



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA SEROTONINA EN HIPOCAMPO Y SU FORMA
DE PARTICIPACION EN LAS CRISIS CONVUL-
SIVAS INDUCIDAS POR EL ACIDO KAINICO
EN LA RATA.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
FRANCISCO LOPEZ NARANJO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice:

Introducción

Antecedentes

a) Naturaleza química de la neurotransmisión

Transmisión sináptica

Los neurotransmisores

b) La serotonina (5-HT)

Origen

Biosíntesis

Localización

Almacenamiento

Liberación

Recaptura y metabolismo

Receptores

c) El hipocampo

Organización del hipocampo

Aferencias y eferencias del hipocampo

Capas que constituyen al hipocampo

d) Epilepsia

e) Modelos experimentales de epilepsia

f) El modelo convulsivo del ácido kaínico

El ácido kaínico

Acción neurotóxica del ácido kaínico

Acido kaínico y los neurotransmisores del hipocampo

g) 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT)

Mecanismo de toxicidad celular

Dihidroxitriptaminas

Especificidad y selectividad de 5,6-DHT

Objetivos

Hipotesis

Material y métodos: animales, fármacos, reactivos empleados y técnicas quirúrgicas

Evaluación de la conducta y EEG

Evaluación de la neuroquímica (5-HT y metabolitos)

Corroboración histológica

Análisis estadístico

Resultados:

Evaluación de la conducta y EEG

Evaluación Neuroquímica (5-HT y metabolitos)

Corroboración histológica

Discusión y conclusiones

Apéndice

Bibliografía

Introducción:

La epilepsia es un problema de salud muy frecuente tanto en niños como en adultos, que se presenta en aproximadamente el 5% de nuestra población y es ocasionada por un exceso en la actividad de disparo o descarga eléctrica de las células cerebrales (neuronas), lo cual se manifiesta a través de las crisis convulsivas (contracciones musculares involuntarias), con posible pérdida de la conciencia, por lo que es importante tratar de averiguar cuales son sus posibles causas, que sustancias están involucradas (neurotransmisores) y posibles mecanismos que la generan.

Existen diversos factores que pueden originarla como son: las complicaciones durante el embarazo, golpes en la cabeza a cualquier edad, intoxicaciones por alcohol, plomo, tumores,quisticercosis, falta de oxígeno al nacer, etc.

Se pueden evaluar clínica y paraclinicamente las manifestaciones de estas crisis a través del registro electroencefalográfico de estos fenómenos paroxísticos, autolimitados y de breve duración que se manifiestan por medio de las alteraciones motoras, sensoriales y psíquicas de los pacientes.

Al revisar la literatura las evidencias sugieren de manera general que la serotonina (5-HT) es un neurotransmisor involucrado en los posibles mecanismos de génesis o control de las crisis convulsivas, debido a su carácter inhibitorio. Al disminuir la concentración cerebral de 5-HT aumenta la susceptibilidad convulsiva de los animales de experimentación, sin que sea aun clara su forma de participación en dichos fenómenos, por lo cual en este trabajo de investigación se pretende saber la relación que existe entre los niveles cerebrales de este neurotransmisor y las

crisis convulsivas inducidas por el modelo experimental del ácido láctico (DLA), para lo cual se empleó una neurotoxina específica la 5,6-DHT que es captada selectivamente por las terminales serotoninérgicas causando una lesión específica y bien localizada en el hipocampo (Hc) que es la estructura anatómica del cerebro que se escogió para este estudio, debido a que se piensa que es una importante estructura para la manifestación de las crisis convulsivas.

En este trabajo las crisis convulsivas fueron evaluadas por métodos conductuales (observación visual del comportamiento de los animales), electroencefalográfico, descrito en detalle en el apéndice y en la metodología empleada, análisis neuroquímico de las muestras obtenidas del Hc y corteza cerebral (Cx) de las ratas control y lesionadas por la microinyección, lo que se trata de manera mas amplia en el capítulo correspondiente.

Este estudio abarca diversos aspectos como: la naturaleza y origen de la 5-HT, su descubrimiento y como se llegó a la conclusión de que tiene función neurotransmisora, su biosíntesis (como se genera, enzima paso limitante y secuencia metabólica), la localización de las neuronas serotoninérgicas en el sistema nervioso central (SNC) a través del uso de varias técnicas analíticas experimentales, su división en vías ascendente y descendente, como se ramifica en aferencias y eferencias, a que estructuras anatómicas inervan, los diferentes tipos de receptores a serotonina que existen y donde se localizaron inicialmente y la relación que los niveles de este neurotransmisor con la epilepsia.

La localización y descripción anatómica del Hc, su organización funcional y su importancia como estructura en la que posiblemente se generen las crisis convulsivas, una breve descripción de lo que es la

epilepsia, que la origina y los modelos experimentales desarrollados para su estudio, además del ácido láctico como modelo convulsivo, en el cual se presentan las diferentes etapas conductuales características de las crisis convulsivas descritas por Sperel, cual es su acción neurotóxica, un panorama general de las dihidrotriptaminas y en especial de la 5,6-DHT y su posible mecanismo de acción y especificidad hacia las terminales serotoninérgicas. También se emplearon diversas técnicas experimentales para el desarrollo de este proyecto como son la cirugía e implantación estereotáxica de electrodos para llevar a cabo el registro electroencefalográfico y seguir el desarrollo de las crisis convulsivas inducidas por el ácido láctico. La evaluación cromatográfica de los niveles de 5-HT en el HC y corteza parietal (Cxp) para saber si hay modificación en su concentración en el sitio de microinyección y si hay o no difusión de esta lesión hacia otras áreas adyacentes del SNC, llevando a cabo los estudios estadísticos correspondientes y la corroboración histológica del sitio de lesión.

Para que por medio de un mayor conocimiento de la concentración y relación de los niveles de este neurotransmisor con las crisis convulsivas se puedan explicar y entender algunos de los desordenes convulsivos y tratar de racionalizar la aplicación de neurofármacos, ya que la falta de información acerca de la enfermedad, se manifiesta en la desorientación, angustia del paciente y sus familiares, tratar buscar un manejo más adecuado del paciente y evitar el rechazo por parte de la sociedad, para dar un enfoque integral a este tipo de problemas.

Transmisión sináptica:

La neurona es una célula con varias funciones: excitabilidad, conductividad y es el elemento fundamental del sistema nervioso, presentando variaciones morfológicas características según la región que ocupe en el neuroeje. Sus elementos espaciales son: 1) el cuerpo de la neurona, o pericarion que es una masa del protoplasma abundante, cromófila, 2) las prolongaciones del protoplasma se clasifican en protoplasmáticas (dendritas) y cilindro eje (axón) cuando estas prolongaciones abandonan la sustancia gris para pasar a la sustancia blanca y nervios periféricos y se rodean de una vaina rica en fosforo, la mielina. La neurona se encuentra recorrida de un extremo a otro por neurofibrillas (filamentos delgados).

Existe una zona de contacto especializada entre dos neuronas llamado comunicación interneural o sinapsis, la constitución de las sinapsis permite reconocer la terminación nerviosa del axón que forma el botón presináptico y la superficie de contacto que ofrece la siguiente neurona es decir la dendrita o el cuerpo neuronal que constituye la superficie postsináptica, habiendo una separación entre ambas de 200 Å llamado hueco sináptico (27), (ver figura 1).

Hay dos tipos de sinapsis: a) la química, b) eléctrica.

a) Existe un neurotransmisor liberado por la neurona presináptica evocando una respuesta en la célula postsináptica, en este tipo de sinapsis la célula presináptica siempre es una neurona, mientras que la postsináptica puede ser una neurona, célula muscular o célula glandular. Este tipo de sinapsis químicas son las mas abundantes e importantes en los mamíferos.

b) Dos células están acopladas eléctricamente de manera que el flujo electrónico de impulsos nerviosos que cruzan en sentido bidireccional. (figura 1A).

Transmisión neuronal:

Cuando el neurotransmisor es liberado de un sitio de almacenamiento por el potencial de acción presináptico, los efectos sobre las células postsinápticas causan potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios, dependiendo de la naturaleza de los receptores celulares para un agente transmisor particular. Si se suman temporalmente suficientes potenciales postsinápticos excitatorios a partir de varias afluentes sobre la célula; la célula postsináptica integrará estos potenciales dando su propio potencial de acción del tipo de todo o nada transmitiéndolo a cada una de las propias terminales axónicas.

Para decir que sustancia actúa como neurotransmisor hay que probar que se puede aislar del sitio efector, demostrar que esta presente la vía biosintética, su liberación por estimulación, que existe un depósito de almacenamiento, que existe un mecanismo de recaptura y/o degradación que ponga fin a la acción del neurotransmisor.

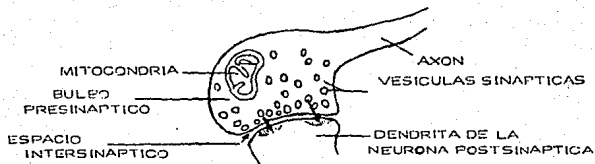


FIGURA 1. ESQUEMA DE SINAPSIS ENTRE UN AXON Y UNA DENDRITA.

TIPOS DE SINAPSIS

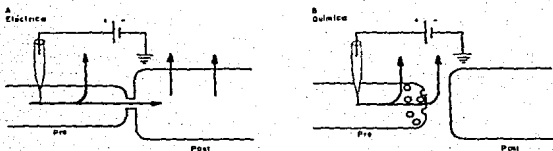


FIGURA 1A. Esquema de las sinapsis eléctrica y sinapsis química.

Antecedentes:

La serotonina (5-HT):

La serotonina inicialmente se extrajo de la sangre coagulada como una sustancia vasoconstrictora y se le llamo vasotonina, más adelante se dedujo que era la 5-Hidroxitriptamina (5-HT). En forma independiente se aisló un factor principalmente estimulante del intestino al que se llamo enteramina. Posteriormente Ersparmer dedujo que era una alquilamina indólica con lo que se identificó a este factor como 5-HT.

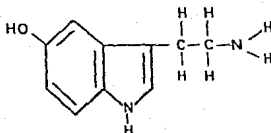
La 5-HT esta ampliamente distribuida en la naturaleza y tiene propiedades histoquímicas características de las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal y otros tejidos.

El descubrimiento de que la amina estaba en el cerebro, aumento el interes en el estudio de la 5-HT, haciendo deducciones sobre su posible función como neurotransmisor (21,64).

Actualmente se sabe que la serotonina (5-HT) es un neurotransmisor que se encuentra en el sistema nervioso de los mamíferos. Esta más concentrado en las células cromafines de la mucosa intestinal en donde produce contracción de los elementos musculares lisos (21,64) a nivel periférico y en las células de los núcleos del rafe del tallo cerebral a nivel central. Es un compuesto de naturaleza indólica y se ha postulado que podría ser el responsable de algunas de las enfermedades mentales, por anomalía en su síntesis química, degradación y/o transporte.

Estructura química: La 5-hidroxitriptamina (5-HT) cuya estructura química es 3-(β -aminoetil)-5-hidroxiindol (figura 2), esta muy relacionada con la estructura química de los alcaloides indólicos que producen comunmente alucinaciones y alteraciones de tipo psiquiátrico en

el hombre.



5-Hidroxitriptomino (5-HT)

Figura 2. Fórmula desarrollada de la 5-Hidroxitriptamina (5-HT).

En años recientes, la 5-HT ha sido muy estudiada debido a la hipótesis en la cual se le relaciona como agente causal en algunos procesos mentales, ya que su presencia en el cerebro y estados esquizofrenicomiméticos que sobrevienen cuando se perturba su concentración normal sugieren que juega un importante papel en el establecimiento de un estado estable en la actividad mental.

La 5-HT se haya distribuida de manera diferencial en el cerebro, encontrándose en mayor concentración en el mesencéfalo (Me), hipotálamo (Ht), hipocampo (Hc), amígdala (A), glándula pineal (gp), estriado (E), corteza cerebral (Cx) y cerebelo (Ce). La 5-HT es concentrada por las neuronas triptaminérgicas (neuronas que sintetizan 5-HT) que están presentes en el SNC de los animales superiores. En los mamíferos se ha podido localizar tanto su distribución como las prolongaciones de las neuronas que poseen 5-HT, por métodos fluorométricos, cromatográficos, radioinmunoenzimáticos, etc (21). Por medio de estos métodos, se descubrió que la mayor parte de este tipo de neuronas se hallan en los núcleos del rafe y de ahí se distribuyen a las demás regiones por

ramificaciones y prolongaciones neuronales. Las neuronas y terminales pueden captar triptófano (Trp) y poseen el sistema enzimático para producir la indolamina. También tienen un mecanismo altamente selectivo de captación de la 5-HT por las vesículas de almacenamiento. El hecho de que exista una función triptaminérgica quiere decir que la 5-HT liberada actúa como neurotransmisor, lo cual se ha identificado en invertebrados, siendo más difícil esto, en mamíferos; sin embargo, se ha demostrado esta función en algunas neuronas de ciertas regiones como el núcleo supraquiasmático y del cuerpo geniculado ventrolateral del tálamo, que presentan gran número de terminaciones serotoninérgicas y que la 5-HT tiene funciones excitatorias e inhibitorias en el cerebro de los mamíferos.

Existen estudios que indican que las neuronas serotoninérgicas del rafe pueden modular varios estímulos como: el auditivo, visual, olfativo, conducta, sueño, conducta sexual, actividad motora, estado de ánimo, control neuroendocrino y regulación de la temperatura corporal (64).

La 5-HT tiene diversas actividades farmacológicas en los sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo y SNC; pudiendo producir al actuar en el músculo liso vascular, vasodilatación o vasoconstricción, puede producir un aumento en la presión arterial y estimular la actividad motora del intestino delgado.

Biosíntesis:

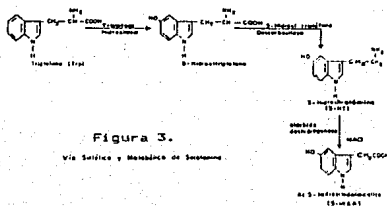
La 5-Hidroxitriptamina se encuentra en muchas células no neurales, como son las plaquetas, células cebadas, células enterocromafines y solo del 1 al 2% de la 5-HT corporal esta en el cerebro. La 5-HT no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que las células cerebrales deben sintetizarla. El primer paso importante en la biosíntesis es la captación del aminoácido triptófano (Trp) a partir de los alimentos, su entrada se debe a un proceso activo de captación que puede ser bloqueado competitivamente por otros aminoácidos (aa), como fenilalanina (Phe) y por lo tanto inhibir la síntesis de la serotonina cerebral. El Trp plasmático tiene una variación rítmica diaria que influye en la síntesis de la serotonina cerebral. La ruta biosintética es la siguiente: Hidroxilación del Trp en la posición 5 por la hidroxilasa del Trp, que requiere como cofactor tetrahidroxipterina, para dar el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), que se encuentra en menor concentración y por lo tanto es difícil de aislar para su estudio. La acción de la hidroxilasa del Trp es el paso limitante de la biosíntesis de la serotonina en las neuronas (figura 3). Después el 5-HTP se descarboxila por acción de la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para dar la 5-HT.

Tanto la secuencia sintética como la catabólica de la 5-HT son cortas y al parecer la enzima limitante de todo el metabolismo es la triptófano hidroxilasa, ya que cuando dicha enzima sufre alguna inhibición disminuye rápidamente la cantidad de serotonina cerebral entre 75-80%, mientras que al inhibir la 5-HTP descarboxilasa no se ven modificados los niveles serotoninérgicos cerebrales. El paso limitante se ve también influenciado por el oxígeno.

El primer paso en la síntesis de la serotonina se ha estudiado en

animales y en humanos tratados con medicamentos psicoactivos que afectan el sistema serotoninérgico. En las ratas a las que se les inyecta intraperitonealmente (ip) para-clorofenilalanina (p-CPA) (2) 300mg/Kg, un inhibidor que compite con el aa precursor y se une irreversiblemente a la enzima, disminuye un 70% la concentración de la serotonina cerebral, mostrando una recuperación del 20% a los tres días y una recuperación completa a las dos semanas por la síntesis de nuevas moléculas de la enzima paso limitante (hidroxilasa del Trp) (64,10).

Los cambios agudos producidos por medicamentos se equilibran por retroalimentación positiva interna que regula la síntesis, de esta manera, si un medicamento reduce la actividad enzimática, las células nerviosas pueden responder aumentando la síntesis y/o transporte de mayor cantidad de neurotransmisor en las terminales nerviosas.



Localización de la 5-HT:

Los datos más antiguos de la literatura indicaban que la 5-HT era un posible neurotransmisor, pero tuvo que pasar el tiempo para establecer con seguridad que estaba contenida en los circuitos neuronales específicos. Aplicando diversas técnicas como fluorescencia, inmunohistoquímica y cromatografía se logró establecer que áreas contienen a la 5-HT.

Actualmente se sabe que las neuronas serotoninérgicas están limitadas a grupos celulares que se localizan en la línea media, en los núcleos del rafe, en el tallo cerebral, y de ahí se dan inervaciones a estructuras tales como la médula, puente, metencefalo, área postrema, el locus coeruleus caudal, núcleo intrapeduncular, el diencefalo, el tálamo, epitálamo, subtálamo, telencefalo, ganglios basales, materia gris de los hemisferios y a la corteza cerebral (21).

A partir de los datos bioquímicos y morfológicos se sabe que la 5-HT cerebral no solo se encuentra dentro de las células nerviosas, sino que también es los tractos específicos de las proyecciones de dichas células.

Los efectos celulares de la aplicación microiontóforética de 5-HT sobre células con actividad eléctrica espontánea indican que hay una disminución de la descarga, mientras que en otras regiones produce una activación en la descarga ya que hay una combinación de despolarización y aumento en la resistencia de la membrana lo que facilita la respuesta neuronal excitatoria (21).

Las neuronas serotoninérgicas que se hallan en los núcleos del rafe, se dividen dentro del SNC en la vía serotoninérgica ascendente y descendente. La vía descendente se origina en la médula oblongada y

termina en la médula espinal incluyendo tanto las vías noradrenérgicas como serotoninérgicas que se originan en los núcleos medulares del rafe descendiendo por los funículos hasta terminar en la médula espinal.

La vía ascendente surge en las células de los núcleos del rafe (puente y porción baja del mesencefalo), y los axones de esta zona forman la vía, a través del tallo cerebral y cerebro para terminar en el hipotálamo (Ht), núcleos septales, cuerpo amigdaloides, corteza cerebral (Cx), teniendo una elevada concentración de 5-HT. las neuronas ascendentes surgen principalmente de los núcleos rostrales y del cilindro eje descendente de los núcleos caudales del rafe.

En el sistema nervioso periférico (SNP), los nervios triptaminérgicos se distribuyen en los órganos efectores y vísceras que no son colinérgicas, ni adrenérgicas, siendo entonces triptaminérgicas (secretan 5-HT).

Tabla 1:

NEURONAS SEROTONINÉRGICAS DE GRUPOS CELULARES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.

GRUPO CELULAR	% DE NEURONAS - SEROTONINÉRGICAS EN EL GRUPO CELULAR.
Núcleo pálido del Rafe	25 - 50%
Núcleo oscuro del Rafe	30 - 40%
Núcleo celular paraganglionar lateral y adyacente al tegmentum	10 - 30%
Núcleo nucleus del Rafe	
Núcleo pontino del Rafe	10 - 30%
Núcleo Central Superior	20 - 30%
Núcleo Dorsal del Rafe	25 - 50%
Núcleo tegmental reticular pontino y tegmentum adyacente	10 - 20%

Almacenamiento:

La 5-HT se almacena en las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas y se libera por exocitosis, pudiéndose sintetizar dentro y fuera de las vesículas (21). El exceso de 5-HT en el citoplasma es transformado por la MAO mitocondrial en 5-HIAA que es el principal metabolito urinario de la 5-HT, saliendo así al medio extracelular y a la sangre permitiendo medir la tasa metabólica de la 5-hidroxitriptamina a través de los niveles del metabolito 5-HIAA en la sangre y orina (21). También se almacena en las plaquetas y su liberación es mediada por la trombina que induce la secreción de 5-HT, ATP y cationes debido a la fusión de las vesículas con la membrana plasmática por exocitosis. La 5-HT se conjuga como el complejo no difusible a nucleótidos de adenina y cationes divalentes. En las vesículas se libera por acción del fármaco reserpina.

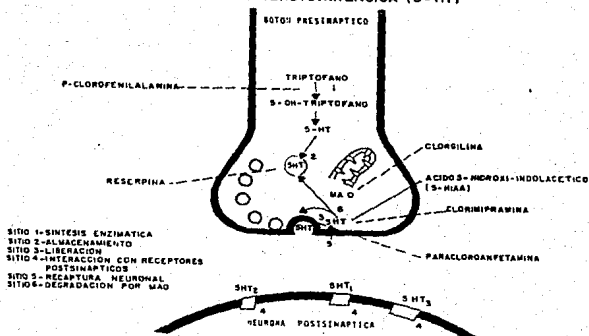
Liberación:

La secreción de los transmisores sinápticos refleja la actividad neuronal inducida por la despolarización de la terminación nerviosa (21).

Los conocimientos actuales sobre el mecanismo de liberación de neurotransmisores sugiere que es necesaria la conductancia del calcio (Ca^{2+}) (16) sensible al voltaje para la secreción del transmisor. Para que los neurotransmisores sean liberados de las vesículas en las terminaciones nerviosas, y se presente el acoplamiento excitación-secreción, se requiere de la entrada de Ca^{2+} a la terminal nerviosa despolarizada por un potencial de acción, para que se de la secreción del contenido vesicular al espacio sináptico. (ver figura 1) (16). la liberación requiere simultáneamente de la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática sináptica. En ocasiones la liberación del neurotransmisor se modula presinápticamente por acción de los autoreceptores o debido al efecto de los transmisores liberados por las vesículas neuronales adyacentes.

Figura 4.

SINAPSIS SEROTONINERGICA (5-HT)



Recaptura y metabolismo:

Los sistemas de captación específica de este neurotransmisor son dependientes de energía y de sodio (Na^+).

La ruta catabólica más importante de la 5-HT es a través de la desaminación oxidativa mediante la acción de la monoaminooxidasa (MAO), la cual transforma esta indolamina en ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) o se puede reducir, en un segundo paso a 5-hidroxitriptófól a través de la deshidrogenasa alcohólica aunque esta vía catabólica es menos importante.

En cuanto al catabolismo en sí, puede ser bloqueado por acción de los inhibidores de la MAO como la clorgilina. La concentración cerebral de serotonina, aumenta en forma lineal hasta tres veces más de lo normal con el uso de estos fármacos.

La liberación del 5-HIAA en el cerebro es bloqueado por probenecid, en este caso, las concentraciones de 5-HIAA también se incrementan de manera lineal por largo tiempo sin alterarse los niveles de 5-HT, lo que indica que los primeros pasos de la síntesis no se alteran por la presencia de ninguno de los metabolitos subsiguientes. La enzima paso limitante no es saturable por su sustrato, su síntesis IN VIVO depende de la concentración del aa precursor (triptófano).

Receptores:

El concepto de receptor originalmente fue propuesto por Langley en 1905, basado en observaciones de la potencia y efectividad de las sustancias que semejaban una respuesta de tipo biológico. Con el avance científico este concepto fue apoyado y actualmente se postula que existen moléculas receptoras proteínicas para cada tipo de neurotransmisor y otras sustancias de importancia biológica. Los medicamentos ejercen su acción debido a la interacción con estos receptores.

Para que cada molécula se considere receptor debe de tener propiedades de selectividad de unión, sin que exista relación lineal entre el receptor y su posible respuesta biológica. Pueden estudiarse de varias maneras, pero es necesario su aislamiento para identificarlos y caracterizarlos. Deben de cumplir con las siguientes características: a) saturabilidad, b) especificidad y c) reversibilidad.

a) La mayoría de los receptores se localizan en la superficie celular, en un número determinado y por tanto saturable. La unión específica de los receptores se caracteriza por una gran afinidad y baja capacidad, mientras que la unión no específica no es saturable.

b) Se requiere unión estereoespecífica para que haya interacción.

c) Debido a que la mayor parte de las sustancias actúan de manera reversible, se deduce que su acción sobre los receptores también lo es, regresando a su forma original después de la interacción.

Clark propuso el modelo de la teoría ocupacional simple: la respuesta de un medicamento es directamente proporcional a la fracción de receptor ocupado por el, variando el patrón gráfico de la respuesta, con receptores sobrantes; al estudiar la actividad intrínseca de varias

sustancias (agonistas totales o parciales) se ve que no hay una relación tan directa entre la afinidad y la unión, presentandose problemas de desensibilización que se explican por el alosterismo, ya que el receptor puede estar en dos formas: activa o inactiva. También existen factores de cooperatividad, que es la influencia a favor o en contra de la fijación al ligando, además hay que considerar la naturaleza química del receptor, su peso molecular, su localización, su constante de equilibrio, peso molecular de sus subunidades, número de sitios de unión por célula y fluidez del medio, entre otros.

Receptores para serotonina:

Actualmente los receptores de la 5-HT se dividen en tres categorías que son 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, los de tipo 5-HT1 y 5-HT3 a su vez se subdividen en A, B y C.

Los receptores 5-HT1A se localizaron en los nervios entéricos del cobayo, núcleos del rafe dorsal de la rata, arteria basilar del perro. Tienen función inhibitoria y de contracción, sus agonistas selectivos son el 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OHDPAT) y la 5-carboximidatriptamina, mientras que los antagonistas son la metiotepina y la espiperona, la cual también tiene alta afinidad por los receptores 5-HT2 y los receptores a dopamina (D2), alfa adrenoreceptores (48).

Los receptores 5-HTB1 se localizaron en la corteza cerebral de la rata, nervio simpático de la rata y perro, vena safena del perro. Tienen función neuronal inhibitoria y de contracción, se conocen los mismos agonistas y antagonistas que en el tipo anterior de receptores.

El 5-HT1C se encuentra localizado en el fondo del estómago de la rata y en el plexo coroideo del humano, cerdo y rata, tiene función contractil y tienen los mismos agonistas y antagonistas que los receptores 5-HT2 que se localizaron en las plaquetas del conejo, humano, utero de la rata, ileum del cobayo, cerebro del humano, rata y gato, en la aorta del conejo. Tienen función contractil y despolarizante de las neuronas, agregación plaquetaria, sus agonistas son (+)-5-alfa-metil-5-HT, el antagonista mas selectivo es la ketanserina que también tiene afinidad por los receptores de histamina, así como sulgerina y metiotepina que tienen afinidad por alfa adrenoreceptores.

Los receptores 5-HT3A se localizaron en el nervio vago de la rata,

conejo, nodo ganglionar del conejo y ganglio cervical superior del conejo y gato, nervios sensitivos del humano, rata y conejo. Los receptores 5-HT_{2B} se encuentran en los nervios simpáticos y parasimpáticos del conejo, mientras que los receptores 5-HT_{2C} están localizados en los nervios entéricos del cobayo. Todos tiene función neuronal despolarizante, su agonista selectivo es la 2-metilserotonina y sus antagonistas son el ICS 205-930 que es un análogo de la serotonina, la cocaína y el compuesto MDL 72222 (59).

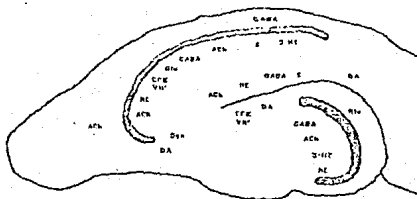


Figura 5. Localización gruesa de algunos neurotransmisores en el Hci
 ACh=acetil colina, GABA=ácido gamma amino butírico, NE=norepinefrina,
 CCK=colecistiquina, 5-HT=serotonina, Glu=glutamato,
 Dyn=dinorfina, DA=dopamina.

Hipocampo:

El hipocampo (Hc) es una estructura del SNC que ofrece gran ventaja para el estudio neuroquímico de los problemas de la neurotransmisión, ya que integra varias aferencias químicas específicas de serotonina, provenientes principalmente de los núcleos del rafe, que pasan por el área dentada, amígdala y corteza entorrinal, para terminar en las capas CA1 y CA3 (ver figura 6) del hipocampo (6).

De acuerdo con algunos autores esta vía ejerce acción inhibitoria directa sobre el hipocampo (Hc) (70) estas estructuras y el área dentada tienen una citología característica en capas, conteniendo además vías aferentes y numerosas dendritas (73). El Hc presenta tres regiones diferentes: giro dentado, asta de Amón (CA1-CA5) y el subículum, que reciben impulsos de la corteza entorrinal, región septal, cíngulo y núcleos mesencefálicos del rafe medial (NRM) (41) (ver figura 6).

Las lesiones de los NRM se han reportado que inducen un aumento en la población de receptores adrenérgicos, sin afectar su concentración o densidad neuronal (50); lo que sugiere que la 5-HT tiene una acción moduladora sobre el sistema adrenérgico del Hc (20).

En relación a las vías eferentes del Hc se ha visto que la estimulación en el Hc produce una respuesta excitatoria en el hipotálamo, pudiendo afectar otras áreas como la perifornical, estria terminalis, núcleo vasomedial amigdalino y sistema ventroamigdalofugal (10). Existen reportes de que las postdescargas originadas en el Hc dorsal, solo se propagan a nivel del mismo Hc y con un ligero aumento en el metabolismo del septum, mientras que las postdescargas del Hc ventral se distribuyen en las áreas antes ya mencionadas, siendo interesante el hecho de que la

lesión del fornix y estria terminal eliminan por completo la influencia hipocampal a excepción del pequeño aumento metabólico en el área preóptica. Otro importante neurotransmisor además de la 5-HT en el Hc es el ácido gamma amino butírico (GABA) que posee una acción inhibitoria en las sinapsis axónicas (4) y axodendríticas (3,60). El GABA en el Hc se localiza principalmente en CA1 y CA3, área dentada (ver figura 7), mientras que la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), enzima marcadora de las células GABA-érgicas se encuentra en la capa de células piramidales (66). El GABA en el Hc representa un sistema local, ya que no hay evidencia de que provenga de ninguna aferencia (24), algunos de estos estudios del GABA se han realizado mediante la aplicación del ácido kaínico (KA), el cual disminuye hasta un 76% y 49% los niveles de GAD y GABA respectivamente, en estudios en rebanadas de Hc (31,63).

El Hc es una estructura que constituye el llamado sistema límbico (26), pero presenta un problema para su estudio por su profundidad anatómica. En cuanto a la anatomía humana el término de sistema límbico se emplea para englobar: giro hipocampal, que se encuentra en el área ventral y medial del lóbulo temporal, tejido neuronal de diversa naturaleza y el término de hipocampo que se refiere a las estructuras laminares de la formación hipocampal, el Hc está señalado por una densa capa de células piramidales y el área dentada por una densa banda de células piramidales pequeñas y células granulares diferenciables histológicamente por medio de la tinción de Nissl.

En el diagrama del corte horizontal del hemisferio derecho se aprecian el Hc, giro dentado y las diferentes regiones celulares que lo forman, notándose que en la superficie exterior de la neocorteza alrededor de la fisura hipocampal, hasta alcanzar el complejo fornix-fimbria así el borde

más a la derecha del Hc y giro dentado representan los aspectos de la estructura medial del diencefalo o cerebro dependiendo del nivel de la sección (figura 6).

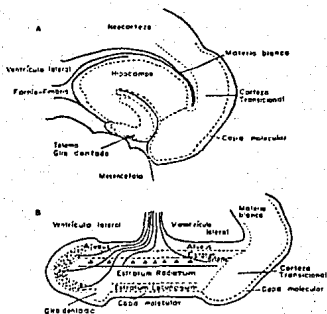


Figure 6. A) Vista horizontal de una sección de la formación hipocámpal, del hemisferio derecho del cerebro de la rata.

B) Esquema de las capas que constituyen la formación hipocámpal.

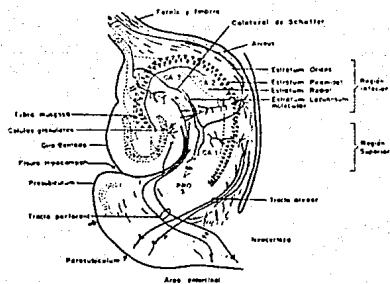
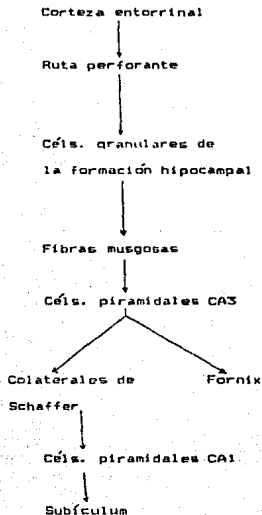


Figura 7. Esquema descendente de las divisiones y campos que constituyen al Hipocampo (Hc).

El término de Hc dorsal se refiere al Hc subcalloso dorsal de los mamíferos y el Hc supracallosal dorsal a la materia gris y estrias longitudinales. La organización del Hc según la descripción de Andersen es la que sigue:



En los cortes transversales del Hc (ver figuras 6 y 7) se aprecian las diversas capas celulares que se superponen e interconectan entre sí. A través del estudio de rebanadas de Hc (63) se puede tener una idea acerca de las sinapsis excitatorias (Glu), inhibitorias (GABA), además de varios neurotransmisores o neuromoduladores del tipo de las aminas, como 5-HT y los péptidos como las encefalinas.

La organización de las neuronas hipocámpales es muy sencilla facilitando su estudio. Sus principales actividades están gobernadas por la participación de sus elementos: células piramidales, granulares, interneuronas y fibras musgosas. Las fibras aferentes corren paralelamente a la superficie cortical y se entrecruzan a nivel del axis dendrítico (figura 6).

La formación hipocámpal consiste en una serie de largas fibras en forma de bandas adjuntas y protegidas a lo largo del axis, cuyo papel es enviar axones, por ejem. las células granulares envían sus axones entre las fibras musgosas que terminan en la capa CA3 piramidal, cambiando la orientación de las fibras a lo largo del axis del Hc debido a la existencia de varias regiones: área entorrinal, fascia dentada, región CA3, CA1 y subículo que se interconectan por medio de una serie de neuronas de la lamella. En las ratas y los ratones el plano de la lamella es transversal a lo largo del axis hipocámpal, mientras que en otras especies la orientación es diferente, estando las células arregladas y estrechamente relacionadas con los cuerpos celulares de las aferencias específicas, permitiendo el estudio selectivo de las sinapsis dendríticas.

La subdivisión de la formación hipocámpal incluye el giro dentado y áreas corticales adyacentes al Hc; esta formación es una larga

prominencia en el ventrículo lateral, terminando en el área septal, (línea imaginaria entre el axis septotemporal en los roedores), quedando cerca del ángulo derecho de la orientación del corte a nivel rostral-caudal del cerebro de la parte septal a la dorsal; se han encontrado diferencias neuroquímicas entre las regiones ventral y dorsal (Gape, Armstrong y Thompson, 1980) siendo probable la existencia de una unidad funcional al llegar al axis septotemporal, cruzando la lamella (Lomo 1971; Andersen, Bland, Dudar 1973). Según los anatomistas del Hc esta estructura esta dividida en campos asignados con las siglas CA1 a 4, el giro inferior es CA3, la pequeña región entre CA1 y CA3 es CA2, mientras que la región transitoria entre el Hc y giro dentado es CA4.

Aferencias y eferencias del Hc:

Se conocen dos vías mayores que llegan al Hc, 1) a través de las regiones corticales transitorias, 2) sobre el sistema fornix-fimbria.

Las rutas transicionales de la corteza, basicamente en el sistema mayoritario de la corteza entorrinal y de ahí a la formación hipocampal llegando al área dentada en forma gradual y distribuyendose en los campos CA1, CA2 y CA3 del Hc. Las regiones CA2 y CA3 proyectan a CA1 y subículum, mientras que el campo CA1 proyecta también al subículum, corteza entorrinal, y las células de la capa CA4 proyectan al giro dentado. Debido a esto, se piensa que las células de las áreas CA1, CA2 y CA3 tienen proyecciones celulares al subículum y áreas transicionales de la corteza, siendo de mayor importancia ya que estan fuera de la formación hipocampal y diencefalo, siendo proyecciones fuertes y paralelas a las intrahipocampales cruzandose con las proyecciones comisurales del Hc y giro dentado en el lado contralateral del cerebro (19) (ver figura 7).

La formación hipocampal contiene más componenetes relacionados directamente con las áreas corticales (lobulos frontal, parietal, occipital), las cuales estan relacionadas con la actividad intelectual. La región parahipocampal recibe directamente aferencias de la formación hipocampal que asciende del subículum y estan asociadas con las sinapsis de otras regiones. Otras fibras se proyectan a la amígdala (núcleo medibasal) y la corteza cingulate, todas estas interconexiones son evidencia de la reciprocidad de las aferencias del Hc y algunas regiones subiculares que representan vías hipocampales de paso, desde el área entorrinal se proveen en forma masiva conexiones a la región subicular habiendo evidencias de que las eferencias hipocampales continúan por los núcleos talámicos, bandas diagonales de Broca, región amigdalohipocampal,

formación hipocampal, lo cual se encontro en estudios realizados con ratas y monos ardilla (72), un especial interes por las aferencias celulares que contienen monoaminas en el sistema cerebral permitio en gran medida su conocimiento, por ejem. las aferencias del núcleo locus coeruleus llegan al Hc a traves del haz del cíngulum y partes dorsales del sistema fornix, sin llegar hasta el giro dentado. Los núcleos del rafe proyectan al Hc a traves de las rutas usadas por las fibras del locus coeruleus y fimbria hasta alcanzar al Hc dorsal y ventral (61) (ver figura 6).

Capas que constituyen al Hc:

Frecuentemente se ha presentado al Hc y giro dentado como estructuras de tipo primitivo por tener pocas capas celulares que sean de neocorteza, ya que según Ramón y Cajal existen 7 capas estructurales las cuales tienen gran similitud con las regiones corticales cerebrales incluyendo la neocorteza y las capas son: 1) Estrato molecular: es la zona más externa del Hc y giro dentado, conteniendo varias fibras nerviosas que probablemente son prolongaciones dendríticas de células piramidales o de otras fibras, son axones que penetran al Hc desde el subículum y algunas otras células ascienden paralelamente a las fibras en dirección de la capa molecular.

2) Estrato lagunoso: consiste en algunos espacios celulares irregulares a lo largo de las fibras con grandes haces localizadas paralelamente a este estrato, algunas ascienden del lado inferior del Hc y alcanzan el subículum, algunas de estas fibras son colaterales de las células piramidales; otras fibras no tienen un origen tan claro ya que entran a este estrato desde la materia blanca del alveus por la parte inferior y evitando las capas celulares piramidales y del estrato lagunoso.

3) Estrato radial: está apoyado en el estrato celular anterior y por debajo de la capa celular piramidal, Ramón y Cajal sugirió que las capas de estos 3 primeros estratos son similares y comparables con los de la capa externa de la neocorteza.

4) Capa piramidal: las largas capas de células piramidales del Hc están localizadas debajo del estrato radial, que forma un conglomerado celular cerrado en algunas especies de animales, pudiendo estar muy juntas a otras capas celulares, Ramón y Cajal considero la sugerencia de Schaffer

de la existencia de diversas capas piramidales de la neocorteza, que son diferentes a las capas de los estratos radial y oriens, que se unen en una sola capa en el Hc; lo cual es útil para diferenciar entre estos dos tipos de células piramidales del Hc y neocorteza, ya que en el Hc estas células presentan ramificaciones que se extienden hacia la superficie del estrato molecular y algunas regiones del alveus, por lo que frecuentemente a las células piramidales del Hc se los llama células piramidales dobles. Las células piramidales de la neocorteza están delimitadas por largas prolongaciones dendríticas apicales que ascienden extendiéndose alrededor de la base de las células dendríticas basales, los axones de las células piramidales descienden hacia el alveus formando ramificaciones colaterales a lo largo del trayecto, algunas fibras alcanzan el alveus y siguen hacia adelante del fornix para llegar al área septal y a otras regiones bifurcándose los axones en el alveus, habiendo varios tipos de fibras colaterales que ascienden o descienden en las diferentes capas de la región adyacente al Hc y giro dentado, constituyendo una densa capa celular que desciende al estrato oriens, mientras que las otras continúan hasta hacer contacto con las células del área hipocampal, giro dentado, área entorrinal, complejo subicular, complejo septal lateral del cerebro (Swanson, Sawchenko y Cowan, 1980); estas largas fibras mielinizadas fueron descritas por Karl Schaffer.

5) Estrato oriens: se encuentra abajo de las células piramidales y arriba de la materia blanca del alveus, habiendo células parecidas a las de las capas profundas de la neocorteza, las células de esta región se localizan

principalmente en forma paralela y subyacente a las fibras de alveus, con axones hacia la capa de células piramidales, pudiendo alcanzar la capa molecular.

6) Alveus: esta compuesto de materia blanca. axones que suben a las células piramidales profundas del Hc y otras regiones; son células polimórficas que se desplazan a través del estrato oriens.

7) Zona epitelial: El Hc esta apoyado internamente por la capa de células epiteliales del ventrículo lateral y separado por la capa de células epiteliales que forman parte de la organización neuronal del Hc y segun la edad de los animales se puede terminar en el estrato oriens en los animales juvenes y en el alveus en los animales viejos.

Epilepsia:

Así se denomina a una serie de trastornos Neurológicos crónicos, intermitentes del sistema nervioso, caracterizados por episodios súbitos e involuntarios de crisis breves con pérdida o alteración de la conciencia acompañado en ocasiones de convulsiones (sacudidas corporales), salivación fluida y abundante, trastornos de la sensibilidad, delirios, palidez, dificultad en la respiración, con duración de unos minutos después de lo cual el paciente recobra la conciencia, pudiendo quedar en estado de estupor y sin recordar nada de lo ocurrido. Existen muchas teorías que tienden a explicar la etiología de los diferentes patrones de crisis convulsivas.

Las crisis epilépticas son un evento fisiopatológico debido a descargas eléctricas bruscas, excesivas y desordenadas de las neuronas. el funcionamiento normal del cerebro depende del balance entre los sistemas inhibitorio y excitatorio, en la epilepsia se postula que hay un estado de desequilibrio entre estos 2 sistemas.

La palabra epilepsia quiere decir "ataque" y engloba una diversidad de afecciones cerebrales que originan varios tipos de crisis que son clasificadas de acuerdo a investigaciones neurofisiológicas; registros electroencefalográficos (EEG) y manifestaciones clínicas como ataques de ausencia (pequeño mal), espasmos mioclónicos, crisis parciales simples o complejas (del lóbulo temporal, psicomotoras). Esta enfermedad puede aparecer a cualquier edad y se debe a diversas causas como infecciones, complicaciones durante el embarazo, tumores, traumatismos, falta de oxígeno al nacer (hipoxia), alteraciones metabólicas, cisticercosis, intoxicaciones alcohólicas. las convulsiones se pueden definir como la pérdida del control en la excitabilidad cerebral, resultando la

producción de contracciones musculares involuntarias (45). también se llegan a presentar cuadros epilépticos por deficiencia de piridoxina (vitamina B6) ya que bajo estas condiciones no hay suficiente piridoxal fosfato para mantener la actividad normal de la GAD en las terminales nerviosas inhibitorias, provocando una disminución en el GABA sintetizado y liberado en el espacio interalnáptico, descontrolando algunos circuitos neuronales generalizándose las convulsiones.

A menudo las crisis epilépticas son provocadas por lesiones cerebrales localizadas o difusas que invariablemente generan una activación paroxística de millones de neuronas que forman un foco epileptógeno, produciendo una actividad eléctrica explosiva que altera el funcionamiento normal del cerebro, lo cual es posible medir mediante el EEG. En ocasiones, para que se dispare la crisis es necesario un estímulo desencadenante como sobreexcitación nerviosa, fatiga, estímulos luminosos o sonoros intermitentes, y otro tipo de factores denominados contribuyentes como: el nivel sanguíneo de azúcar, presión osmótica, pH del plasma, composición electrolítica del líquido extracelular.

De manera general las crisis convulsivas se pueden dividir en dos grandes grupos: a) crisis generalizadas (gran mal), b) crisis parciales simples o complejas. a) implican la pérdida de la conciencia, movimiento en todo el cuerpo y actividad eléctrica del cerebro en ambos hemisferios afectando la sensibilidad.

Gibbs en 1950 propuso que las crisis generalizadas se iniciaban a nivel de la corteza de los hemisferios, lo cual según Jean Bancaud reproduce parcialmente los síntomas iniciales de una crisis general pero con una zona epileptogénica bien definida a nivel de los lóbulos de los 2

hemisferios siendo esta la principal diferencia entre estos dos tipos de crisis ya que ambos se generan a nivel de la Cx (7).

b) Afecta una sola parte del cuerpo y tiene la actividad eléctrica limitada a un hemisferio, afectando funciones psicológicas complejas (aprendizaje, afectividad, imaginación). Los fármacos anticonvulsivantes como: benzodiazepinas, ácido valproico, barbitúricos y fenitoínas producen un aumento en la inhibición mediada por GABA.

Modelos experimentales de epilepsia:

Debido a la imposibilidad de estudiar la epilepsia en humanos se han desarrollado modelos experimentales de epilepsia, empleando generalmente mamíferos ya que estos presentan cambios eléctricos y conductuales parecidos a la epilepsia humana, permitiendo estudiar los mecanismos neuronales relacionados con la regulación de la excitabilidad en el SNC y de la actividad motora, mecanismo de control y regulación de las crisis epilépticas, así como ensayos terapéuticos de fármacos anticonvulsivantes.

Los modelos experimentales se dividen en dos grandes grupos, dependiendo del procedimiento de inducción, mecanismos neuronales involucrados y manifestaciones conductuales. En estos modelos epilépticos experimentales la inducción puede ser física: afectando receptores sensoriales y áreas encefálicas, químicas: por aplicación tópica directamente en la Cx de sustancias irritantes como penicilina, crema de alúmina, cobalto, que producen crisis convulsivas espontáneas de inicio focal y crónicamente recurrente. Sin embargo además del "foco primario" de neuronas que descargan sincrónicamente a altas frecuencias, se hallan otros "focos secundarios" independientes que pueden ser encontrados en las áreas ricamente inervadas por fibras nerviosas aferentes del sitio de lesión primaria, debido al efecto de la picrotoxina, administración intraventricular (K⁺, ouabaina), administración intracisternal (rojo de ruténio) o administración sistémica (pentilentetrazol, bicuculina, ácido kaínico), por carencia metabólica (piridoxina, Ca²⁺). En cuanto al mecanismo de génesis de las crisis se pueden proveer por interferencias en las sinapsis inhibitorias o excitatorias específicas

(bicuculina, estriquina) o alteraciones inespecíficas de la excitabilidad neuronal (electrochoque) y finalmente las manifestaciones conductuales sin o con manifestaciones motoras, debiendo considerar las características eléctricas de las crisis, crisis paroxísticas de la actividad motora, manifestaciones motoras focalizadas y/o generalizadas, si son crónicas o agudas, etc. Los 2 modelos son: a) Modelo experimental de epilepsia verdadera (alteraciones paroxísticas espontáneas y clínicas), b) modelos experimentales de crisis epileptiforme (crisis inducidas en forma aguda).

Inducción del proceso epileptico por administración sistémica de sustancias convulsivantes usadas comunmente en modelos epilepticos experimentales pudiendo emplear las vías intraperitoneal, intravenosa o subcutánea a una dosis convulsiva máxima o dosis efectiva cincuenta (DE50) según el estudio, esta administración sistémica permite su homogénea distribución en la red capilar sanguínea cerebral y es útil para estudios neuroquímicos, los animales empleados para estos estudios se hallan en condiciones de libre movimiento (sin anestesia) permitiendo una correlación entre la actividad motora y la actividad eléctrica neuronal (implantación de electrodos para registro bioeléctrico de las áreas de interes en el SNC).

El pentilentetrazol (metrazol) (2) es un convulsionante con un sitio de acción a nivel de la sinapsis excitatoria, se emplea por vía subcutánea (SC) o intravenosa (IV) a diferentes dosis, actúa en todo el SNC pero principalmente en regiones sensitivo motoras de la Cx (58), sin que el mecanismo de acción del pentilentetrazol este bien definido.

L-glutamato monosódico (GMS) presenta su efecto en 2 períodos: preconvulsivo y convulsivo, el primer período se caracteriza por somnolencia, hipersalivación, tremor espástico, actividad masticatoria, acicalamiento compulsivo, medios giros, giros completos, carreras vigorosas dependiendo de la dosis y el segundo se presenta 30' o 120'

después de la inyección de GMS. El estudio de los mecanismos neuronales se basa en que el L-Glu es un neurotransmisor excitatorio que se halla en el encéfalo, las alteraciones del metabolismo de los amino ácidos y L-Glu se han descrito en focos epilépticos, esta sustancia se emplea como saborizante en los alimentos (38).

Bicuculina: si se inyecta IV produce crisis convulsivas generalizadas con actividad mioclónica constante, su mecanismo de acción es por medio de la inhibición del GABA sobre las neuronas de la Cx e Hc, la bicuculina compite con el GABA por el receptor postsináptico y disminuye la despolarización de aferentes primarios provocando un decremento en la transmisión aferente (inhibición presináptica) (25). Es la sustancia convulsivante más empleada para inducir crisis convulsivas generalizadas debido a su alto efecto convulsionante a bajas dosis, se usa cuando se quieren manipular farmacológicamente las terminales GABA-érgicas en el SNC.

Estricnina: se emplea para inducir alteraciones paroxísticas (tónica o sistémicamente) es un potente y selectivo inhibidor de la glicina, además de tener propiedades inhibitorias en el SNC, su administración IV produce un estado preconvulsivo con un patrón EEG característico, compuesto por una rápida actividad de bajo voltaje que evoluciona al estado convulsivo con la aparición de espigas variables y crisis tónicas, desencadenándose con cualquier estímulo sensorial (1).

Rojo de rutenio (oxicloruro de rutenio amoniacal): Provoca actividad convulsiva por administración intracisternal en ratones o inyección intraventricular en gatos, debido a que el Hc e Ht son las áreas más afectadas sugiere que la participación cortical en la génesis de estas crisis es secundaria, actúa por inhibición de las sinapsis GABA-érgicas (47,68).

4-amino piridina (4-AP): es un estimulante del SNC que produce

convulsiones en los roedores incrementando la liberación de neurotransmisores IN VIVO e IN VITRO, tanto en sinapsis inhibitoria como excitatoria, debido a que bloquea canales de K^+ o a un efecto directo sobre la cinética de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (16). El patrón convulsivo puede considerarse de tipo tónico-clónico, que se inicia con una actividad tónica generalizada, acompañada de saltos, seguida de una convulsión tónico-clónica con hiperexcitación de extremidades y cuello que varía con la dosis (42,56).

En el presente trabajo se utilizó el modelo epiléptico experimental del ácido kaínico (KA) por administración sistémica.

El ácido kaínico (KA). Fig. 9

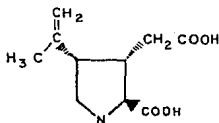


Figura 9. Fórmula desarrollada del ácido kaínico.

El ácido kaínico es un derivado de la pirrolidina, ya que posee la mitad de los ácidos carboxílicos y un isopropileno en la cadena lateral; se ha usado en medicina en preparaciones ascaricidas (22). Es una potente neurotoxina, análoga del (Glu), que se ha propuesto como un adecuado modelo para el estudio de las crisis convulsivas límbicas (54), ya que ejerce su acción excitatoria directamente sobre el IIc (57). Los signos clínicos de la administración sistémica a dosis bajas de KA en la rata son: sacudidas de perro mojado, movimientos faciales y masticatorios, salivación excesiva, afagia, pérdida de la postura, crisis convulsivas tónico-clónicas, anormalidad electroencefalográfica y conducta agresiva (11,40). A este síndrome se le llama de convulsiones límbicas motoras.

Las propiedades excitatorias del KA se derivan de la pirrolidina descrita por Shinokoki y Konishi en 1970 y que probablemente se relaciona con receptores de Glu (14,33), indicando que el kainato es incapaz de unirse a los sitios donde está unido el Glu, sin que esta unión preferencial sea exclusiva del cerebro.

Se ha descubierto que el KA induce alteraciones conductuales ya descritas, debido a que modifica la concentración de algunos neurotransmisores en el tejido cerebral de las ratas (37), que al ser tratadas con KA se hiperexcitan, volviéndose agresivas y perdiendo peso

entre el primer y cuarto día después de la inyección.

La citoneurotoxicidad del KA se puede medir a través del estatus epiléptico, observación conductual de los animales, determinaciones de tipo histológico, cromatográficas, fluorescentes, etc.

La administración de KA (10mg/Kg) que se prepara en buffer de fosfatos ajustando el pH a 7.3 para su administración ip induce convulsiones, tal vez por declinación en la concentración de GABA, mientras que la agresividad es debida al exceso de DA. En el control de la violencia tienen que ver los sistemas gabaérgico y serotoninérgico. La protección contra los cambios patológicos se obtiene por el tratamiento con drogas gabaérgicas (50).

Acción neurotóxica del KA:

Los efectos neurotóxicos del KA se han descrito de varias maneras mediante ionoforesis de la toxina en neuronas corticales de la rata. Hay hipótesis de que el KA puede actuar como agonista de su acción tóxica, debido a que se hallan involucrados varios sistemas de neurotransmisores en las estructuras de sistema límbico.

Estudios neurofisiológicos muestran que el Glu y otros aa están relacionados con la actividad neuronal del SNC, estableciendo que el daño neuronal se debe a la activación de la liberación del aa, sin estar relacionados con los efectos de la carga osmótica, las alteraciones neuropatológicas inducidas por el KA están localizadas en las dendritas y pericaria (14).

Los estudios de unión con ligandos usando KA marcado (KA-H3) han demostrado la especificidad, saturabilidad, y alta afinidad de unión a las membranas cerebrales, localizadas en las membranas sinápticas.

Mientras es menor la afinidad se encuentran distribuidos en mayor número de regiones del cerebro y al aumentar la afinidad se restringen los sitios de unión a ciertas regiones del encéfalo.

En la formación hipocampal (41), se han estudiado recientemente por autoradiografía estos sitios para ver la especificidad de unión al KA-H3. Estos estudios sugieren la existencia de una densa banda de receptores en las fibras musgosas y axones terminales del Hc. Cuando el KA se administra periféricamente es captado por sus receptores produciendo extensas lesiones en el cerebro de animales adultos, resultando un daño neuronal que involucra una gran área del sistema límbico (Hc, corteza piriforme, claustrum, insula, núcleo talámico). El primer intento para

producir lesión excitotóxica con KA fue inyectándolo en el cuerpo estriado para producir una lesión parecida a la patología de la enfermedad de Huntington (46). A través del análisis histológico se estableció que la lesión del KA se debe a la rápida degeneración intrínseca de las neuronas del estriado con picnosis nuclear, dispersión de la sustancia neuronal de Nissl a las 2 horas después de la inyección, la cual va disminuyendo al pasar el tiempo, los botones de las terminales nerviosas se rompen y degeneran.

Nadler demostró la preferencia y selectividad de la acción neurotóxica del KA sobre las células piramidales del Hc, después de la inyección intraventricular del KA (53).

Al estudiar las otras regiones cerebrales donde generalmente también se ejercen las acciones del KA por un mecanismo indirecto; las células granulares del giro dentado reciben inervación glutamatergica de la corteza entorrinal, y al lesionar estas proyecciones se protegen las células granulares del giro dentado de los efectos neurotóxicos del KA. Esto indica que la entrada glutamatergica es necesaria para la toxicidad del ácido kaínico. Cuando se inyecta periféricamente el KA ocasiona desordenes en los sistemas de captura produciendo las conductas características antes mencionadas en las ratas. Algunos autores (53) observaron un parecido entre la patología resultante de la administración intraventricular de KA y las lesiones del sistema límbico asociadas a la epilepsia del lóbulo temporal, ya que se produce daño en este sistema por acción del KA. Con la administración de algunos anticonvulsivantes como benzodiazepinas, barbitúricos, etc, se disminuyen los cambios conductuales, EEG, y neurotóxicos de la inyección sistémica o directa de KA.

La degeneración del sistema límbico se extiende desde el sitio de inyección hasta las estructuras cerebrales donde existen receptores al KA, principalmente en las células piramidales de CA3 en el Hc que son las neuronas más vulnerables (15).

Mecanismo de la neurotoxicidad (KA):

El mecanismo responsable del daño neuronal irreversible por la inyección de KA aun no esta claramente establecido, ya que la excitación neuronal por si sola es insuficiente para explicar la correlación que hay entre la potencia neurotóxica del kaínico y los efectos excitatorios, al comparar los efectos de sus análogos como el ibotenato, ácido quisquállico (AQ) y NMDA (45). La total depleción de fosfato de adenosina indica que hay una disminución de la actividad enzimática por aumento del consumo de la energía celular. La activación de receptores al KA combinado con Glu induce despolarización, aumentando los niveles intraneuronales de Ca^{2+} produciendo hiperosmoticidad en el interior de la neurona.

En el Hc, las lesiones observadas días después de la inyección intracisternal de ácido kaínico son mas intensas en las células piramidales y glandulares, mientras que en las zonas adyacentes el daño es menor, estando aparentemente normales las neuronas de la parte medial, lo cual se relaciona con la variación en el contenido de los neurotransmisores.

Berger estudio la protección parcial del cuerpo estriado por denervación de terminales de 5-HT, observando que habia una disminución de los efectos tóxicos del KA en esta estructura del cerebro de la rata, por disminución de la actividad serotoninérgica mostrando la existencia de una relación morfológica y neuroquímica similar a la que se produce en desordenes tales como la corea de Huntington.

Durante las crisis motoras límbicas y/o estatus epilépticos se observa una actividad paroxística en Hc (CA3), siendo aquí donde se presenta un menor umbral y una mayor vulnerabilidad (11,15), ya que el KA actua produciendo muerte celular en las zonas específicas del cerebro.

particularmente en las células piramidales de la región CA3 del Hc (16), sin daño histológicamente observable en otros tipos celulares de la misma estructura, como son las células granulares y piramidales en el Hc, correlacionando esta especificidad del daño con la gran cantidad de terminales Glu/Asp en la capa CA3 y de receptores al KA (17,18,19); por lo tanto el Hc es una importante estructura en la génesis de las crisis convulsivas límbicas. De los resultados anteriores se puede resumir acerca del mecanismo neurotóxico del KA: a)es mediado por receptores a Glu, b)requiere de aferencias excitatorias intactas por lo que se le atribuye un mecanismo indirecto adicional, la distribución anatómica de las lesiones causadas por KA se parecen a las de la inducción química espontánea, c)varios autores atribuyen la necrosis neuronal a la presencia de neurotransmisores y de otros factores metabólicos que contribuyen a la convulsión y necrosis, involucrando el influjo de Ca^{2+} (41), d)el mecanismo que causa destrucción y muerte neuronal se debe a la competencia del KA por receptores al Glu principalmente del propio giro dentado, fibras muscosas, neuronas piramidales, produciendo cambios conductuales característicos, ya mencionados.

Neurotransmisores del Hc y el ácido kaínico:

Tanto el ácido aspártico (Asp), como el ácido glutámico son importantes neurotransmisores en el SNC, principalmente en las sinapsis hipocámpales (figura 3) donde tienen una alta frecuencia de estimulación o tetanización, que evoca un potencial de larga duración que aumenta la eficiencia de la transmisión sináptica.

Hay algunas vías del Hc en las que se puede inducir un largo potencial de disparo, como son las colaterales Schaffer, fibras de la comisura y vía perforante.

El KA es una análogo del ácido glutámico y es una importante neurotoxina que estimula la liberación de Glu/Asp en el estriado y en la formación hipocámpal.

En la formación hipocámpal, por ejemplo, en la capa CA2 de células piramidales y células granulares hay menor resistencia al efecto neurotóxico que en las células CA4 y CA1 que a su vez son mas resistentes que las células piramidales de CA3 (ver figura 7).

El mecanismo exacto a través del cual el KA produce muerte neuronal aun no se ha caracterizado, las lesiones estudiadas indican que el efecto neurotóxico profuso del KA depende de la integridad de las fibras aferentes excitatorias, como de los receptores postsinápticos al kainato.

Los severos efectos neurotóxicos del ácido kaínico estan dados probablemente por la inducción excesiva de actividad epileptogénica en los circuitos neuronales excitatorios (12,39). En varios estudios recientes se reporta una excitación directa del KA sobre las neuronas postsinápticas (23,30). también se dice que la susceptibilidad de las células piramidales al KA aumenta con la edad, que existe una relativa resistencia de las células piramidales en desarrollo al efecto

neurotóxico del KA, que la intensidad y duración de la actividad convulsiva se correlaciona con la edad.

Ya que el mecanismo neurotóxico del KA aun no es muy claro Coyle en 1983 (22) postulo que el KA estimula los receptores postsinápticos excitatorios específicos para amino ácidos neurotransmisores, en suma al activar los receptores presinápticos se estimula la liberación de Glu/Asp dentro del botón sináptico. La citotoxicidad del KA implica muerte celular focal en el sitio de inyección, daño distal por actividad epileptiforme sostenida por vía excitatoria sin que se sepa el mecanismo celular preciso de acción; se cree que se debe a la presencia de sitios de reconocimiento postsinápticos para el ácido kaínico y/o amino ácidos excitadores. El aumento de la sensibilidad de las fibras musgosas se debe a la presencia de más receptores postsinápticos y al aumento de la liberación de transmisores excitadores, la destrucción de estas fibras musgosas reduce la neurotoxicidad en la capa CA3, tal vez debido a la pérdida de los sitios de unión al kaínico (23). Hay diversos factores que pueden desencadenar eventos de tipo epileptico en el Hc como son la disminución de la concentración de potasio (K^+), que afecta el metabolismo cerebral. Las diferentes cantidades de Asp y Glu en las terminales nerviosas se puede deber a cambios en su síntesis, cambios en la eficiencia del sistema de captura, modificación del número de células participantes en la captura (glia y células nerviosas), el número de receptores para cada uno de ellos.

Dihidroxitriptaminas:

Al iniciar el estudio de las triptaminas (5,6-DHT y 5,7-DHT), que se pueden acumular y ser selectivamente tóxicas para las neuronas serotoninérgicas, se encontro que la 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y la 5,7-Dihidroxitriptamina (5,7-DHT) causan degeneración neuronal. Estas aminas particularmente la 5,7-DHT tienen efecto tóxico sobre las neuronas catecolaminérgicas, mientras que el análogo 5,6-DHT es ampliamente usada ya que es más selectivo. Sin embargo, ninguna dihidroxitriptamina causa muerte celular, ocasiona degeneración de los axones y neuronas serotoninérgicas del cerebro, habiendo regeneración con el paso del tiempo, cuando se administran dosis altas de 5,6-DHT o 5,7-DHT la toxicidad se hace evidente en muchos componentes celulares pero también disminuye la especificidad.

Mecanismo de toxicidad celular: la administración externa de sustancias químicas en el medio ambiente celular puede provocar una o varias reacciones químicas que alteran los procesos fisiológicos celulares, la reacción puede variar desde inofensiva, perjudicial hasta letal para las células, generalmente estos mecanismos no estan bien esclarecidos, pero los cambios fisicoquímicos que originan ruptura de las membranas, inhibición enzimática, depleción de cofactores, bloqueo de los mecanismos reguladores de las vías metabólicas, se explican en base a la formación de radicales libres, formación de especies altamente oxidantes, etc. En la oxidación (?) hay evidencia de la producción neuronal de radicales hidroxilo mediante la acción de la MAO; la 5,6-DHT es una rara neurotoxina, desarrollada inicialmente como toxina para las neuronas serotoninérgicas, destruyendo también las neuronas catecolaminérgicas en

el cerebro y la periferia, su mecanismo tóxico no se puede atribuir a un fenómeno de catalisis celular ya que no reacciona rapidamente con el oxígeno molecular (9,53), pero se ha reportado que la parqilina, que es un inhibidor de la MAO y que protege a las neuronas catecolaminérgicas pero no a las serotoninérgicas del daño causado por la 5,6-DHT, postulandose la siguiente reacción: $5,6\text{-DHT} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5,6\text{-Dihidroxifenilacetaldehído} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, donde se forma el peróxido de hidrógeno, y el aldehído tóxico.

Especificidad y selectividad de la 5,6-DHT: El mecanismo tóxico de la 5,6-DHT, la cual es un derivado de la 5-HT se ha evaluado por métodos cromatográficos, fluorométricos, calculando los niveles cerebrales de la 5-HT y 5-HIAA, de esta forma se ha demostrado que esta neurotoxina es específica para causar degeneración en las terminales serotoninérgicas hasta causar su destrucción, pudiendo dañar también las neuronas de la corteza somatosensorial tal vez por una desviación en la ruta metabólica de la 5-HT y/o por la formación de metabolitos más tóxicos.

La administración intraventricular de 5,6-DHT en las ratas produce una disminución en la cantidad de indoleminas: 5-HT y 5-HIAA, en varias regiones del cerebro, pero principalmente en el sitio de inyección, este fármaco es también un potente inhibidor de la captura de H-5-HT en las rebanadas de HC, pero inhibe de manera menos efectiva el sistema de captura de catecolaminas, debido a lo cual se cree que tiene acción preferente sobre las neuronas triptaminérgicas produciéndoles daño, degeneración y provoca hiperexcitabilidad solo a 5-HT en los animales tratados con 50µg de 5,6-DHT. Estos efectos se pueden apreciar por las modificaciones en la conducta agresiva, afectiva, actividad motora,

aprendizaje y memoria, etc.

Además se sabe que la presepción del dolor esta influenciada por disponibilidad del Trp en el cerebro, pudiendose hacer manipulaciones de tipo farmacológico para ver el papel que desempeñan las neuronas serotoninérgicas, por ejemplo con la administración de la 5,6-DHT (neurotoxina serotoninérgica específica) la cual tiene gran selectividad para destrucción de las terminales serotoninérgicas disminuyendo con esto la concentración de la 5-HT, para que se presenten los efectos neurotóxicos específicos de la 5,6-DHT se necesita que se una a los sitios receptores de 5-HT para que de esta manera quede bloqueada la biosíntesis de la 5-HT; a pesar de la conocida especificidad de esta neurotoxina y de su amplio uso se sabe poco sobre sus mecanismos fisiológicos de acción en las neuronas serotoninérgicas (10,19,59,72).

Los registros intracelulares muestran que la 5-HT tiene principalmente efectos postsinápticos y con la aplicación de la microforesis se puede incrementar la concentración de la 5-HT por excitabilidad eléctrica de las motoneuronas las cuales estan relacionadas con el retraso de la despolarización y un ligero aumento en la resistencia de la membrana, apareciendo el mayor efecto de la 5-HT cuando se genera el umbral de disparo.

La destrucción de las terminales serotoninérgicas mediante la inyección intracerebral de la neurotoxina específica o la disminución farmacológica por inhibición de la síntesis serotoninérgica con p-CPA previene la respuesta inhibitoria de las células del rafe y por lo tanto se cree que la vía serotoninérgica es la responsable de la depresión de las células de disparo de la amígdala provocada por la estimulación del rafe dorsal (2,35).

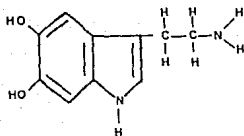


Figura 10. Fórmula desarrollada de la 5,6-DHT.

OBJETIVOS

Determinar la magnitud de la disminución de los niveles de serotonina (5-HT) y sus metabolitos en el hipocampo (Hc) después de la microinyección bilateral de 5,6-Dihidroxitriptamina.

Investigar los efectos de la microinyección de 5,6-DHT, sobre las crisis convulsivas inducidas por el KA administrado intraperitonealmente (ip).

Conocer la relación que existe entre los niveles de 5-HT y los cambios conductuales, electroencefalográficos e histopatológicos inducidos por el KA y su posible mecanismo de acción.

HIPOTESIS

Si se destruyen las terminales serotoninérgicas con 5,6-DHT entonces se disminuirá la frecuencia o severidad de las conductas directamente relacionadas a la neurotransmisión de 5-HT, evocadas por el ácido kaínico.

Si la destrucción de las terminales serotoninérgicas por la 5,6-DHT produce una disminución significativa de los niveles de 5-HT, entonces se aumentara la susceptibilidad de las ratas al efecto convulsivo del ácido kaínico.

El KA es un neuroexcitotónico que destruye selectivamente las neuronas piramidales del Hc, por sobreexcitación neuronal o por liberación de neurotransmisores excitadores, entonces, al disminuir la concentración hipocámpica de 5-HT, que tiene un carácter inhibitorio en esa estructura se espera una potenciación del efecto tóxico del KA.

Material y métodos:

Animales: Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas en un bioterio.

Fármacos:

Clorhidrato de Ketamina (Sigma)

Acido kaínico (Sigma)

5,6-Dihidroxitriptamina (Sigma)

Dosimipramina (Sigma)

Formaldehído (J.T.Baker)

Heparina (Lab. Reforma)

Xilocaína (Astra)

Eter etílico (J.T.Baker)

Reactivos para cromatografía de líquidos (HPLC):

Creatinin sulfato de 5-Hidroxitriptamina (Sigma)

Acido 5-Hidroxiindol acético (Merck)

3-Hidroxitiramina (DA) (Sigma)

Tartrato de L-noradrenalina (NA)

(Merck)

Octil sulfato de sodio (SDS)

(Sigma)

Fosfato diácido de potasio (Merck)

Acido Etilen diamino tetracético (EDTA) (Prod. quím. Monterrey)

Metabisulfito de sodio (Merck)

Isoproterenol (Sigma)

Metanol (J.T.Baker)

Reactivos para histología

Xileno (CBH10) (Merck)

Anaranjado G (Merck)

Azul de toluidina (Sigma)

Permanganato de potasio

(J.T.Baker)

Metabisulfito de sodio (Sigma)

Eritrosina B (Sigma)

Rojo de rutenio (Sigma)

Técnica quirúrgica:

Se emplearon ratas Wistar macho, con un peso de 200-350g, las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico, con iluminación artificial, alimentación y humedad controladas.

Las ratas se asignaron aleatoriamente a cada tratamiento experimental; dividiéndose en 2 grupos: A) controles, animales microinyectados con vehículo, B) lesionados, animales microinyectados con 5,6-DHT. A ambos grupos de animales se les administro una hora antes desimipramina por vía ip (25mg/Kg) con el fin de evitar la captación de 5,6-DHT por las neuronas catecolaminérgicas y destruir selectivamente las terminales serotoninérgicas. Las ratas fueron anestesiadas con clorhidrato de ketamina (100mg/Kg) por vía ip y se colocaron en el aparato estereotáxico DKI con microinyector, eligiendo las coordenadas para la microinyección bilateral del Hc dorsal de acuerdo al atlas estereotáxico para rata de Pellegrino y Cushman, 1979. Cuando el animal esta perfectamente inconsciente se le aplica xilocaína en "spray" en los oídos y se monta en las barras estereotáxicas para los oídos, las cuales entran dentro del canal auditivo debiendo de quedar simétricos en el aparato estereotáxico, comprobando que el animal esta bien fijo y se procede a colocar los dientes de la rata sobre la barra para los incisivos y se aprieta la pinza sobre la nariz. Se mantiene regulada la temperatura corporal a 37°C por medio de un colchón eléctrico controlado termostáticamente.

Para disminuir la posibilidad de infecciones y facilitar la cirugía se rasura la parte superior de la cabeza de la rata con una navaja para afeitar y se hace asepsia del área. Se realiza una incisión con el

bisturí ligeramente atrás de los ojos y a lo largo de la línea media del cráneo, cortando y haciendo a un lado la piel y tejido conjuntivo hasta exponer las suturas óseas del cráneo, que se emplean como puntos de referencia estereotáxica. La sutura Bregma está localizada en la parte delantera del cráneo y es la intersección de las placas frontal y parietal en su línea media, mientras que Lambda es la unión de las placas parietal e interparietal en su línea media. Se prefieren usar las coordenadas Bregma ya que tienen una menor variabilidad con respecto al cerebro, se procede a hacer la calibración de punto Bregma por medio de una aguja colocada en la torre y puesta sobre el punto, para determinar las coordenadas anteroposterior, lateral y vertical; según el área de interés. Una vez localizada la zona deseada se marca cuidadosamente el lugar del cráneo donde se va hacer la perforación y una vez hecha esta se quita la dura madre (capa que envuelve y protege la masa encefálica) y se procede a realizar la microinyección de la 5,4-DHT (10µg/µl en aproximadamente 20") o ácido ascórbico (0.1%) en igual volumen como vehículo. Se hace descender y penetrar 3 mm la microjeringa de 10 µl hasta el Hc dorsal microinyectando y permitiendo que la sustancia difunda antes de retirar la aguja (3min), se limpia perfectamente la superficie expuesta del cráneo y se procede a: a) la implantación de electrodos en la corteza parietal (Cxp) para el registro EEG de las crisis motoras límbicas y la implantación de electrodos en el músculo de la nuca para el registro del electromiograma (EMG) (sacudidas de perro mojado). Los electrodos se colocan en el conector y se fijan conacrílico eliminando los bordes agudos para evitar infecciones, en caso necesario se aplican puntos de sutura y antiséptico alrededor de la herida y se le administra penicilina procaina (100,000 UI/Kg) intramuscularmente (im) (65). Los animales se colocan en cajas deacrílico para su recuperación postquirúrgica por 72 hrs, después de lo cual (figura 11), b) se inducirán

las crisis convulsivas por medio de la administración sistémica del KA (10mg/Kg), previa inyección se conectan los electrodos implantados al animal a un polígrafo Grass 7P de 8 canales con preamplificadores para obtener el registro EEG y EMG correspondientes a la evaluación de la postdescarga y se procede a observar durante un período de 2 a 3hrs, para ver la frecuencia y latencia de las sacudidas de perro mojado (spm), crisis motoras límbicas y/o muerte tanto electroencefalográfica como conductualmente según la escala de Sperck y cols 1983. Una vez concluido este período se sacrifican los animales por decapitación, se extrae rápidamente el cerebro para la disección de las áreas de interés (HC, CX) (34) y poder determinar los niveles de catecolaminas, serotonina y sus metabolitos, por c) cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector electroquímico, para lo cual se pesa el tejido, se macera y sonica en un volumen de 0.7ml de ácido perclórico -metabisulfito (HClO_4 - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) manteniéndolo en hielo y protegido de la luz, se centrifuga a 15000 rpm durante 10' en una centrifuga refrigerada, se extrae el sobrenadante y se filtra para agregarle el estandar interno (isoproterenol) y la muestra esta lista para inyectarse al cromatografo.

Otro grupo de ratas igualmente tratadas se perfundieron con solución salina (NaCl 0.9%) con heparina como anticoagulante y solución salina con formol al 10% para fijar el tejido y realizar el estudio histológico específico para somas (43).

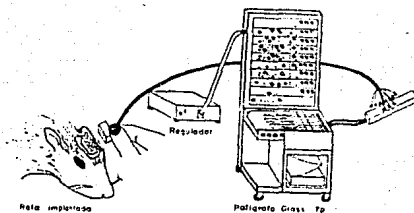


Figura 11. Diagrama de la implantación y registro EEG.

Evaluación de la conducta y EEG:

En todos los casos, se llevo a cabo un registro EEG control 30' después de la inyección sistémica del KA, continuando con el registro hasta completar 2 hrs, a todos los animales se les evaluó su registro del EMG registrando la latencia de aparición de sacudidas de perro mojado (spm), el número de spm, frecuencia por hora de spm, mientras que en el registro EEG de Cxp se observo la latencia de aparición de crisis EEG, número de crisis EEG, frecuencia de las crisis EEG, aclarando lo anterior ya que en ocasiones el animal conductualmente se halla en estado aparentemente normal pero EEG su actividad de descarga neuronal indica que esta en crisis.

En la evaluación del cuadro convulsivo a todos los animales (n=12) se les evaluó su registro EEG correspondiente después de la inyección del agente farmacológico (KA) anotandose la presencia de los siguientes efectos clínicos: giro de cabeza, salivación excesiva, spm, piloro erección, crisis motoras límbicas (cml) y/o estatus epiléptico.

Análisis cromatográfico de la S-HT:

La cromatografía se define como un método de separación de mezclas que se separan o resuelven por migración diferencial de sus constituyentes al pasar por la columna cromatográfica, que es el corazón de todo el sistema ya que ahí se lleva acabo la separación. Este proceso de separación depende de la distribución de las sustancias entre las 2 fases que son: a) la fase móvil (líquido que esta en constante movimiento). b) fase estacionaria (esta en reposo) esta última constituida por micropartículas de polvo fino que esta empacado dentro de la columna que puede ser de vidrio, teflón, acero inoxidable. La interacción que se presenta entre las moléculas de la muestra y las dos fases depende de sus propiedades físicas y químicas para que interactuen los grupos funcionales de las moléculas de la muestra, esta operación esta influenciada por la polaridad, fuerzas de Vander Waals, masa relativa del soluto y moléculas del solvente.

Tiempo muerto se denomina al tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que llega a la columna para comenzar a separarse y tiempo de retención al tiempo en que tardan en salir ya separados y detectados cada uno de los componentes de la muestra a través de la columna cromatográfica.

La eficiencia de la columna se mide a través del número de platos teóricos de la columna (N), lo cual esta dado por la siguiente fórmula: $N=16(tR/W_b)^2$ en donde W_b es el ancho de la base del pico y tR es el tiempo de retención. Si el análisis se hace por método isocrático (empleo de una sola bomba, con flujo constante de la misma fase móvil), los picos van disminuyendo de tamaño (altura) haciendo más difícil la detección de las trazas, lo cual tal vez se pueda prevenir empleando el sistema de elusión

por gradiente (hay 2 bombas, varias fases móviles, gracias a un programa que las controla) y entonces la ecuación empleada para el cálculo de la eficiencia es $N=5.54(t_R/W_{1/2})^2$ donde $W_{1/2}$ es la altura del pico tomada desde la mitad del ancho de la base del pico y la eficiencia se ve influenciada por la longitud de la columna (L) y por el número y la altura de los platos teóricos (H).

La resolución es correcta cuando existe una adecuada separación y simetría entre los picos de las diferentes sustancias que se separan en la columna de acuerdo a la ecuación:

$Rs=2(t_R2-t_R1)/(W1+W2)$ en donde t_R es el tiempo de retención, y W la distancia máxima que hay entre los picos.

La técnica analítica empleada para la evaluación de los niveles de 5-HT, 5-HIAA y catecolaminas fue la cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector electroquímico (HPLC-DE) que es una técnica muy sensible y específica para compuestos que se pueden detectar mediante la aplicación de una corriente de óxido-reducción.

La celda electroquímica del detector consta de 3 electrodos que son: el de referencia (Ag/AgCl), el electrodo auxiliar (Pt/Au) y el electrodo de trabajo que es de carbono vítreo. Existe un dispositivo (potenciostato) para mantener un voltaje constante entre el electrodo de referencia y el de trabajo midiéndose la corriente eléctrica entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, detectándose la corriente de oxidación del grupo funcional de la sustancia problema que esta contenida en la muestra de análisis.

Cuando la muestra va a ser inyectada al cromatografo se le agrega el estandar interno (isoprenalina) el cual debe de ser una sustancia inerte con la muestra y fase móvil, con una estructura química similar a la de la sustancia que se va a determinar y se emplea también para disminuir los errores de manipulación de la muestra.

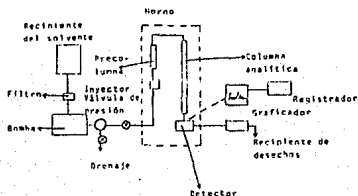
Una vez inyectada la muestra al cromatografo (a traves del inyector) es arrastrada por la fase móvil que es de naturaleza polar y esta constituida por fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4 0.2M), EDTA 1.0mM que actúa como quelante, octil sulfato de sodio (SOS) 0.3g/lit que sirve para formar un par iónico y actúa como detergente, metanol (CH_3OH) y agua desionizada (80-10) y se ajusta el pH a 3.2 con ácido fosfórico (H_3PO_4) (39) a traves del sistema hasta llegar a la columna en donde esta contenida la fase estacionaria que es de naturaleza no polar y esta constituida por micropartículas de fase inversa denominada $\mu\text{bondapak C18}$ (partículas unidas a una cadena de 18 carbonos) lo cual permite la separación de las moléculas de acuerdo a su orden de polaridad ya que eluyen en orden decreciente de polaridad. Al tener integrado el detector electroquímico al cromatografo permite una gran versatilidad a bajo costo y pueden determinarse diversos metabolitos biológicos como son las catecolaminas (NA, DA), 5-HT, 5-HIAA ya que al oxidarse estas sustancias en la superficie del electrodo de trabajo por aplicación de un potencial eléctrico se cuantifica mediante el registro de los electrones (e^-) liberados por la oxidación, pudiendose detectar de manera amperométrica hasta picogramos (pg) (trazas) produciendose una señal en el registrador y/o graficador apareciendo los picos de las sustancias analizadas en el cromatograma correspondiente, el área que aparece debajo de cada pico indica la concentración de los componentes de la muestra analizada pudiendo determinar la concentración exacta (nivel) de 5-HT, 5-HIAA, NA, DA al hacer los cálculos correspondientes.

Para la evaluación de las concentraciones se corrio una curva de calibración de 5-HT usando estandar interno y estandar de 5-HT a diferentes concentraciones para determinar los parámetros de confiabilidad del método cromatográfico (figura 12).

El aparato que se utilizo fue un cromatografo Perkin-Elmer series 3B,

con una columna de acero inoxidable μ bondapack C18 (25cmx4mm de diámetro interno) usando un flujo de la fase móvil de 1ml/min, un detector amperométrico Metrohm 041-VA con un potencial de oxidación de 85 mV contra un electrodo de Ag/AgCl, demostrando ser una técnica analítica muy sensible, exacta, precisa y de bajo costo, el tiempo de separación de los componentes de la muestra dependiera de la polaridad de la fase móvil, su pH, tipo de columna empleada.

Para que se presente una separación ideal de los componentes de la muestra, apreciable en un cromatograma se necesita una adecuada retención (tiempo en que tarda en salir de la columna y ser detectado y/o registrado el componente), selectividad (que se este midiendo lo que se quiere), buena resolución (adecuada separación y forma simétrica de los picos), buena eficiencia (adecuada capacidad de separación), los tiempos de retención para los componentes fueron: NA=4.14', 5-HIAA=7.08', DA=7.18', IS=9.98', 5-HT=15.53'.



Esquema que representa la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, con detector.

Resultados neuroquímicos de los niveles de 5-HT:

Para la corroboración cromatográfica de los niveles de 5-HT y metabolitos se procedió a correr un cromatograma de una mezcla de estandar interno (IS) y estandar de 5-HT a diferentes concentraciones para obtener los puntos para la curva de calibración del neurotransmisor, graficando en las ordenadas el área (A) de 5-HT y en las abscisas la concentración de la 5-HT, se obtuvo una relación directamente proporcional entre el área de cada pico y la concentración dando como resultado una gráfica de tipo lineal con un coeficiente de correlación de 0.996 y de esta manera determinar la confiabilidad del método analítico usado (figura 12).

Comprobándose también la exactitud y sensibilidad del método ya que se corrieron diversas muestras de varias mezclas de estándares para determinar la capacidad de separación de los componentes presentes en la muestra teniendo ya bien establecido el orden en que sale cada uno de los picos, observando los diferentes tiempos de retención para cada sustancia NA:4.14', 5-HIAA:7.08', DA:7.18', IS:9.98', 5-HT:15.53'.

Y al comparar los cromatogramas de una muestra control contra los de la muestra de un animal lesionado en Hc por microinyección bilateral, se aprecia una disminución aproximada del 30% en la concentración del neurotransmisor en la muestra del animal lesionado por efecto de la neurotoxina específica, lo cual se aprecia en la figura 12, en la cual se modifico el grado de atenuación para que se pudieran apreciar los picos de 5-HT y IS (figura 13).

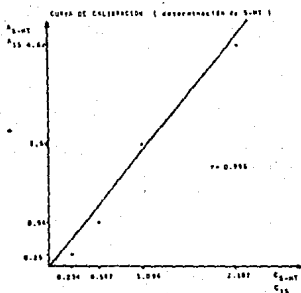


Figura 12. Curva de calibración para determinar la confiabilidad del método cromatográfico.

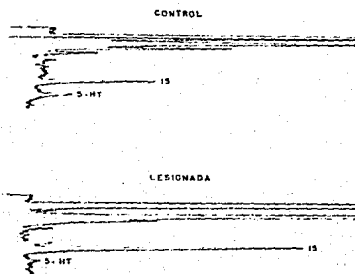


Figura 13. Cromatogramas típicos de muestras de animales control y lesionados respectivamente, en donde se aprecian el estándar interno (IS) y la 5-HT.

Rata # control	Tiempo total registro	Latencia la spm	#spm	#crisis	Latencia la crisis EEG	Frec. spm/lir	Frec. crisis/lir
5	152.5'	19.28'	138	43	10.53'	63.2	16.9
7	112.32'	8.98'	38	26	3.32'	18.7	12.8
1	126.43'	19.42'	107	19	-----	50.35	9.04
2	154.4'	22.63'	46	25	21'	17.83	9.73
3	122.18'	19'	123	17	18'	60.59	8.37
PROM.	133.57	17.86	94.4	26	13.21	42.27	11.37
D.STD.	18.87	5.18	51.34	10.25	7.93	22.35	3.53
E.STD.	8.42	2.31	22.92	4.57	3.96	9.97	1.58

TABLA 2. Resultados de la evaluación electroencefalográfica de las ratas control (microinyectadas con ácido ascórbico)

spm = sacudidas de perro mojado
 EEG = electroencefalograma

Rata lesionada	Tiempo total registro	Latencia 1a spm	#spm	#crisis EEG	Latencia 1a crisis EEG	Frec. spm/Hr	Frec.crisis/Hr
1	172.37'	13.57'	45	39	12.32'	15.67	17.073
2	156.4'	48.52'	22	16	2.15'	8.46	6.154
3	138'	19.83'	82	35	5.55'	35.65	15.22
1	141.25'	20'	7	19	4'	2.97	8.085
2	149.42'	24.33'	13	14	4'	5.24	5.62
3	151.1'	14.93'	35	8	8'	14	3.16
PROM.	151.42	23.53	34	21.83	6.00	13.66	9.22
D.STD.	12.26	12.84	27.35	12.35	3.66	11.83	5.62
E.STD.	5.02	5.26	11.21	5.06	1.50	4.85	2.30

TABLA. 3 Resultados de la evaluación electroencefalográfica de las ratas lesionadas (microinyectadas con 5,6-DHT).

spm = sacudidas de perro mojado
EEG = registro electroencefalográfico.

Resultados conductuales, EEG y neuroquímicos:

a) En la figura 14 se muestra un registro típico de una rata microinyectada con ácido ascórbico (vehículo), mostrando los registros del electromiograma (EMG) y corteza parietal (Cxp) en los respectivos canales tanto durante el período control como a los diferentes tiempos de evaluación del EEG después de la inyección sistémica de KA, apreciándose la aparición de sacudidas de perro mojado (spm) en el registro del EMG aproximadamente a los 30' después de la inyección del KA y una mayor actividad en el registro de Cxp que va en aumento progresivamente en el tiempo, llegando a presentar una actividad de poliespigas y crisis micclónica en el registro del EMG a los 90' después de la inyección de KA, mientras que en la figura 15 se muestra un registro EEG típico de un animal lesionado por la microinyección de la neurotoxina específica apreciándose en el registro del EMG que se retrasan las spm hasta los 60' después de la inyección del KA, disminuyendo también su número para que a los 90' después de la inyección haya en ambos registros una actividad de poliespigas característico de las crisis convulsivas (ver figuras 14 y 15).

Al comparar los resultados EEG de las spm y crisis EEG de los animales lesionados contra los animales control, se aprecia que hay un aumento en la latencia de aparición de spm del 43% en los animales lesionados con una menor frecuencia de spm, debido a que los animales lesionados presentan mas rápidamente las crisis convulsivas electroencefalográficas que son de mayor intensidad y duración y al realizar el analisis estadístico correspondiente se encontro que en ambos casos hubo diferencia estadísticamente significativa entre los 2 grupos (ver tablas

2 y 3, gráficas 16 y 17).

En el registro EEG de las crisis convulsivas en la Cxp se vio una disminución en la latencia de aparición de las crisis del 29% en los animales lesionados con la 5,6-DHT ya que las crisis se presentan antes ya que tienen una menor latencia, mayor intensidad y duración, habiendo también en este caso diferencias estadísticamente significativas, en tanto que para la frecuencia de las crisis EEG no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Durante las crisis motoras límbicas y/o estatus epiléptico se observa una actividad paroxífrica en el Hc (CA3), siendo aquí donde se presenta un menor umbral y una mayor vulnerabilidad (5,54) ya que el KA actúa produciendo muerte celular en las zonas específicas del cerebro, particularmente en las células piramidales de CA3 del Hc (69), sin daño histológicamente apreciable en otras zonas de la misma estructura, correlacionándose esto con la gran cantidad de terminales Glu/Asp y receptores al KA en la zona CA3 del Hc (44,67,71); debido a la destrucción de las terminales serotoninérgicas en el Hc disminuyendo por lo tanto los niveles de 5-HT en esta estructura permitiendo que se potencien los efectos neuroexcitotóxicos del KA. Finalmente se analizó la correlación existente entre los efectos conductuales (signos clínicos de las crisis convulsivas) y EEG con los niveles de la lesión de acuerdo con b) la evaluación neuroquímica (determinación cromatográfica de los niveles de 5-HT) encontrándose una disminución del 30% al comparar la concentración de los animales lesionados contra la de los animales control:

animales control	animales lesionados
$x = 2.5233$	$x = 1.813$
D.Std = 1.168	D.Std = 0.049
E.Std = 0.5811	E.Std = 0.028

y c) la corroboración histológica correspondiente para verificar el sitio de microinyección y el daño neuronal producido por este modelo epiléptico experimental.

Por lo tanto el Hc es una importante estructura para la manifestación de las crisis convulsivas límbicas (32).

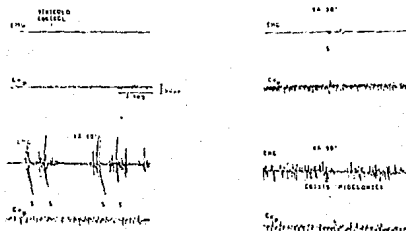


Figura 14. Registro EEG típico de una rata microinyectada bilateralmente en el Hc con ácido ascórbico.

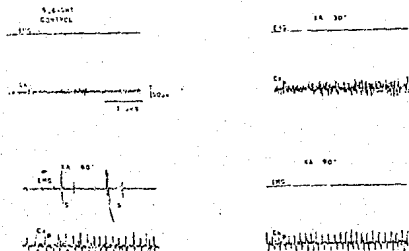


Figura 15. Registro EEG típico de una rata microinyectada bilateralmente en el Hc con 5,6-DHT.

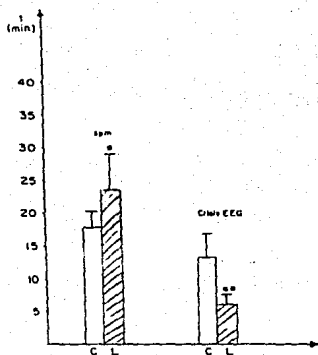


Figura 16. Gráfica que muestra la comparación de las latencias de spm, crisis EEG, tanto para animales control (barras blancas) como para los animales lesionados (barras sombreadas).

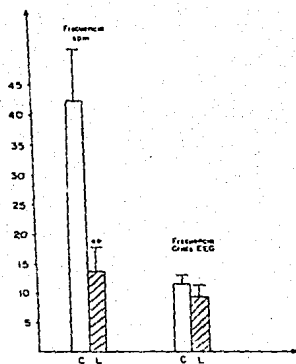


Figura 17. Gráfica en la que se muestra la comparación de frecuencias de aparición de spm, crisis EEG/Hr, animales control (barras blancas), animales lesionados (barras sombreadas).

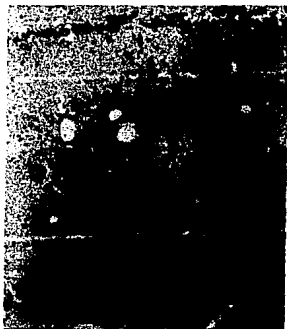
Resultados de la corroboración histológica:

Se hizo la corroboración histológica del sitio de microinyección en el Hc, para evaluar los daños causados por el KA en las zonas CA1, CA2, CA3, CA4 durante las crisis convulsivas, ya que al destruir la 5,6-DHT las terminales serotoninérgicas hipocámpales permite que se potencien los efectos neuroexcitotóxicos del kainato. La 5,6-DHT por efectos de oxidación deja una mancha apreciable a simple vista en el sitio de inyección en el Hc.

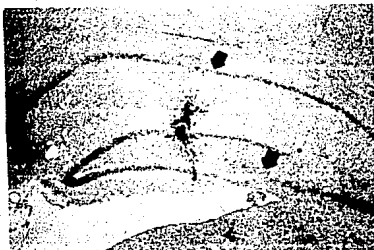
Se emplea la técnica de Mann-Dominici específica para somas y al ver las preparaciones al microscopio se aprecia el sitio de microinyección por medio de la aparición del trayecto de la aguja de la microjeringa de microinyección, las evidencias del sitio de microinyección para el ácido ascórbico y para la 5,6-DHT se aprecian en las fotografías 1 y 3 respectivamente; a mayor aumento se aprecia una diferencia entre las zonas CA1 y CA4 al comparar las preparaciones de los animales lesionados y las de los animales control (fotografías 2 y 4) donde aparecen neuronas piramidales y granulares normales en las preparaciones de las muestras de las ratas microinyectadas con vehículo (ácido ascórbico) y KA, mientras que en las muestras de las preparaciones de las ratas pretratadas con 5,6-DHT y administradas ip con KA se aprecia una lesión neuronal en las zonas CA1 y CA4.



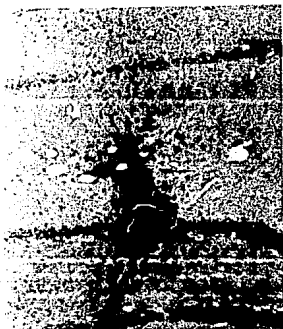
Fotografía 1. Inyección de ácido ascórbico más ácido kaínico. Vista panorámica del sitio de microinyección donde se aprecia el trayecto de la aguja de la microjeringa.



Fotografía 2. Muestra el acercamiento de las células piramidales en una inyección control.



Fotografía 3. Vista panorámica del sitio de microinyección de 3,6-DHT más ácido kaínico en la rata lesionada.



Fotografía 4. Acercamiento para ver el daño de las células piramidales en la capa CA4 en un animal lesionado.

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Ejemplo: LATENCIA PRIMERA SACUDIDA DE PERRO MOJADO.

$$t = \frac{17.86 - 23.53}{\sqrt{4(5.18)^2 + 5(12.84)^2}} \sqrt{\frac{5(6)(5+6-2)}{5+6}}$$

$$= \frac{-5.67}{107.33 + 824.33} \sqrt{\frac{5(6)(5+6-2)}{5+6}}$$

$$= \frac{-5.67}{931.66} \sqrt{\frac{270}{11}}$$

$$= \frac{-5.67}{30.52} (4.95) = -0.319$$

$$\alpha = 0.05$$

$$t_{n_1+n_2-2} = t_9^{0.05} = 1.833$$

$$t_9^{0.01} = 2.82$$

$$|t_{cal}| \geq t_{tablas} \longrightarrow \text{no } \neq \text{sign. p } 0.05$$

La prueba de t para dos muestras fue descubierta por Gosset a principios del siglo XX, empleando el seudónimo de Student, si se consideran dos muestras de tamaño n, extraídas de una población normal con media de μ y si para cada muestra se calcula el valor de t, empleando la media de la muestra $\bar{x}$ y la desviación estándar se obtiene el valor de t, los grados de libertad se definen como el número de observaciones independientes en la muestra (tamaño de muestra) menos el número de parámetros de la población que deben estimarse a partir de las observaciones de la muestra.

Esta prueba estadística se emplea para buscar diferencias entre dos medias de poblaciones (muestras) independientes con tamaño pequeño (30). (Irwin Miller- John E Freund. Probabilidad y esta-

BO

dística para ingenieros. Prentice Hall, primera edición México - 1986, pp 245-247).

Discusión y conclusión:

Con el empleo de la técnica estereotáctica para la microinyección bilateral intrahipocámpal del ácido ascórbico y/o 5,6-DHT, la implantación de electrodos para el registro EEG; se logro lesionar la zona específica del SNC (Hc) y por lo tanto alterar la concentración normal de 5-HT en esta zona de microinyección sin que se presente difusión hacia otras regiones adyacentes como la Cx (fotografía 3).

El Hc (giro dentado, asta de Amon, capas CA1, CA2, CA3, CA4) presenta una variada y compleja organización en lo que se refiere a aferencias, eferencias e inervaciones que recibe de otras estructuras del SNC, provenientes principalmente de los núcleos del rafe, el cual tiene un alto porcentaje de neuronas serotoninérgicas (secretan 5-HT); que es un importante neurotransmisor y por lo tanto el Hc se puede considerar una estructura pivote para la manifestación de las crisis convulsivas.

Se debe de considerar también la diferente densidad de cada uno de los diferentes tipos celulares que conforman al Hc (células piramidales, granulares y musgosas), según la zona o capa específica de que se trate, para evaluar las alteraciones morfológicas causadas por el tratamiento con la microinyección de la canatoxina específica, ya que se esta provocando un cambio en la concentración normal de los niveles de 5-HT en Hc, facilitando las crisis convulsivas inducidas por el KA, produciendo un cambio en el umbral electroconvulsivo de las ratas, que fue registrado electroencefalográficamente observando una disminución en la latencia de la primera crisis EEG, de la primera spm y un aumento en la frecuencia de estas conductas ya que los animales lesionados caían más rápidamente en crisis y permanecían durante más tiempo en crisis, debido a que disminuye su umbral electroconvulsivo para su posterior evaluación.

de las conductas típicas de las crisis convulsivas descritas por Sperck, lo cual también se refleja en los cambios conductuales como la agresividad.

En lo que se refiere a la técnica cromatográfica de análisis de niveles, fue necesario encontrar las condiciones adecuadas y correr la curva de calibración correspondiente para determinar la confiabilidad y sensibilidad del método empleado para la detección de 5-HT.

Después de analizar los resultados conductuales (agresividad y diferentes etapas que caracterizan una crisis convulsiva), EEG (registro de las sacudidas de perro mojado y crisis EEG por medio de las poliespigas típicas de esta clase de alteraciones), cromatográficamente hubo una disminución de la concentración hipocámpal de 5-HT, y con los resultados histológicos de esta investigación podemos concluir:

- a) Que la variación en la concentración hipocámpal de la 5-dihidroxitriptamina (5-HT) realmente ejerce una función de tipo inhibitorio en la actividad eléctrica neuronal de disparo en el HC, ya que se modificó la susceptibilidad convulsiva de los animales (haciéndolos caer en crisis más rápidamente y con crisis de mayor intensidad)
- b) La serotonina está involucrada en los mecanismos desencadenantes y/o reguladores de las diferentes etapas conductuales características de las crisis convulsivas como son las spm, crisis EEG, cml, inducidas por el efecto neuroexcitotónico del KA, por efectos excitatorios neuronales.
- c) El ácido raínico ejerce una acción nociva por una sobreexcitación neuronal que provoca un aumento descontrolado en la actividad de descarga eléctrica neuronal, ocasionando la actividad paroxística característica de la epilepsia.

d) El hipocampo es una importante estructura anatómica para el estudio de este tipo de alteraciones (convulsiones o epilepsia).

Apéndice:

Electroencefalograma (EEG):

El EEG en humanos permite ver la actividad cerebral normal, alterada o lesionada ya que se registra por medio de electrodos en el cuero cabelludo.

El monitoreo electroencefalográfico es importante en la epilepsia.

Una vez iniciado el ataque, se observa la aparición de espigas características en el registro (potenciales eléctricos de alto voltaje y gran rapidez) pudiendo haber diferentes fases de perturbación eléctrica cerebral apareciendo al principio las ondas cerebrales rápidas y de baja amplitud (20 ciclos/seg) que corresponden a la activación de la parte inferior de la formación reticular, para que posteriormente aparezcan períodos de ondas mas lentas por estimulación del núcleo caudado talámico.

El EEG es útil para el diagnóstico, localización y tratamiento de la epilepsia (29,35); ya que el cambio de voltaje produce el registro EEG, las ondas cerebrales registradas son en su mayoría producidas por actividad eléctrica a nivel de sinapsis y por potenciales de todo o nada en la corteza. En los registros son los resultados de la suma algebraica de depolarización e hiperpolarización, en el EEG se produce una actividad eléctrica amplificada que se registra como movimiento en una pluma inscriptora sobre una hoja de papel móvil, el patrón electroencefalográfico varía entre los sujetos y las áreas de registro, existen dos tipos de ondas cerebrales en terminos de amplitud (u voltios) y frecuencia (número de oscilaciones/seg).

Las de tipo (α) se presentan cuando el sujeto esta despierto y tranquilo con frecuencia de 10 ciclos/seg, son de alto voltaje y de baja

frecuencia y el otro tipo de ondas es la (β) que se presenta en los estados de atención, alerta, siendo de bajo voltaje y alta frecuencia (15 a 30 ciclos/seg).

Equipo usado para EEG:

El equipo usado para el registro EEG en el laboratorio es el polígrafo, que es un aparato que consta de 8 a 20 canales dependiendo del modelo y del uso que se le vaya a dar teniendo sensibilidad y frecuencia características. Los canales deben de ajustarse de manera individual dependiendo de la señal electroencefalográfica que se quiera registrar, consta de amplificadores miniaturizados que aseguran que la resistencia de la conexión a los electrodos no afecte la señal de registro (interferencia) aumentan la señal de la onda o aumentan la frecuencia, los controles de calibración son indispensables ya que no existe una manera uniforme de realizar los registros y se evita la sincronía o interferencia entre los canales, el ruido de fondo, etc.

Análisis del registro: las ondas deben de ser clasificadas de acuerdo a su actividad, ritmo en terminos de frecuencia o períodos, amplitud, relación de fase, forma, variabilidad del trazo de las espigas, los principales criterios que hay que considerar son: frecuencia, forma, amplitud y distribución temporal de las ondas, y al revisar una sección del registro de los componentes que en el aparecen deben de ser claros, continuos, con un ritmo frecuente, y con buena actividad, pudiendose presentar ondas más o menos fásicas con una duración menor a 80 milisegundos (ms) denominadas espigas, y otras entre 80-200 ms llamadas onda aguda, un espectro de frecuencia electroencefalográfico se divide en bandas: Delta de menor de 4 Hertz (Hz), Theta de 4 a 8 Hz, alpha de 8 a 13 Hz, Beta mayor de 13 Hz.

El término de espiga se usa cuando los trazos representan destargas rítmicas de acuerdo a la frecuencia de las ondas, pudiendo ser polimórficas, lentas o rápidas (36).

- 1.- Alemán-Alemán V y Martínez Muñós D. Effect of different drug on some seizure parameters in the morphine dependent mice. *Exp.Neurol.* 80:451-456 (1983).
- 2.-Alexander and Kopeloff. Metrazol seizure in rats: effect of p-chlorophenylalanine. *Brain Res.* 22: 231-235 (1970).
- 3.- Andersen P, Blackstad T.W, Lomo T! Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp.Brain Res.* 1:236-248 (1966a).
- 4.-Anderson P, Eccles J.C, Lynning Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *J.Neuophysiol.* 27:608-619 (1964).
- 5.-Applegate C.D, Burchfield J.L, Konkol R.J. Kindling antagonism effects of norepinephrine depletion on kindled seizure suppression after concurrent, alternate stimulation in rats. *Exp.Neurol.* 94:379-390 (1986).
- 6.-Azmitia E, Segal M. The efferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat brain. *Journal Comp. Neurol.* 179:641-668 (1978).
- 7.-Bancaud Jean. Epilepsia. *Mundo científico (La Recherche)* Num.20 Vol 2 pp 1202-1210.
- 8.-Baumgarten H.G, Bjorklund A and Bojdanski D.F. In chemical tools in catecholamine research edited by G. Jonsson, T.Malfors and C.Sarch pp 59-66 (1975). North-Holland Amsterdam.
- 9.-Baumgarten H.G, Evetts K.D, Holtzman R.B, Iversen L.L, Marthe Vogt and Gary Wilson. Effects of 5,6-DHT on monoaminergic neurones in the central nervous system of the rat. *Journal of Neurochemistry* 19:1587-1597 (1972).
- 10.-Baleslin D.B. and Ranka Samardzic. Effects of parachlorophenylalanine and 5,6-Dihydroxytryptamine on aggressive behaviour evoked by cholinomimetics and cholinesterases injected into the cerebral ventricles of conscious cats. *Neuropharmacology* 19:251-257 (1979).
- 11.-Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic

acid: Mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 14:375-403 (1985).

12.-Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen O.P. and Meldrum B.S. The role of epileptic activity in the hippocampal and remote cerebral lesions induced by kainic acid. Brain Res. 191:79-97 (1980).

13.-Ben-Ari Y, Tremblay E, Richie D, Shilini G, Naquet R. Electroencephalographic clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline, or pentilentetrazole. Metabolic mapping using the desoxyglucose method with and special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience 6:1361-1391 (1981).

14.-Berger Michael, Sperck Gunther and Oleh Hornykiewicz. Serotonergic denervation partially protects rats striatum from kainic acid toxicity. Nature 279:254-255 (1982).

15.-Berger M.L, Tremblay E, Nitecka L and Ben-Ari Y. Mutarotation of kainic acid binding sites in the limbic system seizure brain damage syndrome in the rat. III Postnatal development of kainic acid binding sites in the limbic system. Neuroscience Num.4 Vol 13 pp 1095-1104 (1984).

16.-Bernardo L.S, Price D.A. Dopamine modulates Ca^{2+} activated potassium conductance in mammalian hippocampal pyramidal cells. Nature 297:76-79 (1982).

17.-Cohen Gerald. Monoamine oxidase hydrogen peroxide and Parkinson's disease. Advances in Neurology. Raven Press 45:119-125 (1986).

18.-Collins R.C, McLean M, Lothman E, Klun K.W, Olney J. Kainic acid causes limbic seizure. Epilepsia 21:176 (1980).

- 19.-Commins J.Deborah, Art Karen J, Vosmer Georgetown and Seiden S
Lewis.S,6-Dihydroxytryptamine a serotonergic neurotoxin, is formed
endogenously in the rat brain. Brain Research 403: 3-14 (1987).
- 20.-Consolo et alis. Modulations of the hippocampal adrenoreceptores
populations by lesion of the serotonergic raphe-hippocampal pathway in
rats. Life science 182: 107-117 (1982).
- 21.-Cooper Jack, Bloom Floyd, Robert Roth. Las bases bioquimicas de la
neurofarmacologia (Serotonina). El manual moderno. 179-183 (1984).
- 22.-Coyle Joseph T. Neurotoxic action of kainic acid. J. of
Neurochemistry. Raven Press. New York 41(1):1-11 (1983).
- 23.-Cook T.M and Crautcher K.A. Intrahippocampal injection of kainic acid
produces significant pyramidal cells loss in neonatal rats. Neuroscience
Num.1 Vol 18 pp 79-82 (1986).
- 24.-Creveling C. Lundstrom J, Mc Neal E.T, Tice L and Daly J.W. Mol
Pharmacol. 11:211-222 (1975).
- 25.-Curtis D.R and Felix D. The effect of bicuculine upon synaptic
inhibition in cerebral and cerebellar cortices of the cat. Brain Res.
34:301-321 (1971).
- 26.-Chase T.N and Murphy D.L. Serotonin and central nervous system
function. Annu Rev Pharmacol. 13:181-197 (1973).
- 27.-Delmas A. Vias y centros nerviosos. Editorial Toray-masson pp 15-24
(1981).
- 28.-Diggory G.L and Buckett W.R. An automated method to measure
monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC
with electrochemical detection. Applications to striatal and hippocampal
serotonin turnover. J. of Pharmacological methods. 11: 207-217 (1984).
- 29.-Dunwiddie T.V, Muller A.J, Bickford P.C, and Zahniser N.R.
Electrophysiological and biochemical sequelae of destruction of

- hippocampal noradrenergic afferents by DSP4. *Brain Res.* 269:311-317 (1983).
- 30.-Ferkany J.W and Coyle J.T. Kainic acid selectively stimulates the release of endogenous excitatory acid amino acids. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* 225:399-406 (1983).
- 31.-Fonnum and Wallas I. The effect of intrahippocampal kainic acid injection and surgical lesions on neurotransmitters in hippocampus. *J.Neurochem.* 31:1173-1181 (1978).
- 32.-Fonnum, Wallas Iversen. Localization of GABAergic, cholinergic and aminergic structures in the mesolimbic system. *J.Neurochemistry* 29: 221-230 (1977).
- 33.-Gar Johnston, Curtis D.R, Davis J, McCulloch R.M. Spinal interneurone excitation by conformationally restricted and analogues of L-glutamic acid. *Nature (London)* 248:804-805 (1974).
- 34.-Glowinski J and Iversen L.L. Modific of. Regional studies of catecholamines in rat brain. *J.Neurochem.* 13:655-667 (1966).
- 35.-Jacobs and Gelperin editors. Serotonin neurotransmission and behaviour. Massachusetts pp 91,160,166,204,326 (1981).
- 36.-Kiloh L.G, Comas M.C, Osselton J.W. Clinical electroencephalography. Ed. Butterworths. 24-84 (1981).
- 37.-Millian and Frey. Central monoamines and convulsive the sholds in mice and rats. *Neuropharmacology.* 16: 617-623 (1973).
- 38.-Kenney R.A and Tibdall C.S. Human susceptibility to oral monosodium L-glutamate. *Am.J.Clin.Nutr.* 25: 140-146 (1972).
- 39.-Krstulovic. Ante Brown Phyllis R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography. Al. Wiley-Interscience publication. John Wiley and sons 1982.
- 40.-Lenique P.M, Weipierre J, Cohen Y. Protection by 4-amino-hex-5-enoic acid (gamma-vinyl-GABA) and hypobaric hypoxia against kainic acid

- neurotoxicity. *Psychopharmacology*. 66:51-53 (1979).
- 41.-López-Antunez. Anatomía funcional del sistema nervioso. Editorial Limusa México pp 483,103-104 (1979).
- 42.-Lundh H. Effect of 4-aminopyridine in neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153:307-319 (1978).
- 43.-Martos R. Técnicas de histología animal. Editorial Panamericana pp 78-79 (1970).
- 44.-Mathe-Sorensen D, Skrede K.K, And Fonnum F. Calcium dependent release of D-3-(H)-aspartate evoked by selective electrical stimulation of excitatory afferent fibres to hippocampal pyramidal cells in vitro. *Neuroscience* 4:1255-1263 (1979).
- 45.-Massieu G, Tapia R, Fernández A. Algunos aspectos bioquímicos y electrofisiológicos de la epilepsia. *Gaceta Médica de México*. Num.1 Vol 112, Julio 1976.
- 46.-McGeer E.G, and McGeer P.L. Duplication of biochemical changes Huntington's Chorea by striatal injection of glutamic and kainic acids. *Nature*. 263:517-519 (1976).
- 47.-Meza-Ruiz G, Tapia R. 3H-GABA release in synaptosomal fractions after intracranial admin of ruthenium red. *Brain Res.* 154:163-166 (1978).
- 48.-Meltzer Herbert Y. *Psychopharmacology (Neurotoxins affecting biogenic aminergic neurons*. Irving J Kopin) 351-359 (1987).
- 49.-Meltzer Herbert Y. *Psychopharmacology (Neurotoxicity of methamphetamine and related drugs*. Lewis S Seiden And George A. Ricaurte) 359-366 (1987).
- 50.-Molla-Hosseini G, Lonique F.M, Weipierre J, and Cohen. Modulation de la conducta por acción del ácido kainico en las ratas tratadas con p-CPA

- y drogas GABA-miméticas con su correlación bioquímica. *Journal Pharmacol. (Paris)* 16, 3:299-312 (1985).
- 51.-Moore R.Y and Halaris A.E. Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J. Comp.Neurol.* 164:171-183 (1975).
- 52.-Munkenbeck E. Schwark W.S. Serotonergic mechanism in amygdaloid kindled seizure in the rat. *Experimental Neurobiology.* 76: 246-253 (1982).
- 53.-Nadler J.V, Perry B.W and Cotman C.W. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 271: 676-677 (1978).
- 54.-Olney T.W, McGeer E.G, McGeer P.L. Neurotoxicity of excitatory aminoacids. Raven Press New York 95-121.
- 55.-O'Shaughnessy D and Gerber Gary. Damage induced by systemic kainic acid in rats is dependent upon seizure activity a behaviour and morphological study. *Neurotoxicology.* 7(3):187-202 (1986).
- 56.-Pasantes-Morales H y Arzate M.E. Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. *J.Neurosc.Res.* 6:465-474 (1981).
- 57.-Peroutka S.J and Snyder S.H. *Mol Pharmacol.* 16(20): 687-699 (1979).
- 58.-Price D.A. Tropical convulsant drugs and metabolic antagonist. p 51-83 en la obra experimental models of epilepsy de D.P.Purpura, J.K.Tower, D.Woodbury, Y.R.Walter (dirs) New York,Raven Press (1972).
- 59.-Richardson P. Brain and Gunter Engel. The pharmacology and function of 5-HT₃ receptors. Elsevier Science Publishers. B.V Amsterdam (1986).
- 60.-Roman Pohorecki M.D and Edward F Domino M.D. Synaptic pharmacology of the hippocampus. Departament of pharmacology University of Michigan. Review in clinical and basic pharmacology. Vol6 189-211 (1987).
- 61.-Scatton P, Simon H, LeMoal M, Bischoff S. Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neuroscience Letters.* 80:125-131 (1980).
- 62.-Schwarz and Coyle. (1984) Neurotoxic effects after intraocular

- injection. Invest ophthalmol. 16: 141-149 (1977a).
- 63.-Segal M. The action of serotonin in the rat hippocampal slice preparation. Journal Physiol. 330:429-439 (1980).
- 64.-Siegel G.J. Basic neurochemistry (Serotonin, histamine and purines). Little Brown and Company, Boston 219-224 (1972).
- 65.-Skinner James E. Neurociencia, manual de laboratorio. Editorial Trillas 103-160 (1975).
- 66.-Storm-Mathisen J. Localization of transmitter candidates in brain hippocampal formation as a model. Prog.Neurobiol. 8:119-181 (1977).
- 67.-Storm-Mathisen J and Opcehl M.W. Aspartate and/or glutamate may be transmitter substances from hippocampal slices studied with localized perfusion. Brain Res. 160:372-376 (1979).
- 68.-Tapia R, Moza-Ruiz G, Duran L y Drucker-Colin R.R. Convulsions of flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. Brain Res. 116: 101-109 (1976).
- 69.-Wallas I. The hippocampal in chemical neuroanatomy. Emson Raven Press, New York 337-358 (1983).
- 70.-Wang R.Y and Agahjianian G.K. Inhibition of neurons in amygdala by dorsal raphe stimulation mediation throug a direct serotonergic pathway. Brain Res. 120: 85-102 (1977).
- 71.-Wieraszko A and Lynch G.S. Stimulation-dependent release of possible transmitter substances from hippocampal slices studied with localized perfusion. Brain Res. 160:372-376 (1979).
- 72.-Wiklund Leif, Laurent Descarries and Kjeld Møllgård. Serotonergic axons terminals in the rat dorsal accessory olive: normal ultrastructure and light microscopic demonstration of regeneration after 5,6-DHT lesioning. J. of Neurocytology. 10: 1009-1027 (1981).