el halotano y a los 15 minutos para el isoflurano. De esta manera, se puede postular una acción inhibitoria de la vía GABAérgica como mecanismo de acción anestésica, por la administración de halotano (no estadísticamente significativa respecto al IMI), y una acción excitatoria por la administración de isoflurano.

El intervalo entre pulsos de 25 ms fue un estímulo suficiente y adecuado para mantener valores del IMI constantes. El valor promedio se acercó a cero, pero no lo alcanzó (0.02 ± 0.01 para halotano). Los resultados del presente trabajo, son congruentes con algunos reportes, mientras que son diferentes respecto a otros^{22,31,36,52,54-56}.

Un hecho es cierto, las neuronas hipocampales son sensibles a los anestésicos y los mecanismos de acción de éstos son específicos, aparentemente. Las diferencias encontradas en el presente trabajo con respecto a lo descrito en la literatura^{22,36,54-56}, pueden ser secundarias a variaciones en la especie del animal estudiado, a la metodología empleada o a la manera de interpretar los resultados. En este trabajo, se consideró a la formación hipocampal como una estructura tridimensional³⁹, a diferencia de otros trabajos que la consideran una estructura laminar^{22,31,36,52,55}. Actualmente, hay evidencia suficiente que considera al hipocampo como una estructura tridimensional³⁹ que determina que preparaciones *in vitro* de rebanadas de hipocampo, no permiten la evaluación simultánea de flujo de información a lo largo del eje transversal y septotemporal del sistema hipocampal. De esta manera, la rebanada hipocampal *in vitro* no puede con-

siderarse como un modelo adecuado del procesamiento de la información de la formación hipocampal *in vivo*. Otra diferencia del presente trabajo, es que nosotros estudiamos únicamente la respuesta a la estimulación de la vía perforante de la corteza entorrinal en el DG ipsilateral (células granulosas), y se tomó la amplitud de la PN como el porcentaje de la población neuronal que descarga a dicho estímulo. Otros autores, han reportado sus hallazgos con el uso de una estimulación contralateral y sobre diferentes campos de células piramidales en el hipocampo y sobre todo, con variaciones en el intervalo entre pulsos³⁶. De esta manera se han observado los efectos de la administración de diferentes anestésicos sobre vías bisinápticas y trisinápticas; observaciones que difieren de las nuestras, ya que nosotros mantuvimos el intervalo entre pulsos fijo en 25 ms y sólo estudiamos la activación de una vía monosináptica, presumiblemente, sobre una estructura que sirve de filtro a la actividad del hipocampo^{43,44}. Una última consideración, es que

nosotros utilizamos la preparación animal anestesiada con ketamina, que bloquea la aparición de potenciación a largo plazo (LTP)³⁶. Sin embargo, el propósito de este trabajo fue el de evaluar los cambios "plásticos" a corto plazo, sobre los fenómenos inhibitorios del hipocampo. Además se permitió un periodo de tiempo suficiente para evitar al máximo las interacciones entre la ketamina y los anestésicos inhalados administrados. Por otro lado, el mecanismo de acción de la ketamina^{54,57,58}, parece ser diferente al mecanismo encontrado para el halotano e isoflurano. Con estas observaciones, se puede postular un mecanismo de acción anestésica diferente para el halotano e isoflurano sobre los mecanismos inhibitorios en el hipocampo. Una facilitación de la vía GABAérgica por la administración de halotano y probablemente una facilitación de la vía excitatoria, para el isoflurano, debido a la inhibición de las interneuronas inhibitorias, con la consecuente aparición de un fenómeno de desinhibición.

REFERENCIAS

1. BERNARD C.: *Lectures on anesthetics and on asphyxia*. Wood Library - Museum of Anesthesiology. 1989. Translator: B. Raymond Fink.
2. SOWTON SCM, SHERRINGTON CS.: *On the relative effects of chloroform upon the heart and other muscular organs*. Br Med J. 1905; 2:181.
3. RICHARDS CD.: *Actions of general anaesthetics on synaptic transmission in the CNS*. Br J Anaesth 1983; 55:201-207.
4. LARRABEE MG, POSTERNAK JM.: *Selective action of anesthetics on synapses and axons in mammalian sympathetic ganglia*. J Neurophysiol 1952; 15:91-114.
5. ELLIOT JR, HAYDON DA.: *Mapping of general anesthetic sites*. Nature 1986; 319:77-78.
6. FRANKS NP, LIEB WR.: *What is the molecular nature of general anaesthetic target sites?* Trends Pharmacol Sci 1987; 8:169-174.
7. BRETT RS, DILGER JP, YLAND KF.: *Isoflurane causes "flickering" of the acetylcholine receptor channel: observations using the patch clamp*. Anesthesiology 1989; 69:161-170.
8. MEYER HH.: *Zur theorie der alkoholnarkose. I. Welche eigenschaft der anästhetika bedingt ihre narkotische wirkung?* Arch Exp Path Pharmac 1899; 42:109.
9. OVERTON E.: *Studien über die narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen pharmakologie*. Jena G. Fischer, 1901.
10. FRANKS NP, LIEB WR.: *Mapping of general anaesthetic sites (Reply to Elliot and Haydon)*. Nature 1986; 319:78.
11. RICHARDS CD, MARTIN K, GREGORY S, KEIGHTLEY CA, HESKETH TR, SMITH GA, WARREN GB, METCALFE JC.: *Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action*. Nature 1978; 276:775-779.
12. WINTERS WD.: *A reviews of the continuum of drug- induced states of excitation and depression*. Prog Drug Res 1982; 26:225-258.
13. WARDLEY-SMITH B, HALSEY MJ.: *Mixtures of inhalation and i.v. anaesthetics at high pressure: a test of the multi-site hypothesis of general anaesthesia*. Br J Anaesth 1985; 57:1248-1256.
14. UEDA I, HIRAKAWA M, ARAKAWA K, KAWAYA H.: *Do anesthetics fluidize membrans?* Anesthesiology 1986; 64:67-71.
15. MILLER KW.: *The nature of the site of general anesthesia*. Int Rev Neurobiol 1985; 27:1-61.
16. SEEMAN P.: *The membrane actions of anesthetics and tranquilizers*. Pharmacol Rev 1972; 24:583-655.
17. FUJIWARA N, HIGASHI H, NISHI S, SHMOJI K, SUGITA S, YOSHIMURA M.: *Changes in spontaneous firing patterns of rat hippocampal neurons induced by volatile anaesthetics*. J Physiol 1988; 402:155-175.
18. ECCLES JC, SCHMIDT RF, WILLIS WD.: *Pharmacological studies on presynaptic inhibition*. J Physiol 1963; 168:500-530.
19. LARSON MD, MAJOR MA.: *The effect of hexobarbital on the duration of the recurrent IPSP in cat motoneurons*. Brain Res 1970; 21:309-311.
20. NICOLL RA, ECCLES JC, OSHIMA T, RUBIA F.: *Prolongation of hippocampal inhibitory postsynaptic potentials by barbiturates*. Nature 1975; 258:625-627.
21. GAGE PW, ROBERTSON B.: *Prolongation of inhibitory postsynaptic currents by pentobarbitone, halothane and ketamine in CA1 pyramidal cells in rat hippocampus*. Br J Pharmacol 1985; 85:675-681.
22. MIU P, PUIL E.: *Isoflurane-induced impairment of synaptic transmission in hippocampal neurons*. Exp Brain Res 1989; 75:354-360.
23. TAKAHASHI T, TAKENOSHITA M.: *Mechanism of halothane action on synaptic transmission in motoneurons of the new born rat spinal cord in vitro*. Brain Res 1987; 402:303-310.
24. MORRIS ME.: *Facilitation of synaptic transmission by general anaesthetics*. J Physiol 1978; 284:307-325.
25. MORRIS ME.: *General anesthetics and intracellular free calcium ions*. In: Roth SH, Miller KW eds. *Molecular and cellular mechanisms of anesthetics*. New York Plenum, 1986; 65-74.
26. STEVENS JE, FUGINAGA M, OSHIMA E, MORI K.: *The biphasic pattern of the convulsive property of enflurane in cats*. Br J Anaesth 1984; 56:395-403.

27. ROSNER RS, CLARK DL.: *Neurophysiological effects of general anesthetics*. Anesthesiology 1973; 39:59-81.
28. HALSEY MJ.: *A reassessment of the molecular structure-functional relationships of the inhaled general anesthetics*. Br J Anaesth 1984; 56:9S-25S.
29. NICOLL RA, MADISON DV.: *General anesthetics hyperpolarize neurons in the vertebrate central nervous system*. Science 1982; 217: 1055-1057.
30. YOSHIMURA M, HIGASHI H, FUJITA S, SHIMOJI K.: *Selective depression of hippocampal inhibitory potentials and spontaneous firing by volatile anesthetics*. Brain Res 1985; 340:363-368.
31. MACIVER MB, ROTH SH.: *Inhalation anaesthetics exhibit pathway-specific and differential actions on hippocampal synaptic responses in vitro*. Br J Anaesth 1988; 60:680-691.
32. AUSTIN KB, BONZINO J, MORGANE PJ.: *Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood*. Dev Brain Res 1986; 29:267-273.
33. KAPUR J, STRINGER JL, LOTHMAN EW.: *Evidence that repetitive seizures in the hippocampus cause a lasting reduction of GABAergic inhibition*. J Neurophysiol 1989; 61:417-426.
34. CORNISH SM, WHEAL HV.: *Long-term loss of paired pulse inhibition in the kainic acid-lesioned hippocampus of the rat*. Neurosci 1989; 28:563-571.
35. AUSTIN KB, BRONZINO JD, MORGANE PJ.: *Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state*. Exp Brain Res 1989; 77:594-604.
36. PEARCE RA, STRINGER JL, LOTHMAN EW.: *Effects of volatile anesthetics on synaptic transmission in the rat hippocampus*. Anesthesiology 1989; 71:591-598.
37. QUASHA AL, EGER EI II, TINKER JH.: *Determination and application of MAC*. Anesthesiology 1980; 53:315-334.
38. ANDERSEN P.: *Organization of hippocampal neurons and their interconnections*. IN: *The hippocampus*, edited by RL Isaacson and KH Pibram. New York: Plenum 1975, Vol 1. p 155-175.
39. AMARAL DG, WITTER MP.: *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*. Neurosci 1989; 31:571-591.
40. BUZSAKI G, CZECH G.: *Commissural and perforant path interactions in the rat hippocampus*. Exp Brain Res 1981; 43:429-438.
41. SWANSON LW, WYSS JM, COWAN WM.: *An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathway in the rat*. J Comp Neurol 1978; 181:681-716.
42. WITTER MP, GRIFFIOEN AW, JORRITSMA-BYHAM B, KRUNEN JC.: *Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway*. Neurosci Lett 1988; 85:193-198.
43. COLLINS RC, TEARSE RG, LOTHMAN EW.: *Functional anatomy of limbic seizures focal discharges from entorhinal cortex in rat*. Brain Res 1983; 280:25-40.
44. WALTHER H, LAMBERT JDC, JONES RSG, HEINEMANN V, HAMON B.: *Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium*. Neurosci Lett 1986; 69:156-161.
45. LOMO T.: *Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation*. Exp Brain Res 1971; 12:18-45.
46. WHITE WF, NADLER JV, HAMBERGER A, LOTHMAN CW, CUMMINS JT.: *Glutamate as transmitter of hippocampal perforant path*. Nature 1977; 270:356-357.
47. GERMROTH P, SCHWERTDTEGER WK, BUHL EH.: *GABAergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus*. Brain Res 1989; 494:187-192.
48. LEE HK, DUNWIDDIE T, HOFFER B.: *Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. II. Effects of interneuron excitability*. Brain Res 1980; 184: 331-342.
49. ALGER BE, NICOLL RA.: *Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro*. J Physiol 1982; 328: 105-123.
50. BURSÁKI G.: *Feed-forward inhibition in the hippocampal formation*. Prog Neurobiol 1984; 22:131-153.
51. MACIVER MB, ROTH SH.: *Barbiturate effects on hippocampal excitatory synaptic responses are selective and pathway specific*. Can J Physiol Pharmacol 1987; 65:385-394.
52. MACIVER MB, TAUCK DL, KENDING JJ.: *General anaesthetic modification of synaptic facilitation and long-term potentiation in hippocampus*. Br J Anaesth 1989; 62:427-434.
53. KAPUR J, LOTHMAN EW.: *Loss of inhibition precedes delayed spontaneous seizures in the hippocampus after tetanic electrical stimulation*. J Neurophysiol 1989; 61:427-434.
54. IWASAKI M.: *Effects of pentobarbitone, ketamine and lignocaine on synaptic transmission in the rat olfactory cortex in vitro*. Br J Anaesth 1989; 63:306-314.
55. MACIVER MB, KENDING JJ.: *Enflurane-induced burst discharge of hippocampal CA1 neurones is blocked by the NMDA receptor antagonist APV*. Br J Anaesth 1989; 63:296-305.
56. EL-BEHEIRY H, PUIL E.: *Anaesthetic depression of excitatory synaptic transmission in neocortex*. Exp Brain Res 1989; 77:87-93.
57. WATCHEL RE.: *Ketamine decreases the open time of single-channel currents activated by acetylcholine*. Anesthesiology 1988; 68:563-570.
58. RAJA SN, GUYENET PG.: *Action of phencyclidine on synaptic transmission in the hippocampus*. Brain Res 1982; 236:289-304.