



196
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DEL MAGNESIO EN LA PROTECCION
DEL DAÑO NEURONAL EN EL MODELO DE STATUS
EPILEPTICUS INDUCIDO POR ACIDO KAINICO EN LA RATA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIA DEL PILAR PONCE JIMENEZ**

Director de Tesis: Dr. Raúl Alvarado Calvillo

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía las facilidades para la realización de esta tesis, al Dr. Raúl Alvarado Calvillo como director de la misma, a Joaquín Manjarrez Marmolejo por su asistencia en el Laboratorio, a Carlos, Alejandro, Alfonso Gutiérrez, y Héctor Belmont por su asistencia en Computación.

A Catalina

A Isabel Jiménez

A mi familia y de manera especial a Carlos

INDICE

INDICE.....	6
RESUMEN.....	9
MARCO TEORICO	
1. EPILEPSIA Y DANO NEURONAL.....	11
1.1. EPILEPSIA.....	11
1.2. HIPOCAMPO.....	14
1.3. DANO NEURONAL.....	15
1.3.1. NEUROCITOLOGIA Y SU APLICACION AL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA.....	15
1.3.2. LA MORFOMETRIA ASISTIDA POR COMPUTADORA.....	16
1.3.3. CAMBIOS MORFOLOGICOS EN LA EPILEPSIA.....	16
1.3.4. NEUROTOXICIDAD DEL GLUTAMATO.....	18
2. ACIDO KAINICO (AK).....	20
2.1. CARACTERISTICAS GENERALES.....	20
2.2. EL AK COMO MODELO DE STATUS EPILEPTICO (SE).....	20
2.3. EFECTOS DEL AK EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	22
2.4. MECANISMOS DE ACCION DEL AK.....	25
3. MAGNESIO.....	28
3.1. CARACTERISTICAS GENERALES.....	28
3.2. IMPORTANCIA PARA EL SISTEMA NERVIOSO.....	28
3.3. FARMACOCINETICA Y METABOLISMO.....	28
3.4. PROPIEDADES COMO ANTIEPILEPTICO.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
HIPOTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	35
METODOLOGIA.....	37

MATERIALES.....	37
METODOS.....	40
A) VALORACION CONDUCTUAL.....	40
B) REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO (EEG).....	40
1) IMPLANTE DE ELECTRODOS.....	40
2) REGISTRO EEG.....	43
C) MORFOMETRIA.....	43
1) HISTOLOGIA.....	43
2) MEDICIONES LINEALES.....	44
3) MORFOMETRIA ASISTIDA POR COMPUTADORA.....	46
4) INYECCION INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV) DE AK....	49
D) ANALISIS ESTADISTICO.....	50
RESULTADOS.....	54
PARTE 1. VALORACION CONDUCTUAL Y TASA DE MORTALIDAD... 54	
a) LATENCIAS A LA PRIMERA SACUDIDA WET-DOG SHAKE Y A LA PRIMERA CRISIS TONICO CLONICA GENERALIZADA (CTCG).....	54
b) MORTALIDAD.....	55
PARTE 2. REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO.....	56
a) LATENCIAS A LA PRIMERA MANIFESTACION ELECTROENCEFALOGRAFICA Y A LA PRIMERA SACUDIDA.....	56
PARTE 3. MORFOMETRIA DEL HIPOCAMPO	
NORMAL DE RATA.....	61
a) MEDICION LINEAL CON MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO....	61
b) MEDICION LINEAL ASISTIDA POR COMPUTADORA.....	62
c) AREAS Y PERIMETROS.....	64

RESULTADOS DE LA INYECCION ICV DE AK.....	66
DISCUSION.....	73
CONCLUSIONES.....	83
APENDICE I	
PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES.....	84
BIBLIOGRAFIA.....	90

RESUMEN

El status epiléptico (SE) causa daño neuronal severo e irreversible en ciertas zonas del cerebro, principalmente en el sistema límbico. Un modelo experimental de SE es la administración sistémica o tópica de Acido Kainico (AK). Se ha sugerido que el magnesio (Mg^{2+}) disminuye la lesión por trauma experimental al cerebro de rata (McIntosh y col., 1988). También se menciona que retarda las crisis convulsivas provocadas por oxígeno hiperbárico (Katz y col., 1990), y la deficiencia de Mg^{2+} se ha utilizado como modelo experimental de epilepsia (McIntosh y col., 1988; Lewis y col., 1989; Morris y col., 1990). Sibai (1990) afirma que el sulfato de magnesio es el anticonvulsivo ideal en el tratamiento de crisis asociadas a preeclampsia-eclampsia. En el presente estudio se analiza si el Mg^{2+} juega un papel en la protección contra el daño neuronal provocado por SE. Se utilizaron 98 ratas macho de la cepa Wistar (Ratus norvegicus) con un peso de 230-405 g. Los animales fueron divididos en 3 grupos: 1) Control con administración de solución salina; 2) AK 10 mg/kg i.p.; 3) $MgSO_4$ 3 mM/kg y 30 minutos después se aplicó AK 5.2 nMolas en 4 5 ul i.c.v.. Se realizaron 4 valoraciones : 1) Valoración conduc-

tual. Se midió la latencia a la primer sacudida y a la primera crisis mioclónica; 2) Tasa de mortalidad. Se contabilizó el número y porcentaje de animales muertos en cada grupo; 3) Electroencefalograma (EEG). Latencia a la primera manifestación de actividad epileptiforme a nivel de corteza motora; 4) Morfometría del hipocampo asistida por computadora. Se determinó el área (A) en mm^2 y perímetro (P) en mm de las capas piramidal (CP) y granulosa (CG). Los resultados observados fueron: 1) El promedio de la latencia a la primera sacudida fue 20.8 min y 41.1 min para los grupos AK y Mg-AK respectivamente, la latencia a la primera crisis mioclónica fue 31.9 min para AK y 63.1 para Mg-AK. 2) La tasa de mortalidad fue de 22.2% para AK y 14.8 para Mg-AK. 3) En el EEG se registró una latencia promedio de 5.7 min para las primeras descargas en AK y de 29.8 min para Mg-AK. 4) En los resultados de morfometría se observó disminución significativa en el área y perímetro del grupo AK con respecto al control. Así mismo, en el grupo Mg-AK también hubo disminución significativa con respecto al control, excepto para el área de CG donde ambos grupos fueron similares. Entre el grupo AK y Mg-AK no hubo cambios con relación al área de CP ni en el perímetro de CG, pero si fue significativa para el perímetro de CP, donde AK era menor que Mg-AK y para el área de CG, donde AK era mayor que Mg-AK. Estos resultados sugieren que a nivel de daño neuronal existe cierto grado de protección por parte del Mg^{2+} , pero para saber si tiene potencial como tratamiento médico, es necesario determinar las dosis y los tiempos de administración más adecuados.

MARCO TEORICO

EPILEPSIA Y DANO NEURONAL

El desarrollo de la presente tesis se dividió en tres etapas: Conducta, registro electroencefalográfico y morfometría del hipocampo. Se expondrán los resultados en ese orden, para luego conjuntar la información y exponer las conclusiones.

En la metodología de este trabajo se utiliza la morfometría asistida por computadora, que es una técnica de reciente aplicación, y que nos permitirá valorar su utilidad.

1.1. EPILEPSIA

Las epilepsias son una familia de trastornos neurológicos que tienen en común una interrupción transitoria, recurrente y autosostenida de las funciones normales del cerebro y una activación simultánea hipersincrónica de una gran población de neuronas de una región dada o de todo el cerebro (Dicher y col., 1987).

Se han evaluado muchos agentes anticonvulsivos, buscando que:

-Puedan activar procesos antagónicos contra los agentes que

provocan crisis.

-Eliminen los efectos de los agentes que inducen las crisis.

-Impidan la activación del principio que puede precipitar una crisis.

El término Status Epiléptico (SE) se emplea siempre que una crisis es continua por varias horas o sólo se interrumpe por intervalos breves, de modo que se considera como un estado epiléptico fijo y durable.

Las bases moleculares y celulares de los síndromes de epilepsia humana permanecen a nivel de conjeturas. Las hipótesis más aceptadas son: Defectos en la conductancia iónica a través de la membrana ó en los mecanismos de transporte, defectos en los procesos sinápticos inhibidores de GABA y una acción sináptica excitadora anormal.

Existe evidencia en animales y en humanos de anomalías adquiridas en la neurotransmisión de aminoácidos excitadores que pueden participar en los patrones anormales de descarga neuronal. Hay dos puntos de vista que parecen significativos en la supresión de crisis, una posibilidad es actuar postsinápticamente sobre los receptores para disminuir la excitación inducida por glutamato, y la otra es disminuir la liberación sináptica de glutamato y aspartato.

Los agentes que actúan sobre la adenosina o los receptores de GABA-B disminuyen la liberación de glutamato in vitro, pero no tienen una actividad anticonvulsiva significativa, probablemente debido a su acción predominante en otros sitios. El LAMOTRIGINE bloquea la liberación de glutamato y muestra actividad anticon-

vulsiva en un amplio rango de modelos animales (Weldrum, 1991).

Un estímulo continuo en el hipocampo establece una condición de SE límbico autosostenido al que le siguen cambios neuropatológicos, tales como esclerosis, similar a la que se observa en pacientes epilépticos.

Basándose en datos electrofisiológicos, se sugiere que una disminución de la inhibición mediada por GABA, una alteración en la sensibilidad a los iones extracelulares, o ambas, pueden jugar un papel en el desarrollo de estas crisis (Lothman y col., 1990).

La limitación que existe al estudiar la epilepsia en humanos, mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos ha creado la necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia que semejen la patología humana.

Algunos de los más importantes avances conceptuales y terapéuticos en el conocimiento de las epilepsias en los pasados 40 años provienen de estudios experimentales. Es deseable contar con un modelo animal en el que se produzcan crisis que asemejen a las observadas en la clínica. Dado que la conducta animal y la humana tienen considerables diferencias, muchas veces no es posible evaluar satisfactoriamente las manifestaciones conductuales en los modelos experimentales de epilepsia, sobre todo si hay ausencia de actividad motora. En estos, el criterio principal está dado por la identificación de las manifestaciones eléctricas del sistema nervioso. La administración de sustancias convulsionantes por vía sistémica es un procedimiento frecuentemente empleado en los estudios experimentales de epilepsia.

1.2. HIPOCAMPO

En los roedores, la formación hipocámpica se encuentra adyacente a las paredes ventroposterior y ventrolateral de la corteza cerebral. El hipocampo es una estructura que presenta una organización laminar, claramente limitada, de tal manera que en una sección transversal se puede representar la estructura completa.

En el hipocampo se pueden distinguir tres grandes regiones conocidas como: El cuerno de Ammón, el giro dentado y el subículo.

En la fig. 1 se observa la anatomía del hipocampo con sus tres regiones.

El cuerno de Ammón se subdivide en seis estratos con citoarquitectura propia:

-Alveus. Es el estrato más externo, tiene fibras aferentes y eferentes a la estructura.

-Orisus. Con fibras como el anterior, células en cesta y las dendritas basales de las células piramidales.

-Piramidal. Es el estrato donde se encuentran las células piramidales e interneuronas inhibitoras.

-Radiado. En este se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales.

-Lacunoso-molecular. Contiene arborizaciones de las dendritas apicales de las células piramidales, además de las interneuronas y fibras aferentes.

El estrato piramidal a su vez se ha subdividido en regiones según las diferencias citoarquitectónicas en: CA1, CA2, CA3 y CA4.

El giro dentado tiene una estructura trilaminar constituida por las siguientes capas:

1. Molecular. Es la capa más superficial, en esta se encuentran

las dendritas de las células granulares.

2. Granular. Con células granulares cuyos axones son denominados "fibras musgosas" por la cantidad de varicosidades que presentan, estas fibras se proyectan hacia la región CA3.

3. Hiliar. Contiene neuronas polimórficas, fusiformes y piramidales modificadas, el tipo neuronal más común son las "células musgosas".

El subículo es la otra parte de la formación hipocámpica, es una continuación de la corteza entorrinal que presenta una transición celular (fig. 1).

1.3. DAÑO NEURONAL

Es necesario analizar la arquitectura neuronal, para poder comprender las situaciones de anormalidad en el tejido nervioso, por ello es útil recurrir a la neurocitología.

1.3.1. NEUROCITOLOGIA Y SU APLICACION AL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA

Existen varios métodos para analizar el daño en el tejido nervioso. Los métodos de neurocitología se dividen en dos categorías generales: Métodos clásicos y métodos contemporáneos.

Entre los métodos clásicos encontramos las tinciones de Nissl y de Golgi, así como las técnicas de microscopía electrónica.

Los métodos contemporáneos se desarrollaron a partir de la década de los 1970, y entre ellos se encuentran la inmunocitoquímica, histoquímica, autorradiografía, la marcación retrógrada y anterógrada y la morfometría cuantitativa asistida por computadora.

Con los métodos clásicos se obtiene información básicamente descriptiva, con poco significado funcional (Ribak, 1986). A

principios de la década de los 1970 los neuroquímicos y fisiólogos se interesaron en la morfología. El estudio interdisciplinario estimuló el avance de los métodos, llegando hasta la aplicación de las computadoras para analizar los datos.

1.3.2. LA MORFOMETRIA ASISTIDA POR COMPUTADORA

La morfometría cuantitativa ha realizado avances sustanciales tras la aplicación de computadoras al análisis de datos morfológicos. Las mediciones asistidas por computadora tienen muchas ventajas sobre los métodos de conteo manuales ya que permiten una operación más rápida, análisis más detallados y la capacidad de almacenar y manipular datos para análisis estadísticos y reconstrucciones tridimensionales de estructuras con morfología compleja.

1.3.3. CAMBIOS MORFOLOGICOS EN LA EPILEPSIA

La mayor parte de lo que se conoce sobre la neuropatología del cerebro epiléptico se debe al estudio de numerosos y diferentes modelos animales que han sido analizados con métodos neurocitológicos. En la mayoría de los casos de epilepsia focal se ha observado pérdida neuronal y gliosis.

De acuerdo a una revisión realizada por Ribak (1986), en una gran cantidad de estudios descriptivos con métodos clásicos y contemporáneos se ha observado pérdida neuronal, esclerosis y gliosis en el hipocampo tanto de humanos enfermos, como de animales con epilepsia experimental.

Hipocampo de la Rata

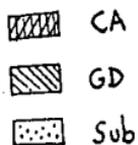
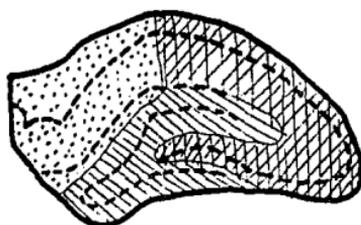


Fig. 1. Esquema de un corte transversal de hipocampo de rata que muestra las tres regiones que se distinguen en esta estructura según su diferenciación citoarquitectónica: (CA) Cuerno de Ammón; (GD) giro dentado; y (Sub) subículo.

1.3.4. NEUROTOXICIDAD DEL GLUTAMATO

Se desconocen los mecanismos celulares por los cuales una exposición excesiva al glutamato puede llegar a producir daño neuronal. Hace más de una década se propuso la hipótesis de que la neurotoxicidad al glutamato es consecuencia directa de una excitación neuronal excesiva (hipótesis de la neurotoxicidad). Recientemente, se ha hipotetizado que un influjo de calcio disparado por exposición al glutamato debe mediar la neurotoxicidad (hipótesis del calcio). Una prueba básica para discriminar estas hipótesis determinaría la dependencia de la neurotoxicidad por glutamato.

La hipótesis de la excitotoxicidad predice que la neurotoxicidad por glutamato depende en forma crítica de la presencia de sodio extracelular, ya que este ión parece mediar la neuroexcitación del glutamato en el sistema nervioso central. La hipótesis del calcio predice que la neurotoxicidad del glutamato debería depender de la presencia de calcio extracelular.

Se sugiere que la neurotoxicidad al glutamato en neuronas corticales puede ser separada en 2 componentes, con base en las diferencias, curso temporal y la dependencia iónica. El primer componente, caracterizado por edema neuronal, ocurre tempranamente, es dependiente de sodio y cloro extracelular. El segundo componente, caracterizado por la desintegración neuronal, ocurre después, depende del calcio extracelular, puede ser mimetizado por el ionóforo de calcio A23187, y posiblemente mediado por un influjo de calcio (Choi y col., 1987).

La modulación de la corriente de Ca²⁺ por el glutamato y sus

análogos fue investigada en cultivos de neuronas del hipocampo. En presencia del receptor de glutamato unido con antagonistas del canal iónico, todos los análogos examinados causaron una pequeña depresión reversible o no tuvieron efecto sobre la corriente de Ca^{2+} . Las observaciones son consistentes con una interacción entre la proteína G acoplada con receptores a glutamato y canales de Ca^{2+} (Lester y col., 1990).

La movilización de calcio intracelular es disparada por un receptor a glutamato en células cultivadas del hipocampo. El quisqualato y L-glutamato pueden disparar la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, principalmente por activación de un receptor a glutamato acoplado a una proteína G sensible a la toxina pertussis (Furuya y col., 1989).

Se sugiere que un incremento en el contenido de glutamato extracelular y de aspartato en el hipocampo, inducido por isquemia, puede ser uno de los factores causales en el daño a ciertas neuronas observado después de la isquemia (Benveniste y col., 1984).

ACIDO KAINICO

2.1. CARACTERISTICAS GENERALES

El AK se extrae del alga marina Digenea simplex, que crece en la costa de las islas situadas en el mar del Este de China. Un extracto de esta alga marina fue usado en Japón como antihelminítico desde el siglo XIX. En 1953, el grupo del Dr. Takemoto aisló un componente del extracto acuoso de la Digenea simplex al que le llamó ácido kainico (AK), que en japonés significa literalmente "el fantasma del mar" (Takemoto, 1978).

El AK es un excitador potente, análogo del ácido glutámico (Shinozaki y col., 1970), que destruye las neuronas en el núcleo arcuato (Olney y col., 1974) y estriado (Mc Geer y col., 1978; Schwarz y col., 1977), mientras que las fibras que pasan o llegan a estas regiones no son afectadas.

La poderosa acción excitatoria del AK ha sido descrita en varias regiones del cerebro (Lothman-Collins, 1981; Miller y col., 1990).

2.2. EL AK COMO MODELO DE STATUS EPILEPTICO (SE)

Revisiones realizadas por Nadler (1981), sugieren que las lesiones que se producen a distancia del sitio de administración

del AK son semejantes a la patología asociada con epilepsia del lóbulo temporal. En particular, ratas tratadas con el AK aplicado intracerebroventricularmente (ICV) muestran una pérdida exclusiva de neuronas piramidales del hipocampo en las áreas CA3 y CA4, acompañada por una gliosis marcada. Si se incrementa la dosis ICV de AK, también se produce pérdida de las neuronas de CA1 (Nadler y col., 1978).

En la rata adulta la administración parenteral de la toxina produce una crisis límbica y daño cerebral específico, que no ha sido reproducido por otros aminoácidos excitadores. Los signos clínicos producidos por la administración ICV o intraperitoneal (IP) de 10 mg/kg pueden ser divididos en varias fases. Durante los primeros 20-30 min. las ratas muestran conductualmente reposo, después acicalamiento, seguido por numerosas sacudidas de "perro mojado" (wet-dog shakes) por aproximadamente 30 min. La siguiente fase se caracteriza por la aparición de crisis límbica motora, en la que se observan movimientos faciales y masticatorios, temblor, erguimiento y pérdida del control motor (Ben-Ari, 1985). Las crisis se vuelven progresivamente más complejas y prolongadas, con una reducción de la pausa interictal. En la siguiente fase que dura de 1 a 2 horas, el animal presenta un status epiléptico (SE) caracterizado por descargas epilépticas continuas (Ben-Ari, 1985).

La actividad eléctrica de estructuras corticales y subcorticales presenta un correlato con las tres principales fases conductuales: Reposo, crisis límbica y SE, que corresponden respectivamente a: a) Descargas paroxísticas localizadas en el hipocam-

po; b) Afección de otras estructuras límbicas, por ejemplo la amígdala; c) Generalización a otras estructuras (Ben-Ari, 1985).

2.3. EFECTOS DEL AK EN EL SISTEMA NERVIOSO

Sperk y col. (1985) encontraron cambios conductuales, neuroquímicos e histopatológicos inducidos por la inyección sistémica de AK en varias dosis (3, 6 y 10 mg/Kg s.c.). Hay una relación positiva entre la dosis y los cambios neuroquímicos 3 horas después de la inyección (incrementos de los niveles de ácido 3, 4-dihidroxifenilacético y ácido 5-hidroxiindolacético, y disminución de los niveles de noradrenalina en las regiones cerebrales investigadas) con los cambios histopatológicos (atrofia, condensación de las células nerviosas y edema cerebral en todo el cerebro anterior) y la extensión de las alteraciones conductuales (inmovilidad, "wet-dog shakes" y crisis límbicas).

Algunas alteraciones tardías e irreversibles incluyen la pérdida de los receptores o marcadores enzimáticos de la descarboxilasa del ácido glutámico y de la acetilcolintransferasa, e histopatológicamente necrosis parenquimal incompleta y hemorragias. Sin embargo estos cambios fueron restringidos a pocas regiones cerebrales, las más importantes son el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal, piriforme y bulbo olfatorio, estos fueron vistos solamente en animales que experimentaron convulsiones severas. Se sugirió que las lesiones cerebrales irreversibles en este modelo animal de epilepsia límbica no son inducidas sólo por la acción directa del AK, sino que pueden ser causadas al menos en parte por mecanismos patogénicos adicionales y secundarios. Las alteraciones metabólicas regionales inducidas por administra-

ción sistémica de AK fueron investigadas en cerebros de rata. El estudio histoquímico reveló un pH ácido, que precede a la disminución selectiva del ATP en las estructuras límbicas. En el cuerno de Ammón, se ha encontrado una disminución selectiva de ATP en el subcampo dendrítico, como el stratum radiatum y/o el stratum oriens. Se ha sugerido que esta disminución selectiva de ATP en la dendrita está directamente relacionada a la neurotoxicidad del AK (Waniewski y col., 1990). El AK inyectado dentro del hipocampo reduce la glutamino sintetasa. Este efecto parece ser indirecto, al parecer producido por sus efectos neuronales (Waniewski y col., 1990).

En cuanto a los cambios histopatológicos, una a dos horas después de administrado parenteralmente el AK, se ha encontrado picnosis del pericarión neuronal y aumento de volumen de las dendritas (Olney y col., 1979). También se ha reportado edema pronunciado de los astrocitos, al menos con altas dosis. Estos efectos agudos se asocian con dilatación de organelos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. Una semana después de la administración parenteral del AK los cambios muestran la notable pérdida de neuronas, principalmente en el hipocampo, la amígdala y el lóbulo piriforme (Ben-Ari, 1985). Además, de la pérdida neuronal, hay pérdida de oligodendrocitos, desmielinización, formación de cicatrices astrogliales, hemorragias perivenosas y neovascularidad (Sperk y col., 1983).

En cuanto a la reacción glial que ocurre como consecuencia de lesiones por AK en el hipocampo de ratas, se han medido las propiedades electrofisiológicas de las células gliales reactivas

(Burnhard y col., 1990).

Siguiendo las observaciones de Simon y col. (1976), se ha confirmado la presencia en el cerebro de receptores específicos para el AK (Swarcz y col., 1979). Se han descrito dos tipos de sitios: Los de alta y los de baja afinidad, que se distinguen por sus distintas constantes de asociación y disociación (London y col., 1979). El AK se disocia en pocos segundos en los sitios de baja afinidad mientras que en los de alta afinidad la disociación ocurre en el lapso de una hora o más. El estriado, el hipocampo y las regiones del cerebro anterior son particularmente ricas en sitios específicos de alta afinidad mientras que más del 90% de los sitios de unión del cerebelo, puente y bulbo raquídeo son de baja afinidad.

Represa y col. (1989) encontraron alta afinidad postmortem en los receptores al AK en la región CA3 y en la capa molecular interna de la fascia dentata de niños con crisis generalizadas. Geddes y col. (1990) observaron un decremento en la densidad de receptores a NMDA y de AK en el campo CA1 (como posible reflejo de la pérdida de células piramidales), y un incremento en la densidad de receptores a NMDA y de AK en el giro parahipocámpico.

En un estudio McDonald y col. (1991) encontraron mayor unión a los receptores a NMDA en el giro dentado (quizá reflejando una pérdida celular no tan severa).

La distribución de los sitios de unión para el AK han sido descritos recientemente utilizando técnicas autorradiográficas (Monaghan y col., 1982; Unnerstall y col., 1983). El más alto nivel de sitios específicos de unión en el cerebro está localiza-

do en el estrato lúcido de CA3 del hipocampo, es decir la región inervada por fibras musgosas que se originan de la capa granular de la fascia dentada. La densitometría cuantitativa muestra que la densidad de los granos de plata (que representan la unión al AK) en la región de las fibras musgosas es 10 veces más alta que en las capas adyacentes (Berger y col., 1983). La autorradiografía también reveló que otras regiones del cerebro son ricas en sitios de unión para el AK, como la amígdala, las capas profundas de la corteza piriforme, el estriado y el núcleo reticular del tálamo.

Se investigó la ontogenia de la unión del AK tritiado en el cerebro de la rata mediante técnicas autorradiográficas. Se encontraron sitios de unión en: Tálamo ventral, hipocampo, estriado y bulbo olfatorio desde el primer día después del nacimiento. La unión aumenta progresivamente con la edad, alcanzando su nivel máximo a los 21 días de vida, las regiones con alta densidad de receptores en adultos son: CA3, el giro dentado y el estriado. En cambio hay zonas donde la afinidad primero se eleva y luego disminuye (tálamo ventral con su nivel máximo de afinidad a los 3 primeros días después del nacimiento).

Hay diferencias en la afinidad y en la máxima capacidad de unión según sugieren algunos estudios de saturación en ratas de 14 días (Miller y col., 1990).

2.4. MECANISMOS DE ACCION DEL AK

Varios estudios han mostrado que el glutamato endógeno está involucrado en la neurotoxicidad del AK. Una reducción en la glutamino-sintetasa provocada por AK puede deteriorar la capaci-

dad de los astrocitos para metabolizar glutamato. Tal deterioro puede contribuir a la muerte celular mediada por glutamato después de la exposición al AK (Kobayashi, y col., 1990). Usando el método de la autorradiografía con 2-deoxiglucosa, se ilustra el papel central del hipocampo en la fase inicial que sigue a la administración parenteral de AK, ya que hay una elevación en el consumo de glucosa en la formación hipocámpica principalmente, así como en el complejo amigdaloides y el complejo mediodorsal del tálamo (Tremblay y col., 1984).

El AK produce directamente una despolarización irreversible que está asociada con una reducción en la resistencia de salida y que depende de la presencia de sodio extracelular (McDonald y col., 1982). También se presenta un notable incremento en la permeabilidad del calcio hacia las neuronas afectadas por AK (Berdichevsky y col., 1983; Coyle, 1983; Choi, 1987). Esto realmente puede explicar el fuerte incremento en la conductancia y la potente despolarización, ya que el calcio lleva más corriente que el sodio.

Se ha observado que en el área CA3, una zona altamente gliótica, el potencial de reposo es muy similar al de los astrocitos no reactivos. Se sugiere que las células gliales reactivas no tienen canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, o son de baja densidad (Burnhard y col., 1990).

Parece imposible afectar el automatismo inducido por AK durante la ontogénesis. Si consideramos los automatismos como un fenómeno relacionado a la excitación límbica local, podría significar que ni la carbamazepina ni el fenobarbital pueden afectar este foco.

Por el contrario, el patrón de crisis clónicas fue más sensible a la terapia. Se observaron resultados similares con clonazepam y valproato en este modelo (Velisek y col., 1989). La sensibilidad a las crisis durante la ontogénesis debe estar conectado con la maduración de los sitios de unión del AK (Ben-Ari, 1985), que se ha visto desde la 3era semana después del nacimiento de la rata (Velisek y col., 1989).

Waniewski (1990) inyectó AK en el hipocampo de ratas y midió la glutamino sintetasa para determinar si los astrocitos estaban involucrados en los primeros efectos de este agente neurotóxico, la glutamino sintetasa se redujo en un 38% después de 24 horas de haber aplicado 4 nmol de AK en esta región. La reducción en la glutamino sintetasa no se debió a la inhibición directa de la enzima cerebral. Al exponer cultivos de astrocitos al AK por 24 horas no hubo evidencia de gliotoxicidad y ningún cambio en la actividad de la glutamino sintetasa. El efecto del AK intrahipocámpico sobre la glutamino sintetasa parece ser producido secundariamente. Una reducción en la glutamino sintetasa por AK puede deteriorar la capacidad de los astrocitos para metabolizar el glutamato. Tal deterioro podría contribuir a la muerte celular mediada por glutamato después de la exposición al AK (Waniewski, 1990).

MAGNESIO

3.1. CARACTERISTICAS GENERALES

El Mg^{2+} es un metal que juega un papel fisiológico esencial en la regulación y ejecución de numerosas funciones celulares tales como el mantenimiento de la integridad de la membrana celular o como cofactor de más de 300 enzimas, además el Mg^{2+} tiene un papel importante en los procesos fisiopatológicos asociados a isquemia cerebral (Warner, 1989).

3.2. IMPORTANCIA PARA EL SISTEMA NERVIOSO

Existe una relación entre los cambios de concentración del K^{+} , Mg^{++} y Ca^{++} extracelular sobre la liberación de transmisores en el S.N.C., el Mg^{2+} tiende a bloquear la transmisión sináptica, y a nivel del hipocampo se ha visto que la respuesta difiere según la región de que se trate (Rausche y col., 1990).

3.3. FARMACOCINETICA Y METABOLISMO

El líquido cefalorraquídeo contiene aproximadamente 3 mg/100 ml de Mg^{2+} , la deficiencia de Mg^{2+} produce disfunción muscular que se manifiesta como hiperexcitabilidad con temblor y convulsiones, en

ocasiones también trastornos de la conducta.

La absorción de Mg^{2+} en la dieta no está relacionada a su requerimiento, puede ser absorbida mayor cantidad que la que se demanda normalmente, asimismo se excreta rápidamente por la orina. Funcionalmente existe un antagonismo entre el Mg^{2+} y el calcio para la regulación de la permeabilidad celular. Los niveles de Mg^{2+} sérico no pueden correlacionarse bien con su concentración intracelular (Katz y col., 1990)

3.4. PROPIEDADES COMO ANTIEPILEPTICO

El $MgSO_4$ inyectado intracerebralmente produce anestesia y relajación durante varias horas (Aikawa, 1963). La deficiencia en Mg^{2+} produce crisis convulsivas en varias especies (Kruse y col., 1932). Los iones de Mg^{2+} están implicados en el bloqueo de canales catiónicos en los receptores postsinápticos de aminoácidos excitadores, y hay antagonistas competitivos de estos aminoácidos capaces de atenuar o prevenir crisis epileptiformes, como las inducidas por oxígeno hiperbárico (Katz y col., 1990). El Mg^{2+} disminuye la frecuencia de descarga provocada por penicilina G en la producción de focos epilépticos (Borges-Gucer, 1978), Koontz-Reid, (1985) encontraron que el Mg^{2+} no inhibe las crisis por penicilina. Se ha postulado que la barrera hematoencefálica (BHE), bloquea el paso de este ión al cerebro (Kemeny y col., 1961; Oppelt y col., 1963), sin embargo se puede interrumpir de manera local en la cercanía de un foco epiléptico o de manera generalizada al ocurrir un SE (Bauer-Leonhardt, 1956; Lending y col., 1959; Lee-Olsewski, 1961; Lorenzo y col., 1967, 1972;

Suzuki y col., 1984; Bolwig y col., 1977a; Nitsch y col., 1985).

Se ha demostrado que la BHE permanece intacta para la peroxidasa del rábano incluso cuando han comenzado las crisis por oxígeno hiperbárico, aunque la permeabilidad a los iones podría estar siendo modificada (Katz y col., 1990).

Por otro lado, se han realizado estudios donde se muestra que el Mg^{2+} al ser aplicado de manera tóptica deprime la acción sináptica (Katz y col., 1963) aunque no se explica claramente el mecanismo de cómo el Mg^{2+} suprime la crisis.

Se le ha asignado al calcio un papel principal como regulador de procesos enzimáticos intraneuronales, las alteraciones de la excitabilidad neuronal y en la producción de crisis (Berdichevsky y col., 1983; Coyle, 1983). La entrada de calcio a las neuronas es regulada por la acción de aminoácidos excitadores específicos mediante canales asociados a receptores o complejos canal-receptor. El Mg^{2+} podría tener como mecanismo anticonvulsivo el bloqueo de este tipo de canales (Katz y col., 1990).

Se ha registrado actividad epileptiforme extra e intracelular en cortes de hipocampo perfundidos con líquido cefaloraquídeo libre de Mg^{2+} . Los datos obtenidos muestran que este tipo de actividad epileptiforme ocurre cuando los potenciales inhibidores GABAérgicos operan y en CA1 la actividad epileptiforme depende de las conductancias activadas por NMDA. Los experimentos también indican que los receptores a NMDA deben estar involucrados en la circuitería neuronal responsable de IPSP (potenciales postsinápticos inhibidores) hiperpolarizantes generados por las neuronas piramidales de CA1 (Tancredi y col., 1990).

La excitabilidad postsináptica se normaliza después de una breve

exposición a un medio libre de Mg^{2+} en ratones normales y ratones epilépticos (Psarropoulou y col., 1990).

Se investigaron los receptores de NMDA en la transmisión sináptica de las colaterales de Schaffer en rebanadas de hipocampo, en presencia y ausencia de Mg^{2+} . En un medio libre de Mg^{2+} aumentó la población de espigas. Los datos obtenidos sugieren que la participación de los receptores a NMDA en la transmisión sináptica en el hipocampo de ratas depende de las concentraciones extracelulares de Mg^{2+} (Coan y col., 1985).

Según registros de voltaje locales, los receptores a NMDA están activos tónicamente en rebanadas de hipocampo. El nivel de la concentración de glutamato en el fluido extracelular causa esta acción tónica. Los receptores a NMDA son sensibles a voltaje, la activación de estos receptores facilita el acoplamiento entre la entrada sináptica excitadora y la descarga de potencial de acción somático en estas neuronas (Sah y col., 1989).

Katz y col., (1990) expusieron ratas a una presión de oxígeno tóxica para el S.N.C., el criterio de toxicidad fue la aparición de descargas en el registro EEG, este estudio muestra una acción protectora definitiva del $MgSO_4$ parental sobre el SNC para la

hiperexcitabilidad producida por el oxígeno. También se demostró que la BHE permanece intacta durante las crisis por oxígeno hiperbárico, sin embargo, su permeabilidad a los iones podría estar alterada.

Los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales se retarda o aminora el daño en el tejido después de un trauma al S.N. son especulativos. McIntosh y col., (1988) han mostrado que el daño

traumático en el cerebro de las ratas causa un rápido deterioro en el tejido libre de Mg^{2+} intracelular y total, las concentraciones de Mg^{2+} se relacionan de manera significativa con la severidad del daño. De acuerdo a la prueba, se evaluó la relación entre el Mg^{2+} y el daño traumático al cerebro, la deficiencia en Mg^{2+} controlada por dieta, agrava de manera significativa la disfunción neurológica e incrementa la mortalidad que sigue al daño, cuando se compara con los controles alimentados de forma normal, y en los animales pretratados con sulfato de Mg 0.1 mEq 15 min antes del daño cerebral previene la caída en las concentraciones de Mg^{2+} intracelular en cuanto al estado bioenergético celular y en relación al trauma neurológico crónico. Estas observaciones combinadas, sugieren que las alteraciones en las concentraciones de Mg^{2+} intracelular en el cerebro después del trauma pueden jugar un papel importante en la fisiopatología del daño traumático cerebral (McIntosh y col., 1988).

Ratas macho fueron sometidas a tratamiento durante 12 horas con noradrenalina en tabletas implantadas subcutáneamente con una tasa de liberación de 3.4 ± 0.24 microgramos/min. El incremento constante de la norepinefrina en el plasma ocasionó choque glicogénico hepático después de 12 horas. Se administró glucosa 9 horas después de la operación y previno la liberación de epinefrina (E) de la médula. Esto significa que no hubo hipoglicemia pues antes de que se produjera el choque del glicogénico hepático, se observó hipersecreción de epinefrina medular. Se ha mostrado que un pretratamiento oral de 9,000 ppm de Mg^{2+} (MAH, Verla pharm) por 10 días constituye un método más eficaz de inhibición de la secreción medular de catecolaminas (Ca), conser-

vando la epinefrina y la norepinefrina en el interior de la glándula. La acción preventiva del Mg^{2+} se ejerce probablemente tanto a nivel del hígado como en la médula adrenal (Porta y col., 1990).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SE causa un daño neuronal severo e irreversible en ciertas zonas del cerebro, principalmente en el sistema límbico. Un modelo experimental que se acerca al tipo de daño provocado por SE es el de ácido kainico (AK).

El Mg^{2+} se ha propuesto como un agente eficaz para inhibir las convulsiones inducidas por penicilina (Borges, 1978), que aminora la lesión por trauma experimental al cerebro de la rata (McIntosh y col., 1988), retarda las crisis convulsivas provocadas por oxígeno hiperbárico (Katz y col., 1990), y la deficiencia en Mg^{2+} se ha utilizado como modelo experimental de epilepsia (McIntosh y col., 1988; Lewis y col., 1989; Morris y col., 1990). Sin embargo, se ha investigado el inicio de crisis inducidas por lidocaina en ratas y no hubo disminución en el daño isquémico al cerebro, por lo cual se concluyó que la administración de Mg^{2+} tiene poco potencial como anticonvulsivo (Warner, 1989), en otro trabajo no se encontró inhibición por Mg^{2+} de las convulsiones inducidas por penicilina (Koontz, 1989), también se ha reportado que la administración de Mg^{2+} en dosis altas no controla el

status mioclónico (Roberts y col., 1988) y que no es eficiente en el control de crisis eclámpicas (Kaplan, y col., 1988). Sin embargo en un estudio posterior se afirma que el sulfato de Mg^{2+} es el anticonvulsivo ideal en el tratamiento de crisis por preeclampsia-eclampsia (Sibai, 1990).

Es importante que continúen las investigaciones y se aclaren las controversias en torno al papel del Mg^{2+} en la epilepsia, también que se evalúe su efecto como neuroprotector y como anticonvulsivo, esto último reviste un interés especial para la medicina. En este trabajo se intenta saber si el Mg^{2+} juega un papel en la protección de las neuronas contra el daño provocado por el SE, induciendo este estado mediante AK administrado intraperitoneal e intracerebroventricular

HIPOTESIS

El Mg^{2+} deprime la neurotransmisión excitadora en el SNC, por lo tanto, si se administra como tratamiento previo a las crisis por AK, se obtendrá una reducción en la manifestación de las crisis y de manera correspondiente menor pérdida en las neuronas piramidales del hipocampo.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto del Mg^{2+} en la protección neuronal contra el daño producido por SE inducido en la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el efecto del Mg^{2+} sobre las alteraciones inducidas por AK a nivel:
 - a) Conductual.
 - b) Electroencefalográfico.
 - c) Morfométrico.

- 2.- Determinar el espesor de las capas: CA1, CA3a, CA3b, CA3c, CA4, capa granular superior (CGsup), capa granular inferior (CGinf), zona hiliar superior (ZHsup), zona hiliar inferior (ZHinf), capa molecular superior (CMsup), capa molecular inferior (CMinf), y determinar el área y perimetro de la capa piramidal (CP), capa granular (CG) y zona hiliar (ZH) del giro dentado (GD).

- 3.- Comparar los resultados obtenidos con microscopia y con la computadora para determinar si existen diferencias significativas entre ambas técnicas.

- 4.- Establecer un parámetro de comparación y proponer una metodología para evaluar la pérdida neuronal.

METODOLOGIA

MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

-98 Ratas Wistar macho, con un peso de 230-405 g.

SUBSTANCIAS

- Acido Kainico (Sigma Chemicals)
- Sulfato de Magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (J.T. Baker Analyzer)
- Solución fisiológica de cloruro de sodio (Laboratorios Pisa)
- Solución glucosada (Laboratorios Pisa)
- Heparina (Helber de México)
- Pentobarbital Sódico 0.063 g (Smith Kline)
- Formaldehído en solución al 10% (J.T. Baker Analyzer)
- Ketamina (Rhône Merieux de México)

MATERIAL Y EQUIPO PARA HISTOLOGIA

- Acido acético (J.T. Baker Analyzer)
- Grenetina (J.T. Baker Analyzer)
- Violeta de Cresilo (Sigma Chemical Co.)
- Bálsamo de Canadá o resina sintética (Sigma Chemical Co.)

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Alcoholes graduales (J.T. Baker Analyzer)
- Xileno (J.T. Baker Analyzer)
- Agua destilada
- Alcohol 80% acidulado (J.T. Baker Analyzer)
- Navaja de microtomo
- Pincel
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Charolas para cortes
- Microtomo Sartorius-Werke, modelo 27

MATERIAL Y EQUIPO PARA PERFUSION Y CIRUGIA

- Mango de bisturí del No. 4
- Hojas de bisturí No. 20
- Tijeras
- Pinzas de sujeción
- Espátula
- Jeringas de 3 y de 1 ml
- Venoclisis con aguja
- Guillotina para ratas
- Papel absorbente
- Fracos de boca ancha
- Cronómetro
- Balanza analítica
- Charola de peltre para perfusión
- Tela adhesiva

-Instrumento estereotáxico David Kopf modelo 21

MATERIAL Y EQUIPO PARA IMPLANTES Y REGISTRO EEG

-Pieza de mano para odontólogo Foredom, modelo 21

-Fresas Meisinger

-Tornillos

-Electródos de corteza unipolares de acero inoxidable

-Alambre de estaño

-Grasa para soldar

-Cautín

-Polígrafo Grass Modelo 78D

-Resina epóxica

-Conectores hembras y machos

-Cables de conexión

-Resina acrílica

-Gasas

-Solución salina con antibiótico

-Isodine

-Estreptomina

-Microjeringa Hamilton de 10 microlitros

-Microinyector micrométrico

-Gelfoam

-Cera para hueso

-Agujas para suturar

METODOS

Se emplearon 92 ratas Wistar macho de 230-405 g, que se dividieron en 4 grupos: 1) Control (sin tratamiento); 2) (AK) AK 10 mg/kg i.p.; 3) (Mg-AK) MgSO₄ 3 mM/kg en 2 ml i.p., y 30 min después se inyectó AK 10mg/kg i.p.; 4) (Mg-AKicv) MgSO₄ 3 mM/kg en 2 ml i.p. y 30 min después AK 5.2 nMolas en 5 microlitros de salina durante 30 min. Se efectuaron 3 valoraciones: A) Valoración conductual; B) Registro electroencefalográfico; C) Morfometría asistida por computadora del hipocampo; y al final se calculó la tasa de mortalidad. Los procedimientos fueron los siguientes:

A) VALORACION CONDUCTUAL

La valoración conductual se realizó en dos grupos: AK (n=18) como testigo, y Mg-AK (n=17) como grupo experimental. Al grupo Mg-AK, se le administró una inyección i.p. de sulfato de Mg (MgSO₄) 3 mM/kg en 2 ml i.p., se dejó pasar un intervalo de 30 min, al otro grupo se le administró solución salina y luego se administró a cada grupo una inyección i.p. de AK 10 mg/kg. Se cronometró la latencia en minutos a la primera sacudida (wet-dog shake) y a la primera crisis mioclónica.

B) REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO (EEG)

se emplearon 12 ratas de 250-350 g, AK (n=6), y Mg-AK (n=6)

1) IMPLANTE DE ELECTRODOS

Se administraron 40 unidades de Ketamina (Imalgen) via intramuscular. Anestesiado el animal se montó en el aparato estereotáxico (David Kopf, modelo 21) (Fig.2.), cuidando que los lápices quedaran equidistantes y bien ajustados para que la cabeza no presentara movimientos laterales, los movimientos verticales se evitan con un sostén adicional en el paladar. Se rasuró la parte superior de la cabeza, se limpió el área con isodine y solución salina con estreptomycin. Se realizó una incisión de aproximadamente 3.5 cm en la línea media de la cabeza, se limpió el tejido que cubre el cráneo. Se localizó la sutura bregma, se marcaron los 3 puntos para los electrodos y 2 trépanos contralaterales para los tornillos de sujeción de la base de implante. Con una pieza de mano para odontólogo se realizaron tres pequeñas trepanaciones correspondientes a los electrodos de corteza, y dos trépanos para los tornillos de sujeción. Se utilizó resina acrílica para mantener fijos los electrodos a las terminales del conector, uno como tierra y los otros dos para registro, luego se acomodaron los alambres de los electrodos alrededor del conector y se cubrieron con una capa de resina acrílica, se suturó la incisión hasta los límites del conector, se limpió la herida con solución salina y estreptomycin. Finalmente se colocó la rata en una jaula de recuperación con alimento y agua durante 3 días antes de realizar el registro electroencefalográfico.



Fig.2. Colocación de la rata en el aparato estereotáxico para el implante de electrodos.

2) REGISTRO (EEG)

Se registró la actividad eléctrica en la corteza motora utilizando electrodos bipolares fabricados a partir de una punta de aguja de acero inoxidable a la cual se soldó un alambre conductor. Se utilizó un poligrafo Grass modelo 78D, con velocidad del papel a 10 mm/seg. Se tomó un registro continuo y simultáneo de ejemplares de los grupos control, AK y Mg-AK, anotando el momento de la inyección, la latencia a la primera manifestación epileptiforme y a la primera crisis, la duración del registro fue de 2 a 4 horas.

C) MORFOMETRIA

1) HISTOLOGIA

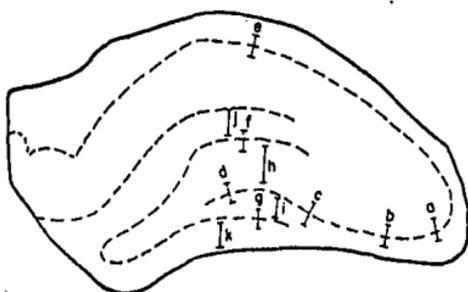
Siendo AK (n=6), Mg-AK (n=8), control (n=7). Se perfundieron las ratas inyectadas i.p. con las dosis de AK y Mg-AK antes indicadas, después de 7 días se anestesiaron con 50-60 unidades de Anestésal, se realizó con el bisturí una incisión lateral al esternón, se abrió la caja torácica con ayuda de dos pinzas de sujeción, se colocó la aguja de la venoclisis en el ventrículo izquierdo del corazón y se cortó la aurícula derecha para desalojar la sangre. Se perfundió cada animal con 250-300 ml de solución salina a la que se le agregó Heparina para evitar la coagulación. Luego se sustituyó la solución salina con formol al 10% para fijar por vía intracardiaca el sistema nervioso. Se extrajo el cerebro y se colocó en un frasco con formol al 10%. Se realizaron cortes de 120 micras en un microtomo de congela-

ción, los cortes se montaron en laminillas o portaobjetos previamente preparados con gelatina y se dejaron secar por tres días. Se tñieron con Violeta de Cresilo según la Técnica de Nissl. Se realizaron observaciones y mediciones al microscopio de campo claro con ayuda de una rejilla graduada, las observaciones se centraron en el hipocampo, específicamente al nivel que se muestra en la Lámina No. 23 del Atlas de la Rata de Paxinos (Paxinos y col., 1985). En este corte se realizaron las mediciones de espesor en milímetros de las siguientes capas del hipocampo: La CP de los campos CA1, CA3 y CA4, la capa de células granulosas (superior e inferior), ZH (superior e inferior), y la capa molecular (superior e inferior).

2) MEDICIONES LINEALES

Se obtuvieron mediciones lineales de espesor en los estratos del hipocampo de 7 ratas normales: Capa de células piramidales (CP) en los campos CA1, CA3a, CA3b, CA3c, CA4, ZHsup, ZHinf, CGsup, CGinf, CMsup, y CMinf (Fig.3.). Se utilizó un microscopio de campo claro y un objetivo 10X con una rejilla calibrada en milímetros, los resultados que se obtuvieron con el microscopio se compararon con mediciones equivalentes obtenidas mediante la computadora, estos resultados se expresaron en milímetros y se calculó la desviación estándar (DE).

Mediciones en el Hipocampo de la Rata



- | | |
|--|----------------------------|
| a) Células piramidales de CA3a | g) inferior |
| b) CA3b | h) Zona hilar superior |
| c) CA3c | i) inferior |
| d) CA 4 | j) Capa molecular superior |
| e) CA 1 | k) inferior |
| f) Capa de células granulosas superior | |

Fig. 3. Esquema de un corte transversal de hipocampo de ratona donde se señalan las mediciones lineales realizadas con rejilla calibrada y con microscopio de luz.

3) MORFOMETRIA ASISTIDA POR COMPUTADORA

3.1 CAPTURA DE IMAGENES

Una vez obtenidas las laminillas, fueron capturadas por medio de una cámara de video (CCD) montada sobre un microscopio y conectada a una computadora 386 mediante una tarjeta digitalizadora TARGA-16 plus (Truevision), estas imágenes se procesaron para obtener mayor definición y realizar las mediciones mediante el programa ImagePro-Plus (Media Cybernetics). Se realizaron mediciones de área y perímetro de manera semiautomática e interactiva en las siguientes capas del hipocampo: Capa de células piramidales del asta de Ammón, Capa de células granulosas y Capa hilar (Fig. 4). Se calibraron las mediciones mediante una rejilla graduada capturada por la computadora. Algunas de las imágenes capturadas resultaron con poco contraste por lo cual era difícil realizar los trazados del perímetro. Por lo tanto, estas imágenes se manipularon aplicando filtros, el proceso que se siguió fue el siguiente: Captura de la imagen, se salvó completa, se formó una caja, se aplicaron filtros a la caja previa: Autoajuste, filtro pasa medias y promedio con la imagen original. Después se realizó un autotrazado del perímetro de cada una de las capas de células a medir (Fig. 5), y después se repitió el proceso de medición de área y perímetro a la misma imagen por duplicado como mínimo, luego se obtuvo la estadística descriptiva (especialmente la media, que es la reportada para cada imagen) de estas mediciones. Las mediciones de área y perímetro comprendieron: La CP, la CG, ZH, y la región hipocámpica, también se tomaron mediciones del ancho y largo del hipocampo para mantener el rango en cuanto a las variaciones interindividuales.

Mediciones de Area y Perimetro en el Hipocampo de la Rata

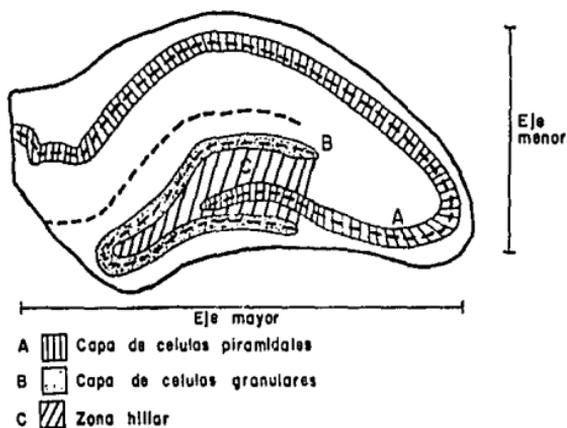


Fig. 4. Esquema de un corte transversal de hipocampo de ratona donde se indican las áreas y perímetros medidos con ayuda de una computadora.



Fig.5. Imágen que muestra el trazo del perímetro de la: (1) Capa de células granulares; (2) capa de células piramidales a partir de una laminilla capturada por la computadora.

Se descartaron algunos sujetos que estuvieran fuera del rango establecido.

4) INYECCION INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV) DE AK

Se fijó la rata al estereotáxico, después de inyectar 18 unidades de pentobarbital de sodio, se rasuró la rata de la misma forma que para el implante de electrodos, se localizó la sutura bregma como referencia para ubicar el ventriculo lateral izquierdo. Para la inyección de AK se utilizó un microinyector constituido por un tornillo micrométrico y un sujetador de microjeringa. Se empleó una microjeringa Hamilton de 10 microlitros unida por un tubo de polietileno con la punta de una aguja odontológica en la torre estereotáxica, la inyección de 5.2 nmolas de AK en 5 microlitros de salina se efectuó muy lentamente durante 30 minutos, se corrigieron coordenadas para el ventriculo lateral al nivel que marca la lámina No. 46 del atlas estereotáxico de la rata de Paxinos (Paxinos y col., 1982). Luego se realizó un trépano sin tocar la corteza cerebral. Se llenó la microjeringa con agua destilada y el tubo de plástico con la solución de AK mediante una jeringa de 1 ml, se conectó la microjeringa evitando la formación de burbujas, se movió el émbolo de la microjeringa hasta que apareciera una gota de solución por la punta de la aguja en la torre estereotáxica, conforme a las coordenadas estereotáxicas se introdujo la punta de la aguja hasta el ventriculo lateral y se inyectó. Después se retiró la aguja, se cubrió el trépano con cera para hueso o con gelfoam, se suturó la incisión, se limpió la herida con solución salina y estreptomici-

na y se dejó la rata en una jaula de recuperación.

En las ratas pretratadas con sulfato de Mg^{2+} se procedió de la misma manera que en los experimentos anteriores, inyectando una dosis de 3 mM de $MgSO_4$ i.p. 30 min antes de la inyección i.c.v. de AK.

Se perfundió después de 7 días, se fijó el cerebro, se congeló y se hicieron cortes de 120 micras de espesor, se tomó como referencia para ubicar el nivel de la medición a 4500-5000 micras de la comisura anterior (Figs. 6 y 7), se realizó la tinción de los cortes con la técnica de Nissl.

D) ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis estadístico de los resultados, en la Parte I que se refiere a la valoración conductual y a la tasa de mortalidad, se presentan los promedios de las latencias en minutos a la primera sacudida "wet-dog shake" y a la primera CTCG, se aplicó la "t" de student para comparar las medias entre muestras independientes. Después del tratamiento se dejaron pasar 7 días en jaulas de recuperación con alimento y agua "ad libitum" y se observó la conducta de los animales tratados para determinar en forma cualitativa si hubo algún cambio notable.

La mortalidad se calculó en base a los grupos AK y Mg -AK tratados por vía i.p. para no mezclar con los grupos tratados por vía i.c.v. y por ser conjuntos más numerosos y por lo tanto más representativos. se calculó el porcentaje de muertes ocurridas antes de la perfusión en un periodo de 7 días postratamiento. A los porcentajes se les aplicó la prueba exacta de Fisher para determinar si había diferencia significativa.

En la Parte 2, se hizo registro EEG, se determinaron las latencias a la primera manifestación electroencefalográfica y a la primera crisis. Los datos se analizaron igual que para las latencias anteriores.

En la Parte 3 se realizaron mediciones lineales del espesor de los estratos del hipocampo en ratas normales sin tratamiento y mediciones de área y perímetro con ayuda de una computadora en ratas control, AK y Mg-AK.

Los resultados de las mediciones lineales fueron en milímetros y se compararon los obtenidos con una rejilla calibrada con los de la computadora calculando las desviaciones estándar y aplicando la "t" de Student para saber si ambos métodos proporcionaban mediciones similares.

Después se obtuvieron áreas y perímetros con la computadora para los grupos control, AK y Mg-AK, se hicieron ANOVA para determinar la significancia de las variaciones entre las medias de cada grupo.

Los resultados de la morfometría en ratas tratadas con AK i.p. no parecían satisfactorias, por lo tanto se decidió aplicar el AK i.c.v. de modo que el daño fuera más aparente y por lo tanto cuantificable, la forma en que se aplicó fue la más sencilla. Se obtuvieron resultados en mm y en mm^2 , primero se aplicó ANOVA para determinar la diferencia entre las medias. Luego se aplicaron otras pruebas para comparar más específicamente los resultados, se aplicó la mínima diferencia significativa de Fisher para el área de la capa piramidal que era la que más nos interesaba. Luego se aplicó la prueba de Tukey y se obtuvieron comparaciones

más convincentes puesto que realmente compara las medias por separado, y de este modo fué posible elaborar una conclusión.

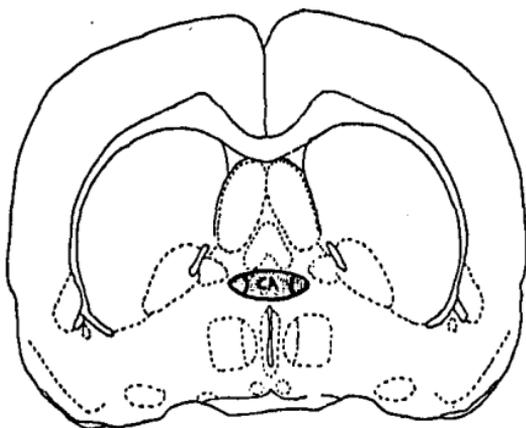


Fig. 6. Esquema de un corte transversal de cerebro de rata donde se señala la comisura anterior (CA), que se tomó como punto de referencia para indicar el nivel de corte donde se efectuaron las mediciones morfométricas. (Tomado de Paxinos (1985)).

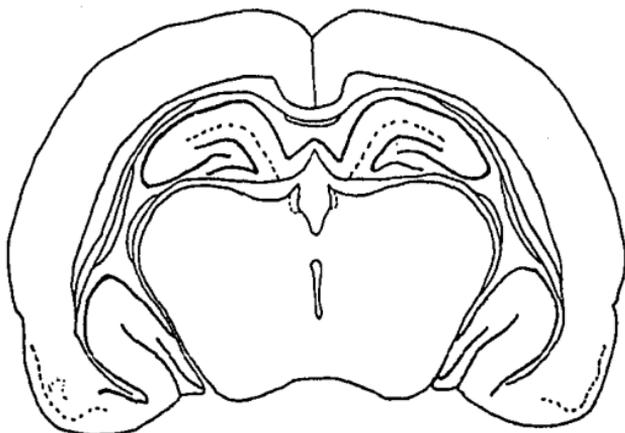


Fig. 7. Esquema del corte transversal de cerebro de rata donde se efectuaron las mediciones morfométricas. (Tomado de Paxinos (1985)).

RESULTADOS.

PARTE 1. VALORACION CONDUCTUAL Y TASA DE MORTALIDAD

a) LATENCIAS A LA PRIMERA SACUDIDA "WET-DOG SHAKE" Y A LA PRIMERA CTCG

En la Tabla 1 se presenta el promedio de la latencia en minutos para la primera sacudida "Wet-dog shake", que fue de 20.8 +/- 13.9 min para el grupo de AK (n= 17), y de 41.1 +/- 17.4 min para el grupo Mg-AK (n= 16), que corresponde a un 197.6% de aumento en la latencia a la primera sacudida para el grupo Mg-AK con respecto al grupo de AK sólo. Se aplicó una prueba de "t" de Student para comparación de medias entre muestras independientes, y se obtuvo una diferencia significativa entre los dos grupos ($p < 0.0009$). En la tabla 1, también se presenta el promedio de la latencia a la primera crisis tónico clónica generalizada (CTCG) que fue de 31.9 +/- 11 min para AK (n= 11) y 63.1 +/- 6.54 min para Mg-AK (n= 10), representando un 198% de retraso para el grupo Mg-AK. El resultado de la prueba "t" Student fue una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.0001$). Después de 7 días post-tratamiento, se observó una mayor recu-

peración de la conducta normal en las ratas pretratadas con MgSO₄, mientras que el grupo de AK mostró hiperexcitabilidad, hipersexualidad, pérdida de peso y agresividad en algunos casos.

TABLA 1. LATENCIAS PARA LA PRIMERA SACUDIDA "WET-DOG SHAKE" Y PARA LA PRIMERA CRISIS TONICO CLONICA GENERALIZADA (CTCG).

Grupo	"Wet-dog"		CTCG	
	AK	Mg-AK	AK	Mg-AK
Promedio (min)	20.8	41.1	31.9	63.1
D.E.	13.9	17.4	11.0	6.5
% Retraso	100	197.6	100	198
n	17	16	11	10

Abreviaturas: Promedio (min)= Latencia promedio; D.E.= Desviación estándar; % Retraso = Porcentaje de retraso con respecto al grupo AK; n= Número total de ratas en cada grupo.

b) MORTALIDAD

La tasa de mortalidad se calculó únicamente a partir de los animales de los grupos Mg-AK y AK tratados por vía intraperitoneal para no mezclar los que recibieron tratamientos distintos, los que se inyectaron con AK por vía intracerebroventricular no fueron incluidos. De un total de 54 ratas tratadas, correspondientes a los grupos AK (n= 27) y Mg-AK (n= 27), se obtuvo el siguiente porcentaje de muertes antes de cumplir 7 días pos-tratamiento:

TABLA 2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD PARA CADA GRUPO

Grupo	% de muertes
AK	22.2%
Mg-AK	14.8%

Aplicando la prueba exacta de Fisher (0.3886), no se obtuvo significancia entre el grupo AK y Mg-AK para el porcentaje de mortalidad.

PARTE 2. REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO

a) LATENCIA A LA PRIMERA MANIFESTACION ELECTROENCEFALOGRAFICA Y A LA PRIMERA SACUDIDA

El Mg²⁺ deprime la actividad en el S.N.C. (Fig. 8). Se obtuvo un registro continuo de los grupos: Control (n= 6), AK (n= 7) y Mg-AK (n= 6). La latencia promedio a la primer manifestación electroencefalográfica se muestra en la tabla 2, fue de 5.7 +/- 2.4 min para el grupo de AK (n=6) y 29.8 +/- 18.2 min para el grupo Mg-AK (n=6). También se registró la latencia a la primera crisis obteniéndose 29.8 +/- 13.5 min para AK (n= 6) y 57.2 +/- 25.5 min para Mg-AK (n= 5).

TABLA 3. LATENCIAS A LA PRIMERA MANIFESTACION ELECTROENCEFALOGRAFICA Y A LA PRIMERA CRISIS

Grupo	1er Disparo		1er Crisis	
	AK	Mg-AK	AK	Mg-AK
Promedio (min)	5.7	29.8	29.8	57.2
D.E.	2.4	18.2	13.5	25.5
Retraso %	100	523	100	192
n	6	6	6	6

El EEG confirmó la existencia de un retardo en el inicio de la actividad epileptiforme en el grupo Mg-AK, representando esto el 523 % de retardo entre los dos grupos. Se realizó la prueba "t" de Student (no pareada), obteniéndose una diferencia significativa entre los grupos AK y Mg-AK, con una $p < 0.009$. También se encontró diferencia significativa para la 1era sacudida, con una $p < 0.046$.

No se midió la duración de las crisis porque a simple vista no se aprecia diferencia entre los registros con AK y con Mg-AK, sólo se observa un retraso en la aparición de la crisis para el grupo Mg-AK, pero después empiezan a aparecer las crisis con la misma regularidad que para los animales tratados con AK, hasta que aparece el SE donde las crisis son continuas durante varias horas.

También se hicieron registros EEG postratamiento (Figs. 9 y 10) encontrando que en el grupo AK hay presencia de espigas a los 3 y a los 7 días después del experimento, y en el grupo Mg-AK esto no se manifestó de manera tan conspicua.

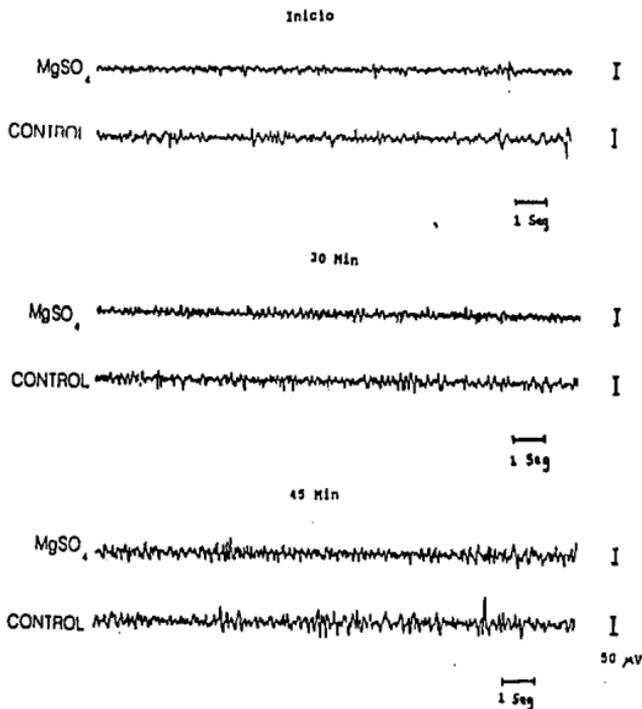


Fig. 8. Registro electroencefalográfico de la corteza cerebral de dos ratas donde se muestra el efecto de la administración de una solución 3 nM/Kg de $MgSO_4$ vía i. p., Vs. una rata normal. Desde el inicio de la inyección se presenta una ligera depresión de la actividad EEG en la rata tratada con Mg^{2+} , a los 30 min aún se observa esta disminución, y alrededor de los 45 a 60 min el efecto desaparece.

AK

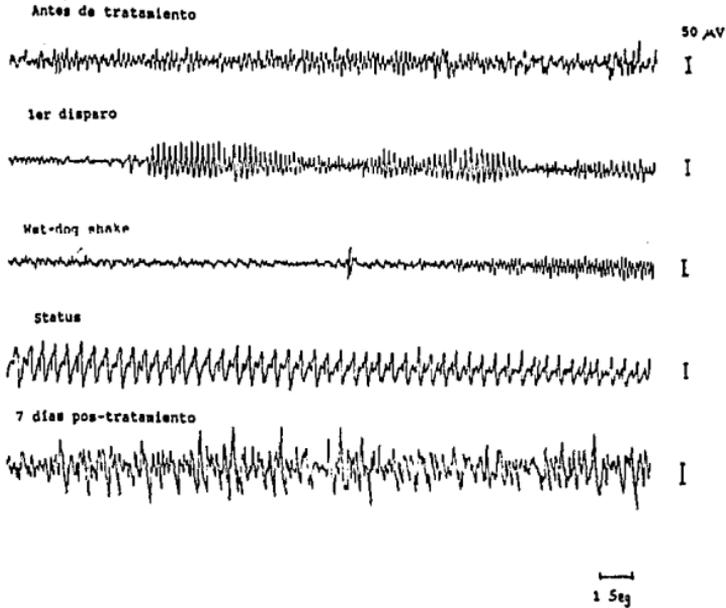


Fig. 9. Registro electroencefalográfico de la corteza cerebral de una rata donde se muestra el efecto de la administración de AK 10 mg/Kg i.p. Se observa en el registro la forma en que se manifiesta el primer disparo, una sacudida de perro mojado (wet-dog shake), y la manifestación del status epiléptico. También se muestra un registro de la misma rata 7 días después del tratamiento.

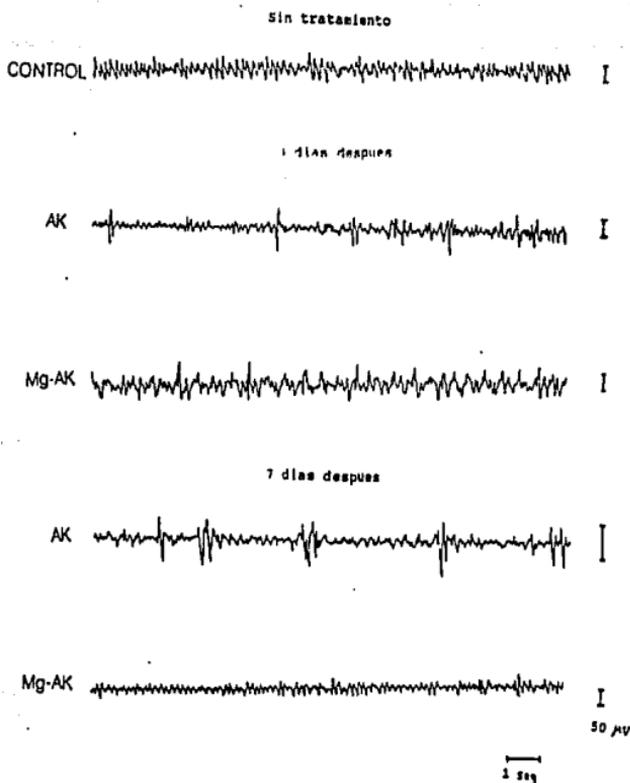


Fig.10. Registro electroencefalográfico de la corteza cerebral de ratas que muestra en primer lugar un registro normal, en seguida la actividad EEG presente: 3 días después de los tratamientos en los grupos AK y Mg-AK; y a los 7 días. Se observa la presencia de espigas en las ratas tratadas con AK, y en las de Mg-AK no se observan espigas de manera conspicua.

PARTE 3. MORFOMETRIA DEL HIPOCAMPO NORMAL DE RATAS

a) MEDICION LINEAL CON MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO

Se realizaron mediciones lineales del espesor de los estratos del hipocampo de 7 ratas normales sin tratamiento, en las siguiente regiones: Capa de células piramidales en los campos CA1, CA3a, CA3b, CA3c, CA4, ZHsup, ZHinf, CGsup, CGinf, CMsup y CMinf. Se utilizó un microscopio de campo claro, con un objetivo de 10X y una rejilla calibrada en micras. Los resultados se expresan en milímetros con su correspondiente desviación estándar (D.E.) en la tabla 4.

TABLA 4. MEDICIONES LINEALES DE ESPESOR EN LOS ESTRATOS DEL HIPOCAMPO DE RATAS NORMALES TOMADAS CON MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO, OBJETIVO 10X Y UNA REJILLA CALIBRADA.

Región del Hipocampo	Media y desviación estándar (mm)
CA1	0.066 +/- 0.010
CA3a	0.084 +/- 0.012
CA3b	0.071 +/- 0.007
CA3c	0.080 +/- 0.010
CA4	0.127 +/- 0.023
ZHsup	0.221 +/- 0.032
ZHinf	0.147 +/- 0.020
CGsup	0.078 +/- 0.011
CGinf	0.064 +/- 0.007
CMsup	0.251 +/- 0.019
CMinf	0.232 +/- 0.020

b) MEDICIONES LINEALES ASISTIDAS POR COMPUTADORA

Con las mismas laminillas que se utilizaron para las mediciones lineales al microscopio, se obtuvieron mediciones con computadora, estas mediciones se realizaron de la misma manera que con el microscopio, pero con ayuda del programa ImagePro-Plus. Estas mediciones se expresan también en milímetros junto con su D.E. para los estratos anteriores.

TABLA 5. MEDICIONES LINEALES DE ESPESOR EN LOS ESTRATOS DEL HIPOCAMPO OBTENIDAS CON COMPUTADORA

Región del Hipocampo	Media y desviación estándar (mm)
CA1	0.054 +/- 0.009
CA3a	0.076 +/- 0.015
CA3b	0.070 +/- 0.015
CA3c	0.074 +/- 0.020
CA4	0.108 +/- 0.021
ZHsup	0.235 +/- 0.026
ZHinf	0.151 +/- 0.048
CGsup	0.071 +/- 0.008
CGinf	0.065 +/- 0.008
CMsup	0.276 +/- 0.026
CMinf	0.227 +/- 0.041

MORFOMETRIA DEL HIPOCAMPO NORMAL DE RATA

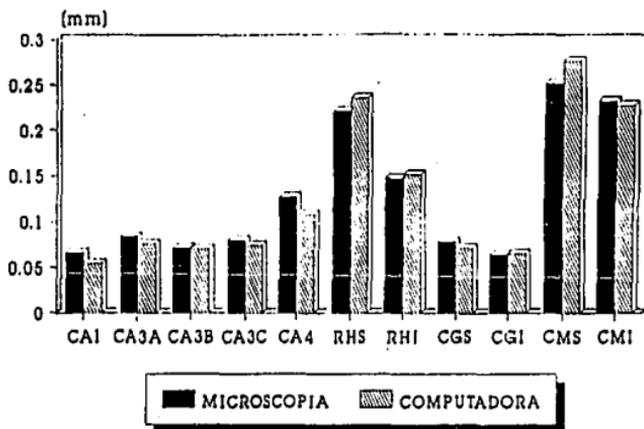


Fig.11. Gráfica donde se comparan las mediciones lineales obtenidas mediante observaciones al microscopio de campo claro y mediciones obtenidas mediante la aplicación del programa ImagePro-Plus en imágenes capturadas a una computadora.

TABLA 6. ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LAS MEDICIONES CON MICROSCOPIO Y LAS MEDICIONES CON COMPUTADORA DEL ESPESOR DE LOS ESTRATOS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS NORMALES.

Estrato	F	Varianza media	Varianza de la media	p
CA1	3.31274	0.00010	0.0005	0.093
CA3a	0.94251	0.00022	0.00003	0.350
CA3b	0.00370	0.00017	0.0000009	0.952
CA3c	0.13233	0.00099	0.00001	0.721
CA4	1.96318	0.00059	0.00016	0.186
ZHsup	0.69470	0.00100	0.00010	0.420
ZHinf	0.03775	0.00159	0.000008	0.849
CGsup	1.36263	0.00011	0.00002	0.265
CGinf	0.06679	0.00006	0.0000006	0.800
CMsup	3.65085	0.00062	0.00032	0.080
CMinf	0.06254	0.00124	0.00001	0.806

Comparando mediante análisis de variancia (ANOVA) los resultados obtenidos con las mediciones directas del microscopio y las obtenidas con la ayuda de una computadora (TABLA 6), se obtiene que no hay diferencia significativa en ninguna de las mediciones.

c) AREAS Y PERIMETROS

La computadora proporcionó mediciones de área y perímetro en la CP, capa de células granulares, zona hiliar y región hipocámpica. Las mediciones de área se expresan en milímetros cuadrados y el perímetro en milímetros, en todas las mediciones se incluye la desviación estándar (TABLAS 7, 8 y 9).

TABLA 7. AREAS Y PERIMETROS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS NORMALES OBTENIDOS POR COMPUTADORA.

Zona hipocámpica	Area (mm) ²	Perímetro (mm)
Células piramidales	0.547 +/- 0.028	19.434 +/- 0.659
Células granulares	0.273 +/- 0.037	8.637 +/- 1.163
Zona hiliar	0.632 +/- 0.151	4.610 +/- 0.629
Región hipocámpica	7.742 +/- 0.722	12.603 +/- 0.518

TABLA 8. AREAS Y PERIMETROS EN EL GRUPO AK OBTENIDOS POR COMPUTADORA

Zona hipocámpica	Area (mm) ²	Perímetro (mm)
Células piramidales	0.598 +/- 0.076	19.908 +/- 1.328
Células granulares	0.288 +/- 0.031	8.395 +/- 1.337
Zona hiliar	0.679 +/- 0.093	4.657 +/- 0.593
Región hipocámpica	7.955 +/- 1.035	12.960 +/- 0.755

TABLA 9. AREAS Y PERIMETROS EN EL GRUPO Mg-AK OBTENIDOS POR COMPUTADORA.

Zona hipocámpica	Area (mm) ²	Perímetro (mm)
Células piramidales	0.579 +/- 0.076	19.225 +/- 1.328
Células granulares	0.275 +/- 0.018	7.970 +/- 0.868
Zona hiliar	0.604 +/- 0.106	4.287 +/- 0.426
Región hipocámpica	7.619 +/- 1.056	12.205 +/- 0.953

Los resultados obtenidos para los grupos experimentales se presentan de la misma forma, siendo de principal interés las mediciones de área y perímetro, se aplicó a los datos un análisis de

varianza y la prueba de "t" de Student para los grupos control (n= 7), AK (n= 6) y Mg-AK (n= 8).

Para el área de CP (TABLA 10), la comparación de las medias no muestra diferencia significativa. Los datos de la prueba se expresan en la tabla siguiente:

TABLA 10. COMPARACION ENTRE MEDIAS EN EL AREA DE LA CAPA DE CELULAS PIRAMIDALES (CP).

Grupo	Control	AK	Mg-AK
Media	0.547333	0.598167	0.579000
Varianza	0.000988	0.006987	0.006691

p= 0.474903

Tampoco se obtiene diferencia significativa para el perimetro de CP, para el área de CG ni para el perimetro de la misma, así como para ZH y para la región hipocámpica.

RESULTADOS DE LA INYECCION INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV) DE AK

Se encontraron cambios en las mediciones de área y perimetro del hipocampo de ratas con AK intracerebroventricular. Se aplicó análisis de variancia (ANOVA) para el área de CP en los grupos control (n= 6), AK (n= 8), y Mg-AK (n= 10), se obtuvieron las siguientes tablas:

TABLA 11. MINIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE FISHER PARA EL AREA DE LA CAPA PIRAMIDAL.

Grupos comparados	LSD	Diferencia	Resultado
AK y Control	0.0550	-0.2149	SIGNIFICATIVO
Mg-AK y Control	0.0526	-0.1659	SIGNIFICATIVO
Mg-AK y AK	0.04835	0.0489	SIGNIFICATIVO

TABLA 12. RESULTADOS DE AREA Y PERIMETRO EN LA CAPA DE CELULAS PIRAMIDALES

Grupo	2	
	Area (mm)	Perimetro (mm)
Control (n=6)	0.593 +/- 0.138	20.066 +/- 2.721
A.K. (n=8)	0.378 +/- 0.093	14.433 +/- 3.145
Mg-AK (n=10)	0.426 +/- 0.116	16.755 +/- 2.787

TABLA 13. RESULTADOS DE AREA Y PERIMETRO EN LA CAPA DE CELULAS GRANULOSAS

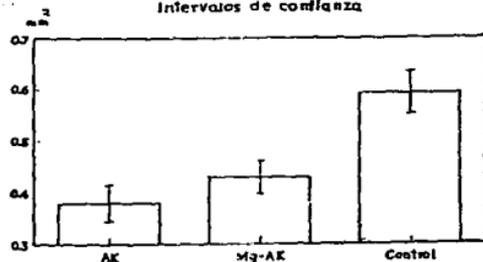
Grupo	2	
	Area (mm)	Perimetro (mm)
Control (n=6)	0.297 +/- 0.048	8.422 +/- 0.602
A.K. (n=8)	0.368 +/- 0.084	9.289 +/- 1.208
Mg-AK (n=10)	0.312 +/- 0.055	9.192 +/- 1.307

Los valores del Análisis de Varianza indican que hay diferencias significativas entre los tres grupos comparados para todos los parámetros medidos. En otra comparación de los datos con la prueba de Tukey, se obtiene para una significancia de 0.05, que para el área de la capa de células piramidales (CP) las diferencias para Control Vs AK, y para Control Vs Mg-AK son significativas, siendo el área mayor para el grupo control (media= 0.5929) que en AK (media= 0.3780) y Mg-AK (media= 0.4270), sin embargo no se encuentra diferencia significativa entre los grupos AK y Mg-AK mediante la prueba de Tukey.

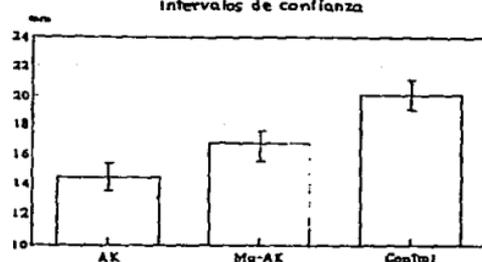
TABLA 14. ANALISIS DE VARIANZA.

Parámetro medido	p	Grupos comparados
Area de CP	0.0001	Control, AK, Mg-AK
Perimetro de CP	0.0001	Control, AK, Mg-AK
Area de CG	0.0001	Control, AK, Mg-AK
Perimetro de CG	0.0038	Control, AK, Mg-AK

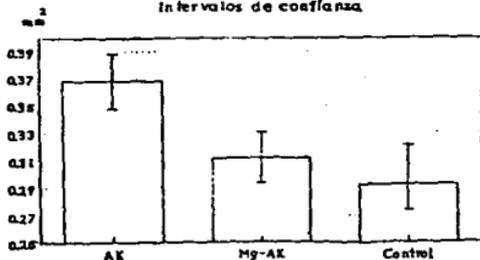
AREA DE LA CAPA DE CELULAS PIRAMIDALES
Intervalos de confianza



PERIMETRO DE LA CAPA PIRAMIDAL
Intervalos de confianza



AREA DE LA CAPA GRANULAR
Intervalos de confianza



PERIMETRO DE LA CAPA GRANULAR
Intervalos de confianza

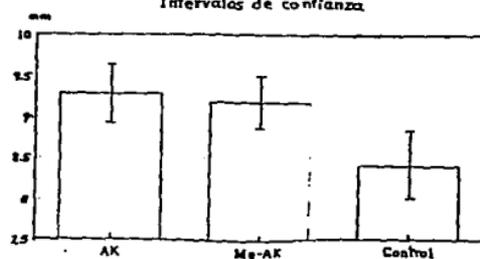


Fig. 12. Serie de gráficas que muestran los intervalos de confianza obtenidos para los grupos: Control, AK y Mg-AK. En la capa de células piramidales se observa que la diferencia solo es significativa con respecto al grupo control, en la capa de células granulares hay diferencias significativas en el área del grupo AK, y en el perímetro de AK y Mg-AK con respecto al control.

TABLA 15. PRUEBA DE TUKEY PARA EL AREA DE LA CAPA DE CELULAS PIRAMIDALES.

Grupos	Diferencia entre medias	Significancia
Cont/Mg-AK	0.1659	*
Cont/AK	0.2149	*
Mg-AK/Cont	-0.1659	*
Mg-AK/AK	0.0490	NS
AK/Cont	-0.2809	*
AK/Mg-AK	-0.0490	NS

Abreviaturas: Para todas las tablas de prueba de Tukey * = Significativo; NS = No significativo.

Para el perimetro de CP (TABLA 16), las diferencias entre los grupos: AK Vs Control; Mg-AK Vs Control y AK Vs Mg-AK son significativas, siendo mayor el perimetro en el grupo Control (media= 20.066) que en AK (media= 14.433) y Mg-AK (media= 16.755), mientras que entre los grupos experimentales, Mg-AK tiene perimetro mayor que AK.

TABLA 16. PRUEBA DE TUKEY PARA EL PERIMETRO DE LA CAPA DE CELULAS PIRAMIDALES

Grupos	Diferencia entre medias	Significancia
Cont/Mg-AK	3.310	*
Cont/AK	5.633	*
Mg-AK/Cont	-3.310	*
Mg-AK/AK	2.323	*
AK/Cont	-5.633	*
AK/Mg-AK	-2.323	*

En la comparación de área de CG (TABLA 17), las diferencias entre AK Vs Mg-AK y AK Vs Control son significativas, pero no entre Mg-AK Vs Control. En este caso el área mayor se registra para el grupo AK (media = 0.3683), mientras que Control (media= 0.2973) y Mg-AK (media= 0.3124) son más similares entre si.

TABLA 17. PRUEBA DE TUKEY PARA EL AREA DE LA CAPA DE CELULAS GRANULARES.

Grupos	Diferencia entre medias	Significancia
Cont/Mg-AK	-0.0151	NS
Cont/AK	-0.0710	*
Mg-AK/Cont	0.0151	NS
Mg-AK/AK	-0.0559	*
AK/Cont	0.0710	*
AK/Mg-AK	0.0559	*

Las diferencias entre el perímetro de CG de los grupos AK Vs Control y Mg-AK Vs Control son significativas (TABLA 18), y no es significativa para los grupos AK Vs Mg-AK. El mayor perímetro corresponde al grupo AK (media= 9.289), y el perímetro menor al grupo Control (media= 8.422), siendo intermedio el grupo Mg-AK (media= 9.192), pero más próximo al grupo AK.

TABLA 18. PRUEBA DE TUKEY PARA EL PERIMETRO DE LA CAPA DE CELULAS GRANULARES

Grupos	Diferencia entre medias	Significancia
Cont/Mg-AK	-0.771	*
Cont/AK	-0.867	*
Mg-AK/Cont	0.771	*
Mg-AK/AK	-0.097	NS
AK/Cont	0.867	*
AK/Mg-AK	0.097	NS

Los resultados de estas comparaciones indican que la diferencia entre el grupo control y el grupo AK siempre es significativa, que entre el grupo control y Mg-AK también existe una diferencia significativa excepto para el área de CG donde ambos grupos resultan ser similares. Entre el grupo AK y Mg-AK la diferencia no es significativa en el área de CP ni en el perimetro de CG, pero sí es significativa para el perimetro de CP y para el Área de CG. Por lo tanto, al comparar los grupos AK Vs. Mg-AK hay diferencia entre dos mediciones y en las otras dos mediciones no hay diferencia significativa, lo cual nos dice que aunque ambos grupos tienen características similares no son iguales.

DISCUSION

La inyección intraperitoneal (i.p.) de AK (10 mg/kg) provoca manifestaciones en la conducta de los animales tratados, el pretratamiento con una solución de MgSO₄ (3 mM/kg) causa retraso

de las manifestaciones epileptiformes tales, como la presencia de sacudidas de perro mojado o "wet-dog shakes", y la aparición de crisis tónico clónicas generalizadas (CTCG) y autosostenidas (SE). Sin embargo, el cronometraje del tiempo que tarda en presentarse cada manifestación, es subjetivo, porque el modelo de AK no es tan predecible y en algunos casos los animales mueren pocas horas después del tratamiento, no siempre se presentan las sacudidas de perro mojado, las reacciones de los sujetos experimentales varían y se vuelve difícil la comparación, como por ejemplo la aparente potenciación de algunas de las crisis con el pretratamiento de Mg. Además, también se hicieron algunas otras observaciones, como la hiperexcitabilidad y agresividad de algunas de las ratas tratadas con AK varios días después de la inyección, y la aparente recuperación de la conducta normal en algunos de los animales pretratados con Mg.

El retraso que se observa en las manifestaciones conductuales es significativo. Sin embargo, el potencial protector del Mg^{2+} no es considerable, pues de todas maneras se presentan las crisis de SE tardíamente en las ratas pretratadas con Mg^{2+} y estas crisis aparentan ser iguales o en ocasiones potenciadas con respecto a las de los animales tratados con AK. Además, una crisis provocada por AK dura más de 4 horas, mientras que el efecto del Mg^{2+} dura un máximo de 1 hora, posiblemente si se mantuviera la concentración de Mg^{2+} por más tiempo el efecto protector sería mayor.

Se ha propuesto que es muy difícil interrumpir las crisis inducidas por AK (Velisek y col., 1989), según esto, habría drogas como la carbamazepina y el fenobarbital que no podrían afectar la excitación límbica local provocada por AK. Sin embargo, en realidad el patrón de crisis es bastante sensible a la terapia, dependiendo del grado de maduración de los sitios de unión para el AK, con clonazepam y valproato se han obtenido buenos resultados, y se han encontrado las crisis más grandes a partir de la 3a semana desde el nacimiento de la rata (Velisek y col., 1989).

Katz y col. (1990) provocaron crisis en el SNC mediante la exposición a oxígeno hiperbárico en ratas, obteniendo una supresión de las crisis electroencefalográficas (EEG) por la acción del $MgSO_4$ parenteral.

4

En la segunda parte del presente trabajo se evaluó la actividad de crisis mediante un registro EEG y se observó un retraso considerable en la presencia tanto de la 1a manifestación epileptiforme como en el desarrollo del SE, aunque este último era más difícil de determinar. Sin embargo, también se observa que al presentarse la crisis tardía, lo hace con las mismas caracteris-

ticas de las crisis sin pretratamiento, en algunos casos se realizó un nuevo registro EEG a los 7 días después del experimento, y se observó que aún aparecían espigas o disparos anormales, más frecuentes en los animales sin pretratamiento con Mg, lo cual parece coincidir con la diferencia en la conducta observada en las ratas varios días después del tratamiento.

McIntosh y col. (1988) demostraron que el tejido cerebral en ausencia de Mg²⁺ extracelular sufre un daño más severo que en condiciones normales, y que un pretratamiento con Mg²⁺ ayuda a prevenir las consecuencias de un trauma cerebral experimental. En un trabajo posterior (McIntosh et al. 1989), partiendo de sus experiencias anteriores, evaluaron el daño traumático después de la administración de cloruro de Mg (MgCl₂) y observaron un progreso sostenido en varios parámetros neurológicos evaluados en los animales que recibieron tratamiento.

En la tercera etapa de la tesis se intentó evaluar el daño neuronal, para ello se decidió aplicar una técnica relativamente nueva, la morfometría asistida por computadora, los motivos fueron, facilitar la medición del área y perímetro de las zonas afectadas. La computadora ofreció como ventaja la facilidad para elaborar una valoración estadística de los resultados, rapidez y sencillez de operación.

El daño neuronal macroscópico es un parámetro difícil de cuantificar, sobre todo en las etapas iniciales, cuando no ha alcanzado un 30% de extensión puede pasar inadvertido. Se han hecho estudios detallados donde se trata de caracterizar este daño a través de la descripción de las transformaciones que sufren las

células, y de cuantificar el daño mediante el conteo de células. En el inicio no se obtuvieron diferencias entre cada grupo experimental, fue necesario hacer algunas correcciones en la metodología pues aparentemente no había daño neuronal con la administración i.p. de AK aunque seguramente si existía este daño pues se presentaba el SE, pero no se apreciaba en los cortes de 120 micras de espesor, y con la técnica de Nissl que se limita a mostrar los cuerpos neuronales pero no las células dañadas. Se determinó administrar la solución de AK por vía intracerebroventricular (i.c.v.) como en el trabajo realizado por Nadler y col. (1978). De cualquier manera, este primer intento fue útil para desarrollar la metodología con la computadora y para realizar comparaciones donde se encontró que no había diferencias significativas entre las mediciones lineales obtenidas con el microscopio óptico con una rejilla calibrada, y las mediciones obtenidas a través de la computadora.

La administración i.c.v. de AK provoca una lesión visible en el hipocampo de la rata, principalmente en las regiones CA3 y CA4 de CP (Nadler y col., 1978).

Se midió el área y perímetro de CP y de CG y se obtuvo una protección positiva para el grupo pretratado con $MgSO_4$, aunque este resultado es mínimo, también se registró un aumento en el área y perímetro de CG.

Antes se mencionó la polémica sobre el uso del $MgSO_4$ como anti-convulsivo, autores como Link y col., (1991) mostraron que el sulfato de Mg administrado como postratamiento no es efectivo para detener las crisis provocadas por pentilentreazol, ellos explican que el Mg^{2+} bloquea el influjo de calcio de manera

dependiente de voltaje a través de los canales del receptor de NMDA, por lo tanto no puede haber efecto favorable del Mg^{2+} por la continua despolarización en el SE.

Coan y col., (1985) investigaron los receptores de NMDA, en rebanadas de hipocampo en las colaterales de Schaffer, a nivel sináptico, en presencia y ausencia de Mg. Cuando había poco Mg, aumentaba la población de espigas, por lo tanto concluyeron que la transmisión sináptica en el hipocampo depende de la presencia de los receptores a NMDA y de las concentraciones extracelulares de Mg.

Katz y col., (1990) han propuesto como mecanismo anticonvulsivo del Mg, el bloqueo de los canales de calcio asociados a receptores de NMDA.

El AK es un neuroexcitador análogo del ácido glutámico, la presencia de glutamato en el ambiente determina la actividad tónica en los receptores a NMDA en rebanadas de hipocampo. Los receptores a NMDA son sensibles a voltaje, su activación confiere una propiedad eléctrica regenerativa a las células piramidales que ayuda a acoplar la excitación sináptica y la descarga del potencial de acción en la célula (Sah y col., 1989).

Los receptores a NMDA son muy importantes en la epilepsia del lóbulo temporal, según un estudio de McDonald y col., (1991) se examinó tejido cerebral de pacientes y se encontró mayor unión a receptores a NMDA en el giro dentado, donde posiblemente hubo menor pérdida neuronal.

La entrada de calcio a las neuronas tiene gran importancia en el inicio de los mecanismos deletéreos en las células, y está regu-

lada por aminoácidos excitadores específicos mediante canales asociados a receptores o complejos canal-receptor.

Benveniste y col., (1984) señalan que la isquemia incrementa el contenido de glutamato y aspartato extracelulares en el hipocampo, y que esto puede ser uno de los factores que causen daño en ciertas neuronas. Según Choi (1987) hace poco tiempo se propuso la hipótesis del calcio como mediador de la neurotoxicidad, desplazando la hipótesis de la neurotoxicidad donde se consideraba que la toxicidad del glutamato se debía a una excitación neuronal excesiva. La hipótesis del calcio se refiere a que la exposición al glutamato dispara un influjo de calcio hacia la neurona.

La investigación de Choi (1987) apoya la hipótesis del calcio, y distingue dos componentes durante el curso de la reacción. El primer componente es el edema neuronal, que depende del sodio extracelular y del cloro, y que puede ser atenuado. El segundo componente es la desintegración neuronal, y depende de la concentración extracelular de calcio que propicia su influjo a través de la membrana de la neurona.

Lester y col. (1990) estudiaron la modulación de corrientes de calcio por el glutamato y sus análogos, donde en presencia del receptor a glutamato y con antagonistas del canal iónico, los análogos del glutamato causaron un pequeño efecto o ninguno sobre la corriente de calcio, pero con algunas sustancias como el quisqualato, glutamato y GTPgama si hubo una disminución importante e irreversible en la corriente de calcio, mientras que con otras sustancias como el AK, NMDA, AMPA y L-APB no, se supone que estas observaciones apoyan la idea de una interacción

entre la proteína G acoplada al complejo receptor de glutamato a canal de calcio.

Waniewski y col. (1990) inyectaron AK en el hipocampo de rata "in vitro" para medir la cantidad de glutamino-sintetasa, para determinar si los astrocitos estaban involucrados en los efectos causados por el AK. Encontraron reducción en la glutamino sintetasa pero no se debió a inhibición directa de la enzima a nivel cerebral, ni a las crisis, porque en este caso se encontró una actividad normal de la glutamino sintetasa. Por lo tanto, el efecto que se observa sobre la glutamino sintetasa parece ser indirecto, producido de manera secundaria por efectos a nivel neuronal. Otros estudios han mostrado la participación del glutamato endógeno en la neurotoxicidad del AK, parece que el AK causa deterioro en la capacidad de los astrocitos para metabolizar la glutamino-sintetasa y esto contribuiría a la muerte celular mediada por glutamato, posterior a la exposición al AK.

Un medio libre de Mg^{2+} constituye un modelo de epilepsia, ya que se incrementa la excitabilidad postsináptica, aunque parece ser que esto no tiene que ver con un cambio en el control de la excitabilidad del receptor de NMDA, por lo menos en el área CA1 del hipocampo (Psarropoulou y col., 1990).

La administración sistémica de AK provoca cambios estructurales, neuroquímicos e histopatológicos (Sperk y col., 1985). Se ha reportado que la extensión del daño es proporcional a la dosis de AK. Se ha observado la existencia de cambios notables después de 3 horas de la inyección, estos cambios incluyen aumento en los niveles de ácido 3, 4-dihidroxifenilacético y 5-

hidroxiindolacético, y disminución en el nivel de noradrenalina en diversas partes del cerebro, también ocurren diversos cambios histopatológicos como atrofia y condensación de las células nerviosas, y atrofia cerebral en la parte anterior del cerebro. Conductualmente ocurren cambios como inmovilidad o reposo, wet-dog shakes, y crisis límbicas, y se observa que las pendientes de las curvas dosis-respuesta resultan demasiado verticales. Entre otras alteraciones tardías e irreversibles se incluyen la pérdida de receptores enzimáticos para la descarboxilasa del ácido glutámico y de la acetiltransferasa de la colina, necrosis parenquimal incompleta y hemorragias. Estos últimos cambios ocurren en pocas regiones del cerebro, principalmente en el hipocampo, la amígdala, corteza entorrinal, corteza piriforme, y bulbo olfatorio, y ocurrieron sólo en animales que presentaron convulsiones.

Se concluye que estos cambios no se deben únicamente a la acción del AK, sino a una serie de mecanismos patogénicos adicionales y secundarios que se disparan.

Nadler y col., (1978) mencionan que las lesiones provocadas por administración de AK son similares a las de la patología asociada a epilepsia del lóbulo temporal, y que la administración i.c.v. de AK provoca daño selectivo a las neuronas piramidales del hipocampo.

En otro modelo Lothman y col., (1990) proponen que un periodo continuo de estímulo al hipocampo puede establecer un SE límbico autosostenido al cual le siguen cambios neuropatológicos semejantes a la esclerosis del hipocampo que normalmente se encuentran en pacientes epilépticos. Es decir un modelo de SE con

crisis hipocámpicas espontáneas, esto se puede lograr con la disminución de la inhibición mediada por GABA o alterando la sensibilidad a los iones extracelulares.

Cuando el AK se inyecta dentro del hipocampo, (Kobayashi y col., 1990) reduce la glutamino sintetasa, esta reducción puede deteriorar la capacidad de los astrocitos para metabolizar glutamato y este deterioro puede contribuir a la muerte celular mediada por glutamato después de la exposición al AK. Por lo tanto, habría un efecto aparentemente indirecto, se ha mencionado que otros estudios han mostrado que el glutamato endógeno está involucrado en la neurotoxicidad del glutamato.

Las neuronas piramidales del hipocampo son muy sensibles al daño provocado por el AK. En un estudio post-mortem de niños con crisis generalizadas, se encontró alta afinidad al AK en la región CA3 y en la capa molecular interna de la fascia dentada (Represa y col., 1989).

Según Geddes y col., (1990) en CA1 del hipocampo hay menor cantidad de receptores a NMDA y de AK, tal vez como reflejo de la menor población de células piramidales, pero en el giro parahipocámpico se ha detectado mayor cantidad de receptores a NMDA y AK.

Según Miller y col., (1990) hay regiones con alta densidad de receptores al AK en CA3, y en el giro dentado del hipocampo en ratas adultas.

En los resultados de las mediciones de área y perímetro en la parte 3 de este trabajo, se observó además un efecto a nivel de las células granulosas.

Mientras que el área y perímetro de CP disminuyó, en CG aumentaron, es un hecho que llama la atención, y sería interesante ofrecer una explicación mediante una nueva investigación. De momento se podría pensar en una reacción glial.

Se ha visto, Seress y col., (1981) que el giro dentado no es una estructura homogénea, que contiene células en canasta que son inhibitorias de las células granulares, aunque en número reducido, y hay células piramidales, también se pueden observar algunas células granulares fuera de lugar, y que las células piramidales de ZH son diferentes de las del cuerno de Ammón.

En cuanto a la proliferación de las células gliales por efecto del AK en el hipocampo (Burnhard y col., 1990) se registra un potencial de reposo similar al de otras células no reactivas como los astrocitos, es posible que las células gliales en estas zonas no tengan canales de calcio activados por voltaje o la densidad de estos canales es muy baja.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la valoración conductual, EEG, mortalidad y análisis morfométrico se sugiere que el $MgSO_4$ a una dosis de 3 mM/kg por vía i.p. como pretratamiento,

confiere un retraso contra las manifestaciones provocadas por AK (10 mg/kg) como modelo de SE, y una ligera protección contra la lesión neuronal. Este trabajo abarca tres aspectos importantes, conducta, electrofisiología y anatomía, y se observa que la respuesta a cada uno de estos aspectos tiene diferente magnitud para los mismos parámetros de dosis.

Es importante darle continuidad a los experimentos aquí iniciados, pues falta probar con dosis mayores de Mg, con otras sales de Mg, con formas de administración continua de Mg, ya se ha observado en este trabajo y en otros que el pretratamiento suele ser efectivo, pero falta aclarar que ocurre con el postratamiento, es posible que el Mg^{2+} no sea tan efectivo como anticonvulsivo, pero se puede considerar como un factor con potencial para retrasar la actividad de crisis, y proteger contra el daño neuronal.

APENDICE I

PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES

El análisis de las características de una imagen, que como en este caso puede ser una laminilla se puede realizar de manera cualitativa, sin embargo esta forma de obtención de información es extremadamente dependiente de la experiencia del observador. Un sistema para el procesamiento digital de imágenes puede facilitar notablemente los procesos normalmente utilizados para obtener información de imágenes, porque permite resaltar características que el investigador analiza en forma cualitativa, y además permite un análisis cuantitativo de la imagen, que de otra manera es difícil o imposible efectuar manualmente, sobre todo por limitaciones de tiempo y exactitud.

El sistema básico para el procesamiento digital de imágenes consta de los siguientes componentes:

1. Una computadora personal 386 con 4 Mb de memoria RAM.
2. Un monitor SVGA con su respectiva tarjeta de control, para el despliegue de información de los programas de procesamiento de imagen.
3. Un monitor analógico/digital, que se encargará de desplegar

las imágenes a procesar.

4. Una cámara de televisión o de video que será utilizada como fuente de imágenes, de acuerdo a las necesidades, puede ser de color o blanco y negro, que puede adaptarse a un microscopio (Fig. 13).

5. Una tarjeta de digitalización de imagen, que se encargará de transformar la información de la fuente de video a un tipo de señal que pueda ser manejada por la computadora (transforma la señal de analógica a digital).

6. Algún dispositivo de almacenamiento de información como pueden ser discos ópticos, discos duros e inclusive flexibles (aunque con muy bajo rendimiento en número de imágenes), así como unidades de cinta magnética (que proporcionan una gran capacidad de almacenamiento a bajo costo).

7. Programas para el control del equipo que se encargan de la captura de imágenes y programas para el procesamiento de las imágenes (Figs. 14 y 15). Por lo general los programas de control son de uso comercial y los de procesamiento son tanto comerciales como desarrollados especialmente por un programador.

8. Como equipo opcional, se tienen las impresoras que permiten obtener un reporte de los resultados del trabajo realizado. Para la impresión de una imagen son muy convenientes las impresoras laser, pero también se puede considerar la opción de una videoimpresora, que mejora en forma considerable la calidad del trabajo.

Otro dispositivo opcional es el modem que permite efectuar la comunicación vía telefónica, con otra computadora que tenga dicho

dispositivo.

El mouse o ratón es un dispositivo opcional u obligatorio dependiendo del tipo de programas que utilicemos.

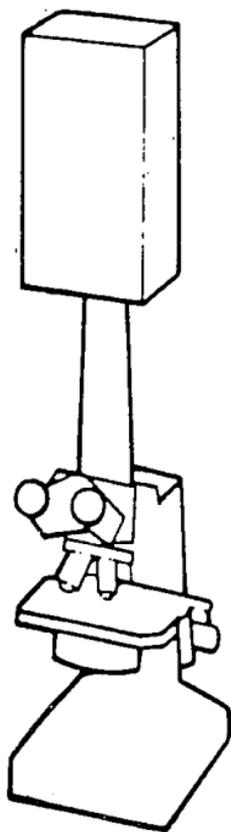


Fig.13. Esquema que ilustra el acoplamiento de una cámara de TV con un microscopio de campo claro para la captura de imágenes que posteriormente se transmiten a la computadora.



Obj#	Area	Perim.	Round.	MaJ.Ax.	Min.Ax.	Aspect	Angle	Centr-X	Centr-Y
1	1560	1002	48.22	143.3	56.4	2.542	74.07	322.2	122.6
2	782	449.6	28.57	62.26	27.9	2.947	105.2	372.7	127.7

Measure.....Min (#).....Max (#)....Range.....Sum.....Mean....StdDev

Area	782 (2)	1660 (1)	878	2442	1221	439
Perim.	449.6 (2)	1002 (1)	553.3	1452	726.2	278.6
Round.	28.57 (2)	48.22 (1)	27.65	68.79	34.39	13.82
MaJ.Ax.	62.26 (2)	143.3 (1)	81.12	225.6	112.8	38.58
Min.Ax.	27.9 (2)	56.4 (1)	28.49	84.31	42.15	14.24
Aspect	2.542 (1)	2.947 (2)	0.405	5.489	2.744	0.282
Angle	74.07 (1)	105.2 (2)	31.12	179.2	89.64	15.58
Centr-X	322.2 (1)	372.7 (2)	50.48	695	347.5	25.23
Centr-Y	122.6 (1)	127.7 (2)	5.133	250.3	125.1	2.568

Fig.14. Gráfica de la pantalla de la computadora que muestra el ambiente de trabajo del programa ImagePro-Plus.

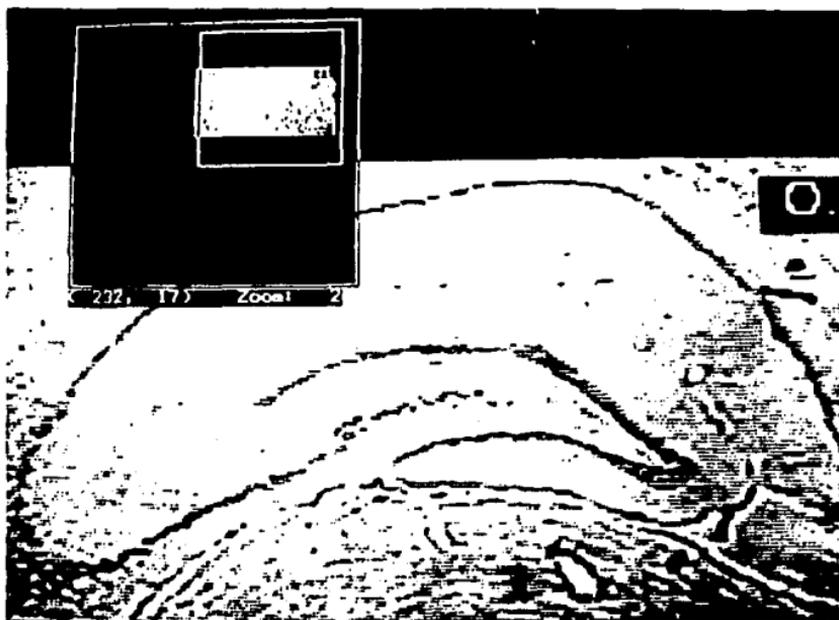


Fig.15. Imágen de un acercamiento (Zoom) del hipocampo de una rata, obtenido con el programa ImagePro-Plus.

BIBLIOGRAFIA

- Aikawa, J.K. Role of magnesium in biologic processes. Charles C. Thomas, Springfield, III., 1963.
- Babb, T.L., Brown, W.J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J.P., Crandall, P.H. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 1984, 25, 729-740.
- Bauer, K.F., Leonhardt, H. A contribution to the pathological physiology of the blood-brain barrier. J. Comp. Neurol., 1956, 106, 363-370.
- Ben-Ari, Y., Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 1985, 14, 375-403.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghillini, G., Naquet, R., Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole; Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience, 1981, 6, 1361-1391.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate

- in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. Journal of Neurochemistry. 1984, 43, 1369-1373.
- Berdichevsky, E.N., Riveros, S., Sánchez-Armass y Orrego, F. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. Neurosci. Lett., 1983, 36, 75-80.
- Berger, M. and Ben-Ari, Y. Autoradiographic visualization of [³H] kainic acid receptor subtypes in the rat hippocampus. Neurosci. Lett., 1983, 39, 337-342.
- Bizzozero, N., Merlini, L. Synthesis of C-Analogues of Kainic acid and their interaction with brain receptors. Estratto dalla Rivista "Il Farmaco" Luglio, 1984, 7, 612-617.
- Blackfan, K.D., McKhann, C.F. Acute glomerular nephritis in children; treatment of cerebral manifestations. J.A.M.A., 1931, 97, 1052-1055.
- Boilwig, T.G., Hertz, M.M., Paulson, O.B., Spotoft, H., Rafaelsen, O.J. The permeability of the blood-brain barrier during electrically induced seizures in man. Europ. J. Clin. Invest. 1977a, 7, 87-93.
- Borges, L., Gucer, G. Effects of magnesium on epileptic foci. Epilepsia. 1978, 19, 81-91.
- Burnhard, D.M., Crichton, S.A., MacVicar, B.A. Electrophysiological properties of reactive glial cells in the kainate-lesioned hippocampal slice. Brain Research, 1990, 510, 43-52.
- Busto, R., Dietrich, W.D., Mordecai, Y., Globus, T., Ginsberg, M.D. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. Neuroscience Letters, 1989,

110, 299-304.

- Cajal, S. Ramón y. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol.2. Instituto Ramón y Cajal, Madrid. 1911.
- Choi, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. The Journal of Neuroscience, February, 1987, 7, 369-379.
- Coan, E.J., Collingridge, G.L. Magnesium ions block an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. Neuroscience Letters, 1985, 53, 21-26.
- Coyle, J.T., Schwarcz, R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. Nature, 1976, 263, 244-246.
- Coyle, J.T. Neurotoxic action of kainic acid. J. Neurochem. 1983, 41, 1-11.
- Cutler, E.C., Alton, B.H. The control of strichnine convulsions by intraspinal injections of magnesium sulphate. J. Exp. Med. 1917, 23, 83-92.
- Dasheiff, R.M. Regional voltage map of the hippocampus during seizures. Experimental Neurology, 1989, 105, 189-196.
- DeGiorgio, C.M., Tomiyasu, U., Gott, P.S., Treiman, D.W. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. Epilepsia, 1992, 33, 23-27.
- Deulofen, R., Gascon, J., Giménez, N., Corachan, M. Magnesium and chronic fatigue syndrome. The Lancet, 1991, 338, 641.
- Dichter, M, Ayala, G.F. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. Science, 1987, 237, 157-164.
- Dinsdale, H. Does magnesium sulfate treat eclamptic seizures?

- Arch. Neurol. 1988, 45, 1360-1361.
- Donaldson, J.O. Does magnesium sulfate treat eclamptic seizures? Yes. Arch. Neurol. 1988, 45, 1360-1361.
- Fariello, R.G., Golden G.T., Smith, G.G., Reyes, P.F. Potential of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by an NMDA receptor antagonist. Epilepsy Res. 1989, 3, 206-213.
- Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., Rubio-Donnadieu, F. Epilepsia un enfoque multidisciplinario. Trillas, México, 1989.
- Ferris, C.F., Irvin, R.W., Potegal, M., Axelson, Kainic lesion of vasopressinergic neurons in the hypothalamus disrupts flank marking behavior in golden hamsters. Journal of Neuroendocrinology, 1990, 2.
- Furuya, S., Ohmori, H., Shigemoto, T., Sugiyama, H. Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells. Journal of Physiology 1989, 414, 539-548.
- Geddes, J.W., Cahan, L.D., Cooper, S.M., Kim, R.C., Choi, B.H., Cotman, C.W. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. Exp. Neurol. 1990, 108, 214-20.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. Manual de Química Fisiológica, México. editorial El Manual Moderno. 1978.
- Kaplan, P., Lesser, R., Fisher, R., Repke, J., Hanley, D. No, magnesium sulfate should not be used in treating eclamptic seizures. Arch. Neurol. 1988, 45, 1361-1364.
- Katz, A., Kerem, D., Sherman, D. Magnesium sulfate suppresses

- electroencefalografic manifestations of CNS oxygen toxicity. Undersea Biomedical Research. 1990, 17, 45-49.
- Katz, H.B. y Davies, C.A. The effect of early-life undernutrition and subsequent environment on morfological parameters of the rat brain. Brain. Res. 1982, 5, 53-64.
- Katz, H.B. y Davies, C.A. Effects of undernutrition at diferent ages early in life and later environmental complexity on parameters on the cerebrum and hippocampus in rats. J. Nutr. 1982, 112, 1362-1368.
- Katz, H.B. y Davies, C.A. The separate and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. Rev. Psychobiol. 1983, 16, 47-58.
- Katzman, M.D.R. Brain electrolytes and fluid metabolism. 1973.
- Kemeny, A., Boldizsar, H. Pethes, G. The distribution of cations in plasma and cerebrospinal fluid following infusion of solutions of salts of sodium, potassium, magnesium and calcium. J. Neurochem. 1961, 218-27.
- Kobayashi, S., Kikuchi, H. Ishikawa, M. Hashimoto, K. Regional changes of tissue pH and ATP content in rat brain following systemic administration of kainic acid. Brain Research. 1990, 514, 352-354.
- Koontz, W.L., Reid, K.H. Effect of parenteral magnesium sulfate on penicillin-induced seizure foci in anesthetized rats. Am. J. Obstet. Gynecol. 1985, 153, 96-99.
- Krammer, E.B., Lischka, M.F., Karobath, W., Schönbeck, G. Is there a selectivity of neuronal degeneration induced by in

- trastriatal injection of kainic acid?. Brain Research. 1979, 177, 577-582.
- Kruse, H.D., Orent, E.R. and McCollum, E.V. Studies on magnesium deficiency in animals 1. Symptomatology resulting from magnesium deprivation. J. Biol. Chem. 1932, 96, 519-539.
- Lazard, E.M., A preliminary report on the intravenous use of magnesium sulphate in puerperal eclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1925, 9, 178-188.
- Lee, J.C., Olszewski, J. Increased cerebrovascular permeability after repeated electroshocks. Neurology (Minneapolis). 1961, 11, 515-519.
- Lending, M., Slobody, L.B., Western, J. Effect of prolonged convulsions on the blood-cerebrospinal fluid barrier. Am. J. Physiol. 1959, 197, 465-468.
- Lester, R.A.J., Jahr, C.E. Quisqualate receptor-mediated depression of calcium currents in hippocampal neurons. Neuron. 1990, 4, 741-749.
- Lewis, D.V., Jones, L.S., Swartzwelder, H.S. The effects of baclofen and picrotoxin on epileptiform activity induced in the hippocampal slice by magnesium depletion. Epilepsy Res. 1989, 4, 109-118.
- Link, M.J., Anderson, R.E., Meyer, F.B. Effects of magnesium sulfate on pentylentetrazol-induced status epilepticus. Epilepsia. 1991, 32, 543-549.
- London, E.D., Coyle, J.T. Specific binding of [³H] kainic acid to receptor sites in rat brain. Mol. Pharmacol. 1979, 15, 192-505.
- Lorente de Nó, R.: Studies on the structure of cerebral cortex.

- II. Continuation of the study of the Amónic system, J. Physiol. Neurol. 1934, 46, 113-177.
- Lorenzo, A.V., Shirahige, I., Liang, M., Barlow, C.F. Temporary alteration of cerebrovascular permeability to plasma protein during drug-induced seizures. Amer. J. Physiol. 1972, 223, 268-277.
- Lothman, E.W., Collins, R.C. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain Research. 1981, 218, 299-318.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Kapur, J., Stringer, J.L. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequelae to limbic status epilepticus. Epilepsy Res. 1990, 6, 110-118.
- Lovell, K.L., Jones, M.Z.. Kainic acid neurotoxicity in the mouse cerebellum. Brain Research. 1980, 186, 245-249.
- Martin, R.L., Sinclair, J.D. Kainic acid on the rat ventral medullary surface depresses hypoxic and hypercapnic ventilatory responses. Respiration Physiology. 1990, 80, 55-70.
- Mattson, M.P., Guthrie, P.B., Kater, S.B. Intracellular messengers in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. Journal of Neuroscience Research 1988, 21, 447-464.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature. 1984, 309, 261-263.
- McDonald, J.W., Garofalo, E.A., Hood, T. Altered excitatory and

- inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Ann. Neurol. 1991,29, 529-41.
- McGeer, E.G., Olney, J.W. and Mc Geer, P.L. Kainic acid as a tool in neurobiology, Raven Press, New York, 1978.
- McGeer E.G. Zhu, S.G. Lamotrigine protects against kainate but not ibotenate lesions in rat striatum. Neuroscience Letters. 1990, 112, 348-351.
- McIntosh, T.K., Faden, A.I., Yamakami, I., Vink, R. Magnesium deficiency exacerbates and pretreatment improves outcome following traumatic brain injury in rats: 31P Magnetic resonance spectroscopy and behavioral studies. Journal of Neurotrauma. 1988, 5, 17-31.
- McIntosh, T. K., Vink, R., Yamakami, I., Faden, A.I. Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. Brain Research. 1989, 482, 252-260.
- Meldrum, B.S. Excitatory aminoacid transmitters in epilepsy. Epilepsia 1991, 32, 51-53.
- Meltzer, S.J., Auer, J. The effects of intraspinal injection of magnesium salts upon tetanus. J. Exp. Med. 1906,8,692-706.
- Miller, L.P. Johnson, A.E. Gelhard, R.E., Insel, T.R. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain-II Kainic acid receptors. Neuroscience 1990, 35, 45-51.
- Monaghan, D.T. and Cotman, C.W. The distribution of 3H kainic acid binding sites on rats CNS as determined by autoradiography. Brain Res. 1982, 252, 91-100.
- Morris, M.E., Darling, I.M. Magnesium cerebrospinal fluid concentrations and protein binding in magnesium-deficient rats.

Journal of Pharmaceutical Sciences, 1990, 79, 458-459.

- Murabe, Y., Ibata, Y. and Sano, Y. Morphological studies on neuroglia II. Responses of glial cells to kainic acid-induced lesions. Cell Tissue Res. 1981, 216, 569-580.
- Nadler, J.V., Perry, B.W., Cotman, C.W. Preferential vulnerability of hippocampus to intraventricular kainic acid. Cap. 12, in Kainic Acid as a Tool in Neurobiology, Raven Press. U.S.A. 1978.
- Nadler, J.V., Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. Life Sci. 1981, 29, 806-812.
- Nagata, t., Tsukamoto, Y., Matsumo, K., Hayashi, Y. Effects of kainic acid lesions in rat ventral lateral geniculate nucleus upon field potentials of the superior colliculus: Correlation between morphological and physiological observations. Brain Research. 1989, 483, 50-60.
- Nagy, J.I., Vincent, S.R., Lehman, J., Fibiger, H.C., McGeer, E.G. The use of Kainic acid in the localization of enzymes in the substantia nigra. Brain Research. 1978, 149, 431-441.
- Nitsch, C., Suzuki, R. Fujiwara, K., Klatzo, I. Incongruence of regional cerebral blood flow increase and blood-brain barrier opening in rabbits at the onset of seizures induced by bicuculline, methoxypyridoxine and kainic acid. J. Neurol. Sci. 1985, 67, 67-79.
- Nowak, L., Bregestovsky, P., Ascher, P. Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurones. Nature. 1984, 307, 462-5.
- Olney, J.W., Rhee, V. and Ho, O.L. Kainic acid: a powerful neuro-

- toxic analogue of glutamate. Brain Research. 1974, 77, 507-512.
- Olney, J.W., Fuller, T. and De Gubareff, T. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. Brain Research. 1979, 176, 94-100.
- Oppelt, W.W., MacIntyre, I., Rall, D.P. Magnesium exchange between blood and cerebrospinal fluid. Am. J. Physiol. 1963, 205, 959-62.
- Paxinos, G. The rat nervous system. Vol. I y II. Academic Press. Australia, 1985.
- Porta, S., Emsenhuber, W., Felsner, P., Helbig, J., Classen, H.G. Magnesium verhindert die strebinduzierte katecholamin sekretion-wirkungsweise. Magnesium bulletin. 1990, 1, 21-26.
- Pritchard, J.A., Cunningham, F.G., Pritchard, S.A. The parkland memorial hospital protocol for treatment of eclampsia: evaluation of 245 cases. Am. J. Obstet. Gynecol. 1984, 148, 951-963.
- Psarropoulou, C., Kostopoulos, G. Long-term enhancement of post synaptic excitability after brief exposure to Mg²⁺-free medium in normal and epileptic mice. Brain Research. 1990, 508, 70-75.
- Rausche, G., Igelmund, P., Heinemann, V. Effects of changes in extracellular potassium, magnesium and calcium concentration on synaptic transmission in area CA1 and the dentate gyrus of rat hippocampal slice. Pflügers Arch. 1990, 415, 588-593.
- Redburn, D.A., Donosot, J.A., Mitchell, C.K., Gómez-Ramos, P., Samson, F.E. Kainic acid-induced denervation supersensitivity of Nicotinic, Cholinergic receptors in ganglion cells of the

- rat retina. Exp. Eye Res., 1984, 38, 449-461.
- Ribak, C.E. Contemporary methods in neurocytology and their application to the study of epilepsy. Advances in neurology. 1986, 44, 739.
- Represa, A., Robain, O., Tremblay, E., Ben-Ari, Y. Hippocampal - plasticity in childhood epilepsy. Neuroscience Letters. 1989, 99, 351-355.
- Roeling, T.A.P., Veening, J.G., Kruk, M.R., Nieuwenhuys, R. Grooming behaviour elicited by kainic acid evoked cell body stimulation in the hypothalamus of the rat. Neuroscience Research Communications 1990, 6.
- Sah, P., Hestrin, S., Nicoll, R.A. Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate enhances excitability of neurons. Science. 1989, 246, 815-817.
- Schwarcz, R, Coyle, J.T. Striatal lesions with Kainic acid: Neurochemical Characteristics. Brain Research. 1977, 127, 235-249.
- Schwarcz, R. and Fuxe, K. ³H Kainic acid binding: relevance for evaluating the neurotoxicity of kainic acid. Life Sci. 1979, 24, 1471-1480.
- Seil, F.J., Seil, N., Blank, K., Leiman, A.L. Toxic effects of kainic acid on mouse cerebellum in tissue culture. Brain Research. 1979, 161, 253-265.
- Seress, L., Pokorn, J. Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. J. Anat. 1981, 133, 181-195.
- Shinozaki, H. and Konishi, S. Action of several antihelminthics

- and insecticides in rat cortical neurones. Brain Research. 1970, 24, 368-371.
- Sibai, B.M. Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1990, 62, 1141-1145.
- Simon, I.R., Atweh, S. and Kuhar, M.J. Jour. Neurochem. 1976, 26, 904-922.
- Singh, T.J. Characterization of a bovine brain magnesium-dependent phosphotyrosine protein phosphatase that is inhibited by micromolar concentrations of calcium. Biochemical and Biophysical research communications. 1990, 167, 621-627
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Seitelberger, F., Hornykiewicz, O. Kainic Acid-induced seizures: Neurochemical and histopathological changes. Neuroscience. 1983, 10, 1301-1315.
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Seitelberger, F., Hornykiewicz, O. Kainic Acid-induced seizures: Dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. Brain Research. 1985, 338, 289-295.
- Storcheim, F. Status epilepticus treated by magnesium sulphate injected intravenously. J.A.M.A. 1933, 101, 1313-1314.
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I. and Ramirez, L. Massy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. Ann. Neurol. 1989, 26, 321-30.
- Suzuki, R., Nitsch, C., Fujiwara, K., Klatzo, I. Regional changes in cerebral blood flow and blood-brain barrier permeability during epileptiform seizures and acute hypertension in rabbits. Jour. Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1984, 4, 96-102.

- Takemoto, T. Isolation and structural identification on naturally occurring excitatory amino acids. In kainic acid as a tool in neurobiology Eds. McGeer E.G., Olney J. W. y McGeer, P.L. Raven Press, New York. 1978.
- Tancredi, V., Hwa, G.G.C., Zona, C., Brancati, A., Avoli, M. Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. Brain Research. 1990, 511, 280-290.
- Taylor, R.L. Magnesium sulphate for AIP seizures. Neurology. 1981, 31, 1371-1372.
- Tremblay, E., Nitecka, L., Berger, M. and Ben-Ari, Y. Maturation of kainic acid seizure brain damage syndrome in the rat I. Clinical, electrographic and metabolic observations. Neuroscience. 1984, 13, 1051-1072.
- Unnerstall, J.R. and Walmsley, J.K. Autoradiographic localization of high-affinity ³H-kainic acid bindings sites in the rat forebrain. Eur. J. Pharmac. 1983, 86, 361-371.
- Velisek, L., Roztocilová, L., Kubová, H., Mares, P. Effects of carbamazepine and phenobarbital on kainic acid-induced model of psychomotor seizures during ontogenesis in the rat. Activ. nerv. super., 1989, 31, 263.
- Walton, N.Y., Treiman, D.M. Phenobarbital treatment of status epilepticus in a rodent model. Epilepsy Research. 1989, 4, 216-221.
- Wang, H., Gopala, K.V., McNeill, J.R., Sulakhe, P.V. and Triggle, C.R. Calcium antagonizes the magnesium-induced high affinity state of the hepatic vasopressin receptor for the agonist in-

- teraction. Br. J. Pharmacol. 1990, 100, 5-10.
- Waniewski, R.A., McFarland, D. Intrahippocampal kainic acid reduces glutamine synthetase. Neuroscience. 1990, 34, 305-310.
- Warner, D.S. Magnesium and the injured brain. Journal of Neurosurgical Anesthesiology. Vol. 1, No. 1989, 4, 360-363, .
- Winkler, A.W., Smith, P.K., Hoff, H.E. Intravenous magnesium sulfate in the treatment of nephritic convulsions in adults. J. Clin. Invest. 1942, 21, 207-216.
- Woodward, W.R., Meshul, Ch.K., Coull, B.M. Ultrastructural and functional evidence for the survival of corticogeniculate neurons in Kainic acid-lesioned lateral geniculate nucleus. Brain Research. 1989, 494, 42-54.