



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“SENSIBILIDAD DE LARVAS DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*) A
ÁCIDO KAÍNICO COMO INDUCTOR DE EPILEPSIA DE
LÓBULO TEMPORAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G A
P R E S E N T A:**

LUISA AUSTIN HASAM HENDERSON



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. HERMINA PASANTES ORDÓÑEZ
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Hoja de datos del jurado

Datos del alumno.

Hasam
Henderson
Luisa Austin
54 89 18 13
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300501142

Datos del tutor

Dra.
Pasantes
Ordóñez
Herminia

Datos del sinodal 1

Dra.
María Eugenia
Gosebatt
Bonaparte

Datos del sinodal 2

Dra.
América Nixtin
Castañeda
Sortibrán

Datos del sinodal 3

Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade

Datos del sinodal 4

M. en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay

Datos de la tesis

Sensibilidad de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) a ácido kaínico como inductor de epilepsia de lóbulo temporal
80 p.
2010

Los experimentos de esta investigación se llevaron a cabo en la Universidad de Helsinki, Finlandia, bajo la tutoría del Dr. Pertti Panula, director de laboratorio en el Centro de Neurociencias de esta misma universidad. La redacción de este trabajo fue dirigida por la Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, investigadora emérita del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La revisión del trabajo fue llevada a cabo por la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, la Dra. América Nixtin Castañeda Sortibrán, el Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade y el M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay, a quienes externo mi agradecimiento por las corrección hechas a este escrito.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Hermina Pasantes por su tiempo y apoyo para la realización y culminación de este trabajo.

Al Dr. Pertti Panula por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo y por guiarme a lo largo de los experimentos. A Madhusmita Priyadarshini, Maria Sundvik y Veera Torkko por sus enseñanzas y paciencia, y a todo el equipo de trabajo del laboratorio por su apoyo.

A Miguel Ángel Palomino por sus palabras de aliento.

A Erika Vázquez y Rosa por su apoyo.

A mi hermano, por darle sentido a mi vida.

A mis padres, por su inmenso amor y por su apoyo incondicional en este proceso. Si he llegado hasta aquí ha sido porque siempre han estado conmigo.

A mi abuela, por ser una gran inspiración en mi vida.

A Rocío Castañeda, por su amistad, compañía y apoyo en todo momento.

A Rebeca Espejel, Ernesto Sandoval, Marisol Arteaga y Jesús García por su cariño y apoyo. A Logos y a todos aquellos, alumnos y maestros, que me motivaron a seguir adelante.

A Yosune Chamizo y Mariana Rivera por estos largos años de amistad.

A Santiago Robles por su amistad y apoyo para la realización de varios de los esquemas de este trabajo.

A Jani Pesu por su compañía a lo largo de los experimentos.

A los viejos amigos que permanecen y que siguieron de cerca este proceso: Jerónimo Arellano y Pablo García Rodarte.

Sensibilidad de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) a ácido kaínico como inductor de epilepsia de lóbulo temporal

Índice.....	III
Lista de figuras.....	VII
Abreviaturas.....	IX
Resumen.....	X
1. Introducción.....	1
1.1 Epilepsia, un desorden neurológico.....	1
1.2 Epilepsia del lóbulo temporal.....	2
1.3 Ácido kaínico y sus receptores.....	3
1.4 Neurotoxicidad del ácido kaínico.....	6
1.5 Ácido kaínico como inductor de epilepsia del lóbulo temporal.....	7
1.6 El pez cebra como modelo experimental de epilepsia de lóbulo temporal.....	9
1.7 Desarrollo embrionario.....	9
1.8 Neuroanatomía.....	11
2. Justificación.....	14
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivo específico.....	15
5. Metodología.....	
5.1 Mantenimiento del pez cebra.....	16
5.2 Empleo del modelo.....	16
5.3 Tratamiento con ácido kaínico.....	17
5.4 Registro de nado.....	18
5.5 Tinciones.....	20
5.5a TUNEL.....	20
5.5b Naranja de acridina.....	21
6. Resultados.....	
6.1 Tinción TUNEL.....	21
6.2 Tinción con naranja de acridina.....	23
6.3 Registros de los patrones de nado.....	28
6.3a Fase I: Registros en larvas de 5, 6 y 7 dpf.....	29
6.3b Fase I: Análisis de los patrones de nado.....	36
6.3c Fase II: Registros en larvas de 6 y 7 dpf.....	46
6.4d Fase II: Análisis de los patrones de nado.....	48

7. Discusión.....	58
7.1 Comportamiento.....	62
8. Conclusiones.....	65
9. Perspectivas.....	66
10. Bibliografía.....	67

Palabras clave: Pez cebra, epilepsia del lóbulo temporal, apoptosis, ácido kaínico, excitotoxicidad, sistema límbico, comportamiento, tinción en bloque.

Listas de figuras

Figura 1. Estructura del ácido kaínico.....	3
Figura 2. Fotomicrografía de la formación de nuevas fibras musgosas en la región CA3.....	4
Figura 3. Estructura de receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos.....	4
Figura 4. Topología de receptores AMPA y NMDA.....	6
Figura 5. Subunidades de los receptores de kainato y sus diferentes variantes.....	8
Figura 6. Desarrollo embrionario del pez cebra.....	10
Figura 7. Estadio larvales del pez cebra.....	11
Figura 8. Estructuras cerebrales de pez cebra adulto y humano.....	11
Figura 9. Estructuras cerebrales del pez cebra.....	13
Figura 10. Sistema límbico.....	13
Figura 11. Grupos y subgrupos en los experimentos.....	17
Figura 12. Ejemplos de campos no divididos y divididos.....	19
Figura 13. Campo dividido en cinco zonas.....	20
Figura 14. Estructuras cerebrales dorsales que sufrieron apoptosis después de la exposición al ácido kaínico.....	24
Figura 15. Estructuras cerebrales ventrales que sufrieron apoptosis después de la exposición al ácido kaínico.....	25
Figura 16. Imágenes de la tinción con naranja de acridina.....	27
Figura 17. Registro de nado de un experimento representativo, evaluación realizada 0 horas después de AK.....	30
Figura 18. Registro de nado de un experimento representativo, evaluación realizada 24 horas después de AK (5 dpf).....	32
Figura 19. Registro de nado de un experimento representativo, evaluación realizada 48 horas después de AK (5 dpf).....	34
Figura 20. Análisis de la distancia total recorrida (5 dpf).....	37
Figura 21. Análisis comparativo de la distancia total recorrida (5 dpf).....	39
Figura 22. Análisis de la distancia máxima recorrida (5 dpf).....	41
Figura 23. Análisis comparativo de la distancia máxima recorrida (5 dpf).....	42

Figura 24. Análisis del ángulo de torsión (5 dpf).....	44
Figura 25. Análisis del serpenteo (5 dpf).....	45
Figura 26. Análisis de la velocidad angular (5 dpf).....	45
Figura 27. Registro de nado de un experimento representativo, evaluación realizada 0 horas después de AK (6dpf).....	47
Figura 28. Análisis de la distancia total recorrida (6 dpf).....	49
Figura 29. Análisis comparativo de la distancia total recorrida (6 dpf).....	50
Figura 30. Análisis de la distancia máxima recorrida (6 dpf).....	52
Figura 31. Análisis comparativo de la distancia máxima recorrida (6 dpf).....	53
Figura 32. Análisis del ángulo de torsión (6 dpf).....	55
Figura 33. Análisis del serpenteo (6 dpf).....	56
Figura 34. Análisis de la velocidad angular (6 dpf).....	56
Figura 35. Rutas efectoras del ácido kaínico.....	62
Figura 36. Ejemplo de una trayectoria de huida.....	63

Listas de tablas

Tabla 1. Tiempos de administración del AK y registros.....	18
---	----

Abreviaturas

AK – Ácido kaínico

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

cm. - centímetros

CPS - Ataques parciales complejos

H -Hipotálamo

h - Horas

LTLE - epilepsia lateral del lóbulo temporal

MTLE - epilepsia mesial del lóbulo temporal

NMDA - N-metil-D-aspartato

NOS - Oxido nítrico sintasa

OB- Bulbo olfatorio

OT – Optic tectum

PTZ - pentilenotretazol

ROS - especies reactivas del oxígeno

SE - status epiléptico

SGTCS - Ataques tónicos y clónicos secundarios generalizados

SPS - Ataques parciales simples

SRS - Ataques recurrentes espontáneos

TLE -Epilepsia del lóbulo temporal

T- Telencéfalo

μ M- Micromolar

Resumen

La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar un modelo experimental de epilepsia del lóbulo temporal empleando el pez cebra. A distintos estadios larvarios se les administró ácido kaínico en diferentes concentraciones y se evaluaron sus efectos tanto en el comportamiento como en el daño neuronal. Se observaron alteraciones en la conducta y se identificaron zonas apoptóticas en diversas áreas cerebrales relacionadas con las áreas afectadas en modelos de epilepsia experimental en roedores y en epilepsia del lóbulo temporal en humanos.

1. Introducción

1.1 Epilepsia, un desorden neurológico

El término *epilepsia* agrupa a un conjunto muy complejo de síndromes. De entre ellos se han establecido dos grandes categorías, las epilepsias generalizadas y las epilepsias focales. La epilepsia generalizada es el resultado de una actividad neuronal anormal en ambos hemisferios cerebrales que se traduce por el desarrollo de ataques o status epiléptico (SE), que son episodios convulsivos de aproximadamente 30 minutos de duración. Durante estos episodios la actividad neuronal se ve alterada provocando convulsiones, espasmos musculares y pérdida del conocimiento, se presentan también perturbaciones en las sensaciones, emociones y en el comportamiento. Los ataques epilépticos son consecuencia de una descarga neuronal hipersincrónica, debido a una disfunción fisiológica temporal en el cerebro. Durante el SE la tasa de impulsos neuronales incrementa alcanzando hasta 500 disparos por segundo, como resultado de la falta de inhibición o por el exceso de excitación neuronal. Dependiendo de la severidad del ataque, puede haber daño cerebral. Hasta la fecha se desconoce la etiología del 50% de los ataques (NINDS, Nov. 2007). En el caso de la epilepsia focal o parcial los ataques ocurren en un punto localizado del cerebro pero pueden expandirse a todo el órgano. Esta última categoría está subdividida en simple y compleja, dependiendo de la sintomatología. Aproximadamente el 60% de los pacientes con epilepsia presentan ataques focales, dentro de los cuales el más frecuente es la epilepsia del lóbulo temporal (TLE, NINDS, Nov. 2007).

Aunque se conoce poco acerca de los factores asociados con el desarrollo de la epilepsia, se han propuesto, entre otras causas, las siguientes: daño cerebral prenatal, desequilibrio de neurotransmisores, niveles altos de neurotransmisores excitadores (glutamato), niveles bajos de neurotransmisores inhibidores (GABA), presencia de tumores, derrames cerebrales, Alzheimer, ataques cardíacos, meningitis, encefalitis viral, enfermedades parasitarias, alcoholismo y consumo de sustancias tóxicas. Por otro lado se han descrito alrededor de 500 genes asociados a un aumento en la susceptibilidad para desarrollar epilepsia (CUREEPILEPSY OMS NINDS, Nov. 2007).

Múltiples estudios clínicos y experimentales han demostrado que los ataques crónicos y prolongados inducen muerte neuronal, especialmente en el área del hipocampo y otras

regiones límbicas, así como en el cerebelo y la corteza. Es por eso que, en ocasiones, los pacientes con ataques recurrentes presentan deficiencia en el aprendizaje y pérdida de memoria. Estas consecuencias podrían reflejar la incidencia de muerte neuronal. Estudios realizados en modelos animales han ofrecido cierto sustento a esta posibilidad, como se discutirá más adelante (ref. Murphy, B. 2007).

1.2 Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es un grupo de síndromes caracterizados por el desarrollo de ataques recurrentes espontáneos (SRS) y alteraciones morfológicas en el hipocampo. Los SRS se originan en el área media o lateral del lóbulo temporal (Engels, 1989), mientras que las alteraciones morfológicas más frecuentes son la pérdida neuronal en el giro dentado y el crecimiento de axones granulares aberrantes hacia la capa interna (Zhang, X. 2002). Se reconocen dos tipos de TLE: la epilepsia mesial del lóbulo temporal (MTLE) que se origina en el hipocampo y amígdala, en la zona interna del lóbulo temporal; y la epilepsia lateral del lóbulo temporal (LTLE), que se presenta en la neocorteza, en la zona externa del lóbulo (ILAE). Los ataques han sido clasificados en varios grupos. Los ataques parciales simples (SPS) o auras, son aquellos que, sin afectar la conciencia, causan sensaciones en el paciente. Los ataques parciales complejos (CPS) afectan la conciencia del individuo provocando movimientos automáticos e incapacidad para responder a estímulos, entre otras. Aquellos ataques que se extienden al cerebro completo se denominan ataques tónicos y clónicos secundarios generalizados (SGTCS), en este tipo de ataques las extremidades permanecen rígidas y hay pérdida de conciencia (ILAE).

Con el propósito de profundizar en los mecanismos de generación y desarrollo de la epilepsia, así como para implementar sistemas rápidos para probar estrategias terapéuticas, se ha desarrollado una larga serie de modelos experimentales, entre los que se cuenta el tratamiento con una neurotoxina, el ácido kaínico, que interactúa con un subtipo de receptor para el ácido glutámico, el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro. El ácido kaínico es un análogo extremadamente potente del glutamato; de 30 a 100 veces más que éste último y que muestra un efecto excitotóxico importante (Akhlaj, *et al.* 2006, Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000).

1.3 Ácido kaínico y sus receptores

El ácido kaínico (AK) es una excitotoxina aislada por primera vez del alga *Digenea simplex* en Japón en 1957 (Fig. 1). Es un agonista específico para un tipo de receptores de glutamato, que por su susceptibilidad a esta toxina se conocen como receptores al kainato.

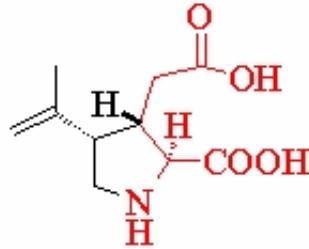


Figura 1. Estructura del ácido kaínico

El 90% de las sinapsis excitadoras en el sistema nervioso central emplean al glutamato como neurotransmisor. Los receptores al glutamato regulan la transmisión sináptica rápida, participan en la maduración neuronal, en mecanismos de aprendizaje y memoria, y en los procesos de muerte neuronal (Lerma, J. 2004). Estos receptores se han clasificado en dos grandes familias: los receptores metabotrópicos son aquellos acoplados a proteínas G que actúan disparando cadenas de segundos mensajeros, y los receptores ionotrópicos, que al ser activados, producen un aumento rápido en la permeabilidad de la membrana, a través del canal iónico formando por el receptor, cuya apertura está acoplada a la unión de un agonista (Fig. 3) (Lerma, J., 2004).

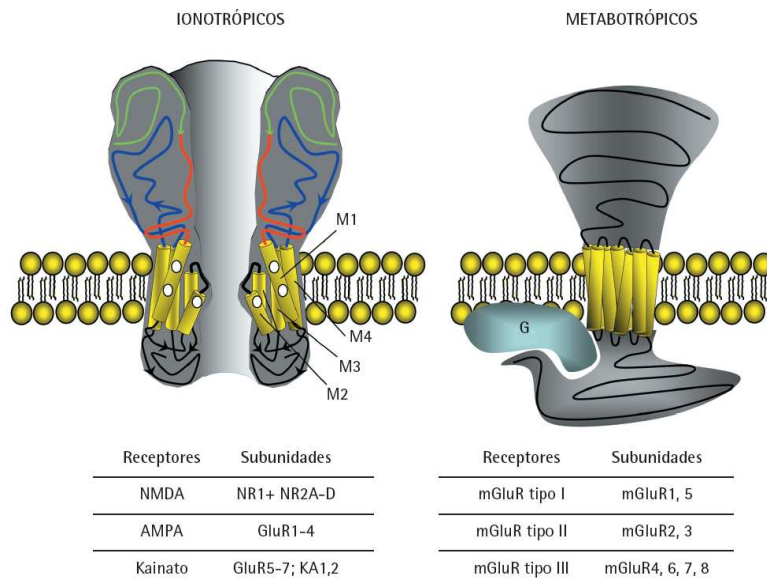


Figura 2. Estructura de receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. (Lerma, J. 2004)

Los receptores ionotrópicos se dividen a su vez en tres tipos, dependiendo de su ligando preferencial: receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y receptores de kainato. Todos ellos tienen una conformación estructural semejante; están constituidos por un dominio extracelular amino terminal y cuatro dominios intramembranales con un dominio carboxilo terminal intracelular (Fig. 4). El sitio de reconocimiento al agonista se encuentra próximo al amino terminal (Lerma, J., 2004).

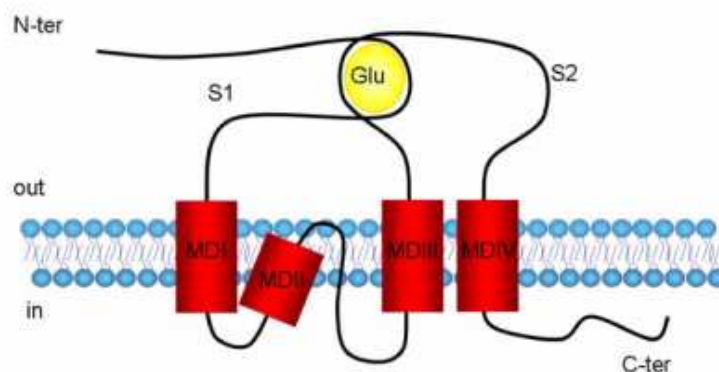


Figura 3. Topología de receptores AMPA y NMDA (Pinheiro, P., 2006).

Los receptores de kainato son canales permeables a cationes que necesitan de un ligando y que son fácilmente activados con bajas concentraciones de kainato (Pinheiro, P., 2006). Son combinaciones tetraméricas de cinco subunidades, tienen características estructurales similares a las de los receptores ionotrópicos de glutamato y se expresan a través de todo el sistema nervioso central. El juego de subunidades que constituyen al receptor es heterogéneo, depende de la zona del cerebro. Esta versatilidad conformacional produce diferentes propiedades farmacológicas y electrofisiológicas (Castillo, P.E., 1997).

Estos receptores se encuentran tanto en las terminales presinápticas como en las postsinápticas y son fundamentales en el mantenimiento de la excitabilidad. Actúan como un sistema de señalización doble, como canales iónicos y como disparadores de cascadas de segundos mensajeros al activar proteínas G (Lerma, J., 2004). Por ejemplo, los receptores de kainato postsinápticos en el hipocampo contribuyen a corrientes excitadoras, mientras que los presinápticos parecen regular la liberación de glutamato.

Los receptores ionotrópicos de kainato están constituidos por cinco subunidades: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. Las primeras tres subunidades forman receptores homoméricos funcionales que pueden ser activados por ácido kaínico y glutamato en sistemas heterólogos, mostrando afinidad por el kaínato en concentraciones de 50-100nM. Estas subunidades se denominan de baja afinidad.

Las subunidades KA1 y KA2 expresan una alta afinidad por el ácido kaínico. No forman receptores homoméricos funcionales pero pueden combinarse con GluR5, GluR6 y GluR7 para formar receptores heteroméricos (Pinheiro, P., 2006). KA1 se expresa importantemente en el hipocampo, amígdala y corteza endorital (Castillo, P.E., 1997).

Las diferentes variantes de ensamblaje de los receptores de kainato difieren en su dominio c-terminal citoplasmático. Por ejemplo, GluR5 tiene tres alternativas diferentes GluR5a, GluR5b y GluR5c, y una cuarta que sólo se encuentra en humanos: GluR5d. De GluR6 han sido descritas dos variantes principales GluR6a y GluR6b y GluR6c sólo en humanos. Y para GluR7 han sido descritas también dos variantes principales (Fig. 5) (Pinheiro, P., 2006).

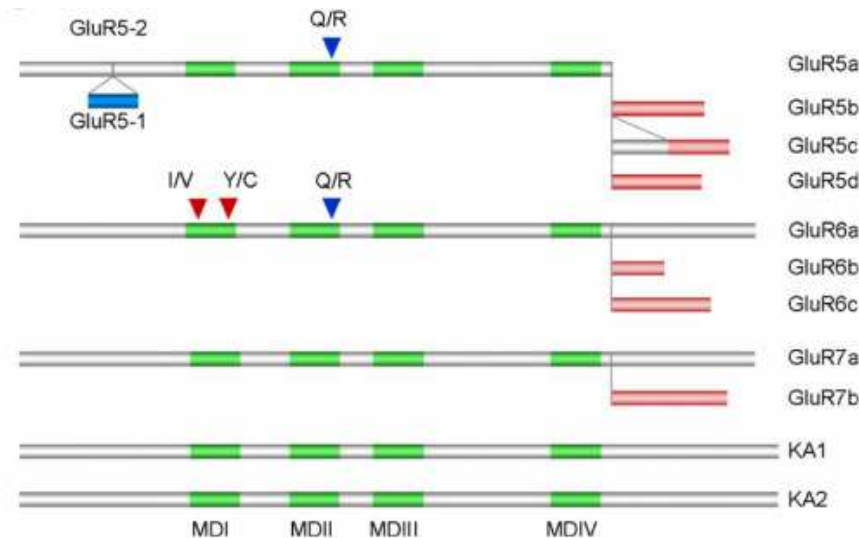


Figura 4. Subunidades de los receptores de kainato y sus diferentes variantes (Pinheiro, P., 2006).

La heterogeneidad de estos receptores, debido a las posibilidades de ensamblaje entre las subunidades, ha complicado la caracterización y el estudio de sus propiedades funcionales y farmacológicas.

1.4 Neurotoxicidad del ácido kaínico

Los efectos del AK sobre el sistema límbico semejan el daño producido por ataques epilépticos repetidos, por lo que este es empleado como modelo experimental para la investigación de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington.

Su administración sistemática en ratas produce ataques persistentes y daño cerebral en áreas específicas como el hipocampo y cuerpo estriado (Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000).

Reportes previos confirman que el daño producido por el AK en el cerebro es específico a ciertas áreas como la amígdala, la corteza y el hipocampo (Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000).

Dentro de este modelo se han establecido patrones conductuales para evaluar el daño ocasionado por la toxina; una graduación de comportamiento que va del nivel 0 al 5 (Baran, 1994) ha sido empleada:

0 - Normal, temblores moderados (WDS, wet dog shake), sin convulsiones.

I – Temblores frecuentes (WDS), mirada fija, pocas convulsiones focales afectando la cabeza y las extremidades.

II –Temblores frecuentes (WDS), frecuentes convulsiones focales, cierre de ojos, inhalaciones, clónicos faciales, mirada fija.

III – Temblores frecuentes (WDS), convulsiones frecuentes, movimientos de cabeza, severos clónicos faciales, clónicos de las extremidades superiores, erguimientos y salivación.

IV – Continuos ataques, erguimientos con pérdida de balance y desplome.

V – Ataques continuos generalizados y muerte en las primeras 3 horas.

Una graduación similar a la desarrollada para roedores ha sido adecuada para el modelo de pez cebra, ésta se describe a detalle en la discusión.

La neurotoxicidad del AK parece estar asociada con la inhibición de las funciones mitocondriales (Farooqui, *et al.* 2001), la activación de los receptores de kainato presinápticos y la liberación de glutamato endógeno. Las terminales nerviosas y los axones son más resistentes a su toxicidad que el cuerpo celular (Akhlaq, *et al.* 2006).

La sobre estimulación de los receptores de kainato produce una depolarización de la membrana celular con el consecuente aumento del calcio libre intracelular. Los niveles elevados del calcio intracelular a su vez, promueven la activación de diversas fosfolipasas, cinasas, endonucleasas y proteasas, así como de la oxido nítrico sintasa (NOS) y la

liberación de citocinas proinflamatorias, generando ROS y produciendo daño neuronal (Akhlaq, *et al.* 2006).

Por otro lado, el AK incrementa la reactividad del 4-hidroxinonal (4-HNE) y disminuye los niveles intracelulares del glutatión (Ong, *et al.* 2000) en el hipocampo; esto ocasiona un aumento en los niveles de ROS intracelulares y, por lo tanto, el desarrollo del estrés oxidante (Farooqui, *et al.* 2004).

1.5 Ácido kaínico como inductor de epilepsia del lóbulo temporal

La administración de ácido kaínico intracerebral en ratas produce ataques epilépticos en el hipocampo, particularmente en la región CA3 (Cornu Ammonis 3), zona compuesta por una densa red de axones glutamatérgicos que interconectan a las neuronas piramidales, encargándose de la generación de actividades sincronizadas (Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000).

Las neuronas piramidales responden al AK independientemente de si la administración es local o distal, debido a la activación de los receptores de kainato de alta afinidad que responden a concentraciones muy bajas del ligando. Estos receptores se encuentran mayormente en la región sináptica de las fibras musgosas (Ben-Ari Y. y Cossart 2000).

Una vez inducido el SE se observa la formación de nuevas sinapsis de fibras musgosas en las neuronas piramidales CA3 (Fig. 2) y en las neuronas granulares, con un incremento en la densidad de los receptores de kainato. La hiperactividad neuronal produce daño cerebral y también facilita la formación de sinapsis nuevas y aberrantes (Ben-Ari Y. y Cossart 2000).

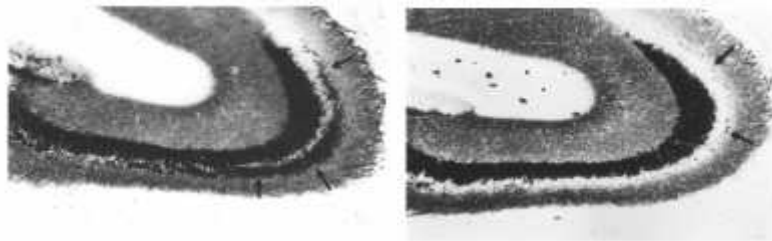


Figura 5. Fotomicrografía de la formación de nuevas fibras musgosas en la región CA3. A la derecha la región CA3 de una rata control, a la izquierda la región CA3 de una rata epiléptica. Las flechas señalan la banda infrapiramidal aberrante de fibras musgosas. Tomado de Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000.

Una vez que los ataques son producidos, éstos se expanden a la región CA1 junto con otras estructuras límbicas, produciendo patrones de muerte neuronal similares a aquellos

encontrados en pacientes con TLE (Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000). Se ha demostrado que el daño neuronal inducido por esta toxina sólo puede ser observado una vez que las sinapsis de neuronas granulares y fibras nerviosas son funcionales (Ben-Ari, Y. y Cossart, 2000).

1.6 El pez cebra como modelo experimental de epilepsia del lóbulo temporal

En comparación con los modelos murinos o de rata, el pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo empleado sólo recientemente,. Fue implementado durante la década de los setenta del siglo pasado para estudios de embriología y desarrollo en la Universidad de Oregon por el grupo de Streisinger (Streisinger, 1981).

El pez cebra es un ciprínido perteneciente a los teleósteos. El adulto mide de 2 a 6 cm, su mantenimiento es sencillo y económico, es fácil de reproducir, tiene ciclos generacionales de 2 a 3 meses (Maldonado, 2003), la cantidad de huevos que se obtienen de cada hembra es de entre 100 a 200 cada semana y los embriones son transparentes, por lo que se puede observar detalladamente el desarrollo (Kaslin, 2004). Estas características lo hacen económico y funcional para muchos estudios.

El pez cebra se ha usado ampliamente para estudios genéticos y de embriología en vertebrados, y actualmente como un modelo en el estudio de la epilepsia (Baraban, 2005), del cáncer (Berghmans, 2005), del uso de drogas (Nikovic, 2006), de trastornos hematológicos (Shafizadeh, 2004) y para la búsqueda de nuevos medicamentos (Panula, 2000).

Actualmente se ha aceptado como un modelo accesible y de fácil manejo que ha arrojado excelentes resultados en distintos campos de la investigación, principalmente en aquellos que involucran un seguimiento o una evaluación en estados embrionarios.

1.7 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario del pez cebra ha sido ampliamente descrito. La embriogénesis es externa y el embrión es transparente, lo cual facilita su estudio. Es posible seguir el proceso desde las primeras divisiones celulares hasta la formación de las capas embrionarias (endodermo, mesodermos y ectodermo), (Fig. 6), (Maldonado, 2003).

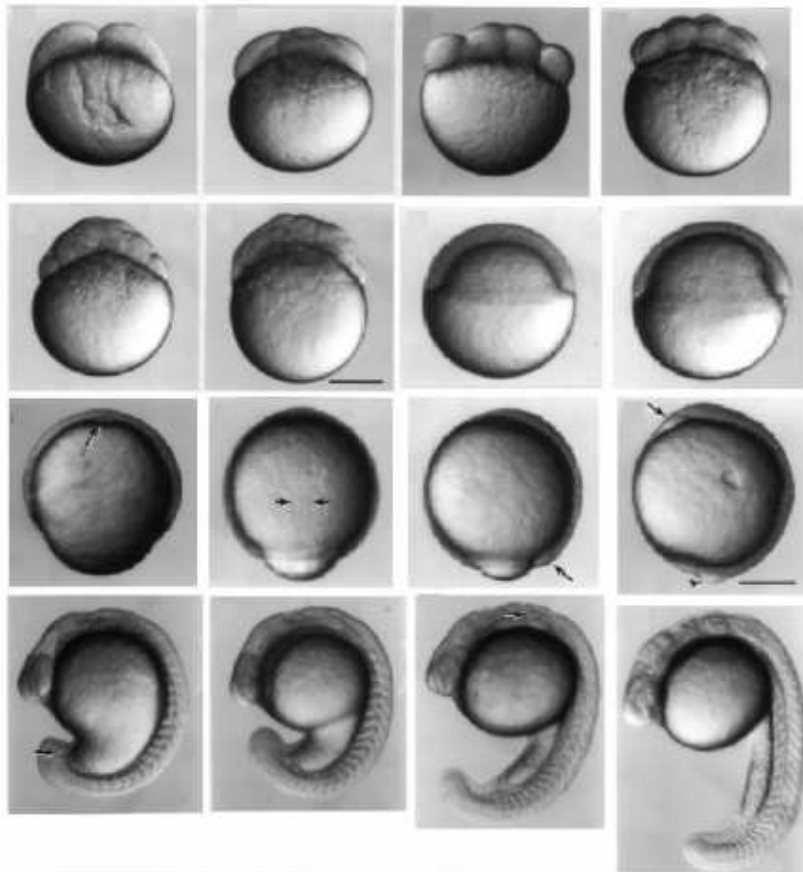


Figura 6. Desarrollo embrionario de pez cebra. Se muestran imágenes de las etapas de blastulación, epíbole, gastrulación y somitogénesis. (Maldonado, 2003).

La etapa de cigoto se desarrolla durante los primeros tres cuartos de hora después de la fertilización. El citoplasma se segrega hacia el polo animal para formar el blastodisco.

El periodo de división inicia a partir de la primera hora y ocurren seis divisiones. Los blastómeros se dividen sincrónicamente cada 15 minutos (Fig 6).

La etapa de blástula se inicia con la décima división, cuando las membranas celulares dejan de formarse en los blastómeros de la base. Al final se alcanza el 50% de epibolia. Después de este proceso las divisiones son asincrónicas.

En la gastrulación, que tiene lugar de la quinta a la décima hora, hay movimientos involución y convergencia. Se forma el epiblasto, el hipoblasto y los ejes embrionarios.

Posteriormente aparecen las somitas, se produce la organogénesis primaria, comienza a haber movimiento de la larva y se desarrolla la cola. Finalmente el cuerpo se libera de la curvatura obligada al rodear al saco vitelino. Las larvas salen del huevo 72 h después de haber sido fertilizadas (Fig. 7). El estadio larval abarca desde los 3 hasta los 10 días después de la fertilización (Berghmands, S., 2007).

A los cinco días ya tienen formados los órganos sensoriales y los sistemas circulatorio, digestivo y nervios son totalmente funcionales, (Fig. 7), (Maldonado, 2003).



Figura 7. Imágenes de estadios larvales de pez cebra. E y F son larvas de 72 h (3 días), G y H de 120 h (5 días). (www.zfin.org, 2008).

1.8 Neuroanatomía

El cerebro del pez cebra sufre un proceso de regionalización temprano en el desarrollo. La organización del cerebro del embrión y la del adulto es muy similar (Wulliman, et al, 1996). A continuación se muestra una imagen comparativa de las dimensiones y la ubicación de distintas estructuras del cerebro del pez cebra y el del humano, (Fig. 8).

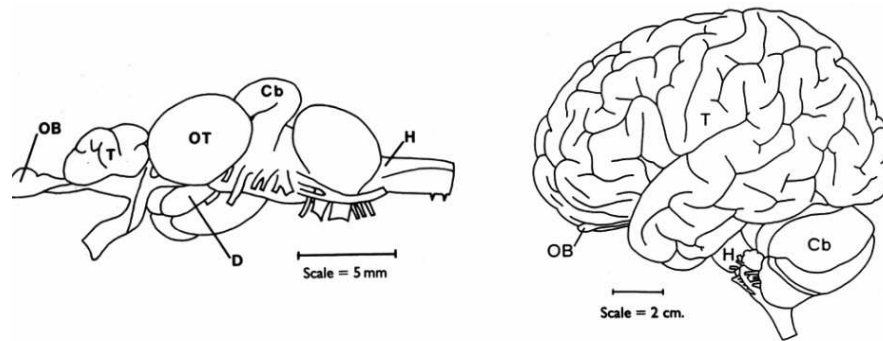
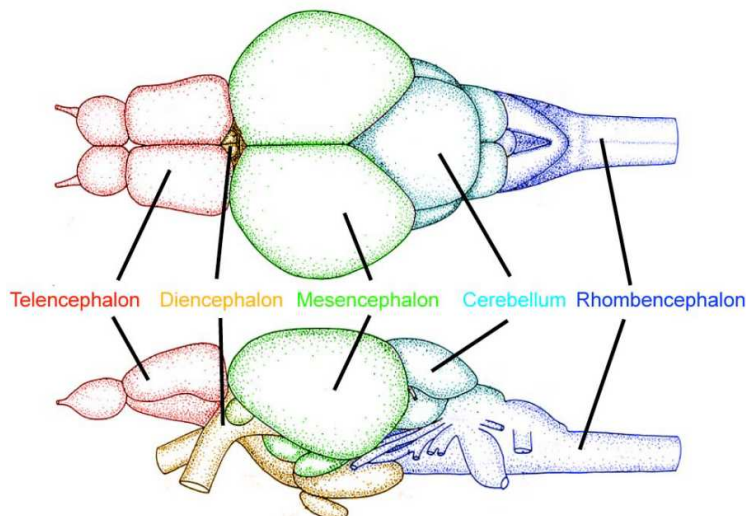


Figura 8. A la izquierda estructuras cerebrales del pez cebra adulto y a la derecha las del humano a escala, donde OB es bulbo olfatorio, T es telencéfalo, OT es Tectum óptico, Cb es cerebelo, D es diencefalo y H es hipotálamo (Butler y Hodos, 1996).

En las siguientes figuras se muestra la neuroanatomía del cerebro del pez cebra, cuyas estructuras han sido relacionadas con aquellas descritas en mamíferos, por ejemplo el telencéfalo (Fig. 9), dividido en área ventral y dorsal y cuya porción rostradorsal se ha caracterizado como análoga funcional del hipocampo en mamíferos (Kaslin, 2004). En estas imágenes también se señalan estructuras relevantes para este estudio, como el bulbo olfatorio y el tectum óptico.



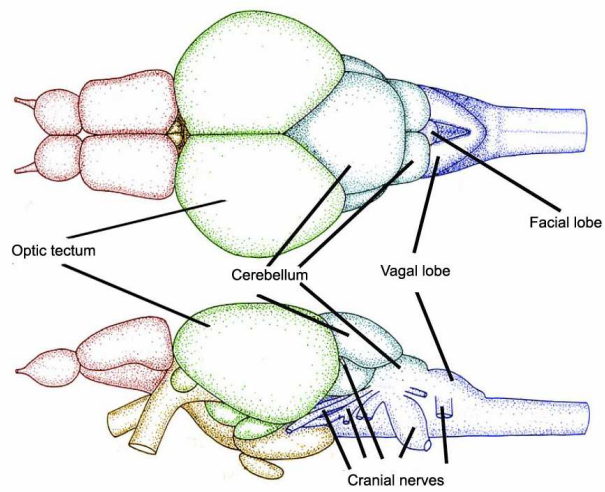
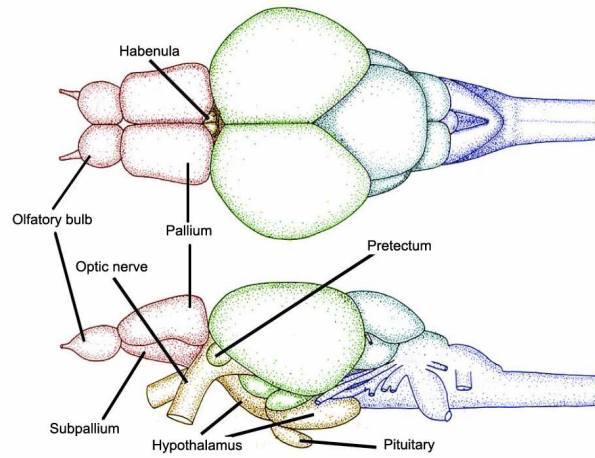


Figura 9. Estructuras cerebrales de pez cebra que posteriormente serán descritas en los resultados y el análisis (Wulliman, *et al.* 1996)

El hipocampo en humanos forma parte del sistema límbico y sus alteraciones han sido ampliamente caracterizadas en las investigaciones relacionadas con la epilepsia de lóbulo temporal (Fig. 10), (Brailowsky, 1999).

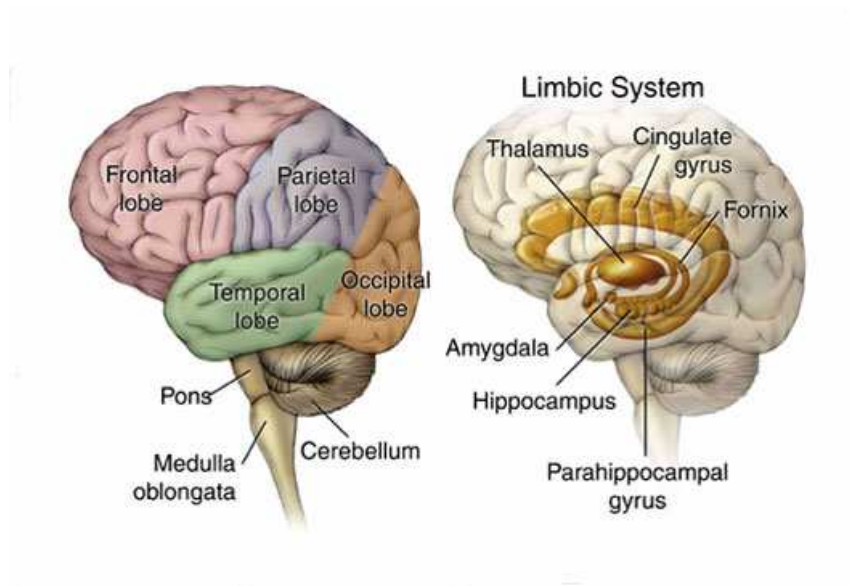


Figura 10. A la derecha la corteza cerebral dividida en zonas: frontal, parietal, temporal y occipital. A la izquierda el sistema límbico: fornix, gyrus cingulata, tálamo, amígdala, hipocampo y gyrus parahipocampal (Alzheimer's Disease Research, Julio, 2009).

2. Justificación

Las ratas y ratones se han utilizado ampliamente como modelos para estudiar la epilepsia, en particular la epilepsia del lóbulo temporal, empleando convulsionantes como el pentileno-tetrazol y ácido kaínico. Esto con el fin de desarrollar un modelo de epilepsia inducida para la búsqueda posterior de medicamentos que ayuden a contrarrestar la sintomatología de esta enfermedad en el humano. Sin embargo, el desarrollo de estos animales lleva tiempo y el número de individuos que se pueden emplear en los estudios es reducido debido a lo complicado del manejo y al elevado costo de mantenimiento. Por esta razón fue importante desarrollar un modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal más eficiente, tanto en el número de individuos como en el costo de mantenimiento. El pez cebra fue probado como potencial modelo de esta patología con el ácido kaínico siendo una ventaja la numerosa progenie obtenida de cada apareamiento y el corto tiempo de desarrollo, además del fácil mantenimiento y estudio.

Las investigaciones sobre epilepsia empleando al pez cebra como modelo fueron aportadas por investigadores del Departamento de Neurología de la Universidad de Cambridge (Berghmans et al, 2007) al investigar la acción de varias sustancias anticonvulsivas ya probadas en otros modelos animales. Las larvas de pez cebra fueron expuestas a distintas concentraciones de pentileno-tetrazol (PTZ), un pro-convulsivo cuya acción a nivel neuronal todavía no ha sido totalmente esclarecida. Los efectos de esta toxina fueron evaluados de distintas maneras; sin embargo, la relevancia de este estudio radica en la clasificación de los niveles de toxicidad expresados conductualmente por los organismos. Esta clasificación divide en tres los estados de actividad. El estado I consiste en el incremento del nado, el estado II en un patrón de nado denominado centrífuga (“whirlpool-like”) y el estado III en movimientos clónicos que conllevan a la pérdida de postura (Berghmans, *et al.* 2007). Este estudio, uno de tantos que emplea al pez cebra como modelo experimental, pareciera arrojar valiosos resultados tanto en el aspecto bioquímico como en el análisis a nivel conductual.

Una vez establecido el modelo experimental en larvas de pez cebra, éste se puede emplear para evaluaciones preliminares de medicamentos potenciales para el tratamiento de la epilepsia. De obtenerse buenos resultados en estos estudios se puede continuar la

investigación en organismos con un sistema nervioso más complejo. Hasta el día de hoy no se ha reportado ningún modelo de epilepsia en pez cebra que utilice como inductor al AK.

3. Hipótesis

La exposición al ácido kaínico del pez cebra en su estadio larval producirá muerte o daño neuronal en el telencéfalo dorsal o pallium dorsal, simulando el daño producido en el hipocampo característico de la epilepsia del lóbulo temporal (TLE). El daño en otras regiones del cerebro es también factible.

Se producirán cambios conductuales reconocibles en los patrones de nado, debido a la exposición a la toxina.

Después de un periodo de recuperación de uno o dos días se observará una mejoría en las habilidades motoras de las larvas expuestas a la toxina.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Desarrollar un modelo funcional y eficiente de epilepsia del lóbulo temporal inducido con el ácido kaínico en larvas de pez cebra, con la finalidad de que sea empleado en la búsqueda de medicamentos para tratar esta patología.

4.2 Objetivos particulares

- Detectar la sensibilidad a distintas concentraciones de AK en diferentes estadios larvarios del pez cebra que no requieran alimentación extra vitelina.
- Observar los patrones de nado de los peces control y de aquellos tratados con la toxina. Analizar posibles alteraciones en parámetros como distancia total recorrida, distancia total máxima, velocidad, ángulo de torción, serpenteo y tiempo transcurrido en cada zona del campo.
- Observar el daño neuronal causado con las diferentes concentraciones de AK e identificar las zonas del cerebro afectadas.

5. Metodología

5.1 Mantenimiento del pez cebra

Los ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) se mantuvieron en agua no clorada a 28 °C con ciclos de luz/oscuridad 14/10 h. El mantenimiento y la reproducción se realizaron de acuerdo con el protocolo de Westerfield (Westerfield, 2000). Los peces fueron alimentados dos veces al día con alimento seco y *Artemia nauplia* y la densidad poblacional de cada pecera fue estipulada de acuerdo al volumen del contenedor.

5.2 Empleo del modelo

Se seleccionan las parejas de peces para el apareamiento y a cada una se le traslada a una pecera especial durante la noche, a la mañana siguiente se colectan los huevos. Una vez colectados los huevos de las diferentes parejas éstos se mezclan para obtener una mayor variabilidad dentro del experimento. Los embriones se dejan crecer hasta que tienen 4 y 5 días de haber sido fertilizados (dpf: días post fertilization).

Las larvas son seleccionadas en 4 grupos de 60 individuos. De cada grupo se obtienen dos subgrupos de 30 ejemplares, además de un grupo control de 30 individuos.

Las variables dentro de cada grupo se muestran en el siguiente esquema. Las concentraciones de ácido kaínico empleadas fueron establecidas a partir de experimentos previos realizados en por el grupo del Dr. Pertti Panula.

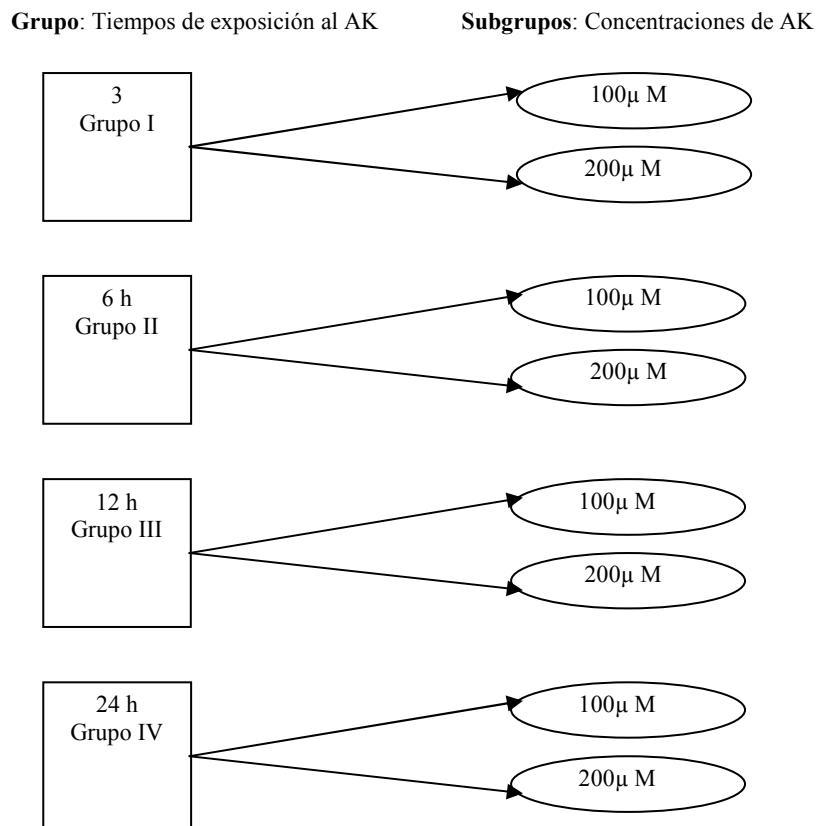


Figura 11. Grupos y subgrupos de los experimentos, además se tiene un grupo control de 30 individuos.

5.3 Tratamiento con ácido kaínico

Cada grupo fue establecido de acuerdo al tiempo de exposición al AK (3, 6, 12 y 14 h), para todos los experimento se proceso un grupo control en paralelo. Dentro de cada grupo se hicieron dos subgrupos, expuestos el mismo tiempo, pero a concentraciones diferentes de la toxina: 100 y 200 μM .

El AK se administró a los ejemplares en dos concentraciones (100 y 200 μM) adicionándolo al agua, a partir de una solución 10 mM (ácido kaínico, Sigma) (Fig. 11). El grupo control se mantuvo en un volumen total de agua igual al de los grupos expuestos a la toxina. Después del tratamiento las larvas fueron enjuagadas tres veces con agua sin cloro a 28 °C para retirar los residuos de la toxina.

Se hicieron varios experimentos modificando la fecha en la que se inició el tratamiento, a los 4 y 5 días pf como se establece en la siguiente tabla (Tabla 1).

	TIEMPO EN EL QUE SE ADMINISTRA EL TRATAMIENTO	PRIMER REGISTRO - 0 h DESPUÉS DE AK	SEGUNDO REGISTRO - 24 H DESPUÉS DE AK	TERCER REGISTRO - 48 H DESPUÉS DE AK
Primera fase	4 dpf	5 dpf	6 dpf	7 dpf
Segunda fase	5 dpf	6 dpf	7 dpf	

Tabla 1. Tiempos de administración de AK y registros

El primer registro de nado se realizó para todos los grupos inmediatamente después del tratamiento, tratando de sincronizar el término de la exposición a la toxina y la evaluación. Por ejemplo, el registro para el grupo expuesto durante 3 horas se realizó a las 10 am, para el grupo expuesto durante 6 horas a las 10:15 am, para el grupo expuesto durante 12 horas a las 10:30 am y para el grupo expuesto durante 12 horas a las 10:45 am. La metodología y los tiempos de evaluación fueron iguales para las evaluaciones consiguientes: 24 y 48 horas después de la exposición al AK.

Se seleccionaron estos tiempos de administración del ácido kaínico y de evaluación de nado ya que hasta el séptimo día no se alimenta a las larvas debido a que cuentan con reservas de vitelo. Al octavo día ya resulta imprescindible alimentar a los ejemplares, por lo que hay competencia entre ellos y entran en juego otras variables que no es posible controlar, las cuales pueden alterar los resultados de patrones de comportamiento.

5.4 Registro de nado

Con el empleo del sistema Noldus Ethovision System Pro 3.1 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands), que sigue y graba la trayectoria de nado del pez, se analizaron los siguientes parámetros durante un intervalo de 10 minutos (Kaslin, 2004):

- Distancia total: La distancia (cm) que el pez nada en 10 minutos.
- Angulo de torsión (grados): Mide los cambios de dirección en el movimiento.
- Serpenteo (grados/cm): La cantidad de giros con relación a la longitud de la trayectoria.

- Velocidad angular (grados/s): La velocidad del cambio de dirección del movimiento.
- Máxima distancia recorrida (cm).
- Tiempo transcurrido en cada zona del plato (a, b, c d y e).

Para que la trayectoria del pez sea registrada adecuadamente cada larva es puesta en uno de los 48 pozos de un plato, conteniendo sólo un ml de agua por pozo. Cada pozo ha sido previamente forrado en la parte interna con una capa de parafilm para evitar reflexiones de luz en la cámara durante las grabaciones. Este sistema computarizado no puede distinguir profundidad, sólo registra la trayectoria desde la parte superior, por lo que, para evitar variación, se mantiene el agua en cada pozo lo más somera posible sin que esto afecte al organismo (Kaslin, 2004).

En la primera parte de la investigación los campos no fueron divididos en zonas, posteriormente los campos fueron virtualmente divididos en 5 zonas con la intención de hacer más específicos los registros y encontrar alguna relación entre las zonas del campo ocupadas y el nivel de afectación de los organismos (Fig. 12).

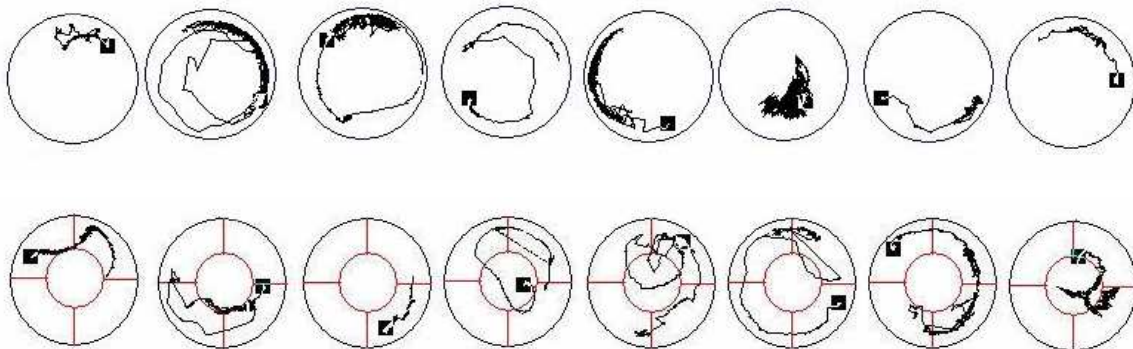


Figura 12. Arriba: Campos no divididos correspondientes a la primera fase de la investigación. Abajo: Campos divididos en 5 zonas correspondientes a la segunda fase de la investigación.

En la segunda fase de la investigación cada pozo fue dividido en dos grandes áreas: la región externa del pozo, es decir el perímetro externo, y la región interna o central. La región externa ha sido subdividida en 4 zonas de dimensiones idénticas (A, B, C y D) y la región central se mantiene simplemente con la denominación E (Fig. 13).

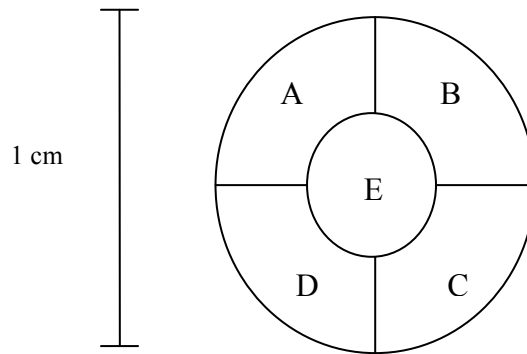


Figura 13. Imagen de un campo subdividido en las cinco zonas (A, B, C, D y E). El diámetro del pozo fue de 1 cm, mientras que el diámetro del círculo interno correspondiente a la región central fue de 0.5 cm.

Los tiempos en que se realizaron los registros de nado han sido incluidos en la Tabla 2.

Los resultados se analizaron con una prueba de t de Student para observar si había cambios significativos con respecto al control. El error estándar se calculó con los siguientes valores de p: $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

5.5 Tinciones

Se realizaron dos tinciones: TUNEL y naranja de acridina. Ambas tinciones se hicieron de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante con modificaciones mínimas. Para realizar estas técnicas se extraen los cerebros de las larvas, bajo condiciones de hipotermia.

Una vez retirado el cerebro se almacena en una solución al 2% de paraformaldehído en PBS para posteriormente realizar la tinción de TUNEL, la tinción de Naranja de Acridina se realizó inmediatamente después de la extracción de los cerebros. Para la observación se genera una cámara en la que el cerebro se encuentra móvil en una solución de glicerol.

Los cerebros se observan bajo el microscopio y se fotografían. Se almacenan a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5a TUNEL

La tinción TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) se emplea para detectar y cuantificar fragmentación del ADN. El proceso consiste en marcar el ADN fragmentado que es señal de daño celular, en particular, apoptosis. La tinción fue realizada directamente en los cerebros de los peces obtenidos justo después del tratamiento con el ácido kaínico. Se llevo a cabo de acuerdo al protocolo

proporcionado por el fabricante (*In situ* Cell Death Detection Kit, POD, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con cambios menores. Controles positivos y negativos fueron incluidos y procesados en paralelo a las muestras; no se detectó ninguna tinción en los controles negativos, mientras que los controles positivos expuestos a una DNasa presentaron tinción intensa del núcleo.

5.5b Naranja de Acridina

La tinción de naranja de acridina (Sigma) es un tinte fluorescente selectivo para ácidos nucleicos, interactúa con DNA y RNA intercalándose o por uniones electrostáticas.

Distingue entre células quiescentes, en proliferación, en G1 y para detección de apoptosis.

6. Resultados

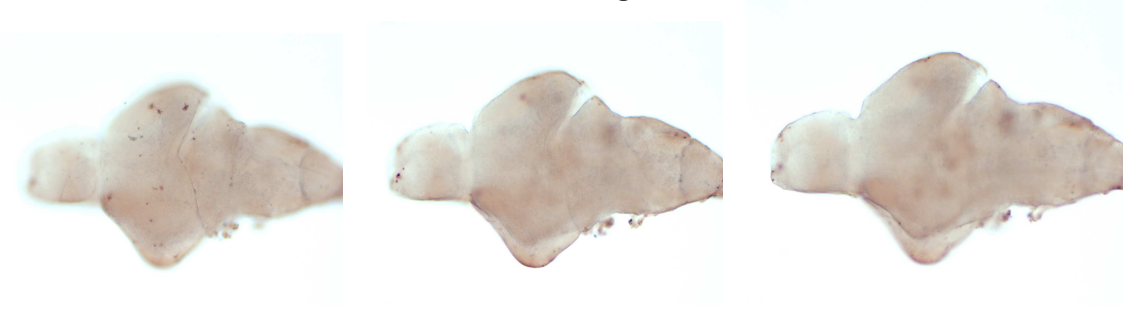
6.1 Tinción TUNEL

Los cerebros de larvas de 5 dpf fueron teñidos y montados después del tratamiento con el ácido kaínico, sin tiempo de recuperación. El montaje se realizó de acuerdo a la metodología planteada anteriormente.

Se presentan tres imágenes por cada uno de los cuatro cerebros. Los primeros dos cerebros corresponden a los controles. El control negativo es el cerebro de una larva de pez cebra que no fue sometida al tratamiento de ácido kaínico. En el control positivo se presentan las imágenes de un cerebro al cual se le indujo fragmentación de DNA con DNAsas.

Posteriormente se muestra el tratamiento I correspondiente a 3 horas de exposición a 200 μ M de AK, y el tratamiento II correspondiente a 20 horas de exposición a 200 μ M de AK.

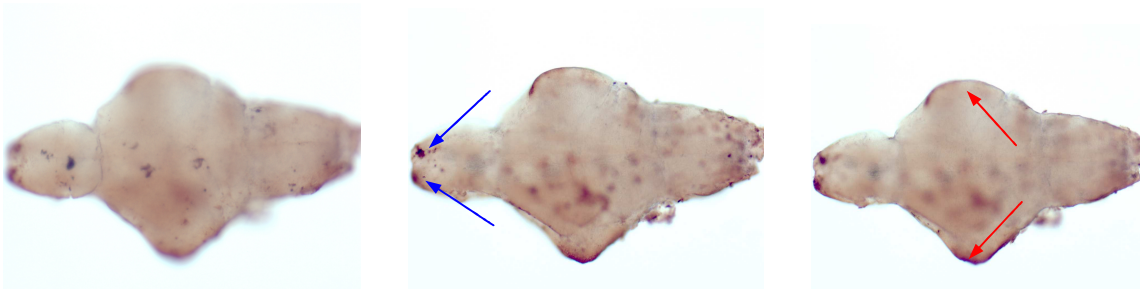
Control negativo



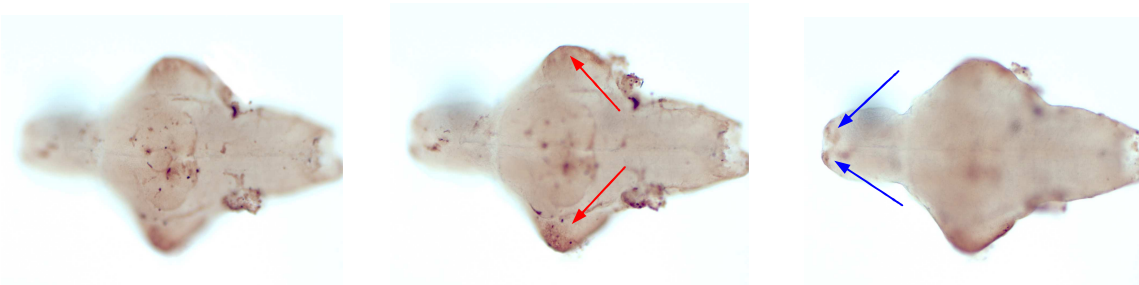
Control positivo



Tratamiento I - 200 μ M 3 horas



Tratamiento II - 200 μ M 20 horas



En las imágenes de los dos tratamientos se puede observar daño en las áreas que corresponden al tectum óptico, señalado con las flechas rojas y en el bulbo olfatorio,

señalado con flechas azules. El daño en el tectum óptico es más evidente en el tratamiento II, mientras que el daño en el bulbo olfatorio es más evidente en el tratamiento I.

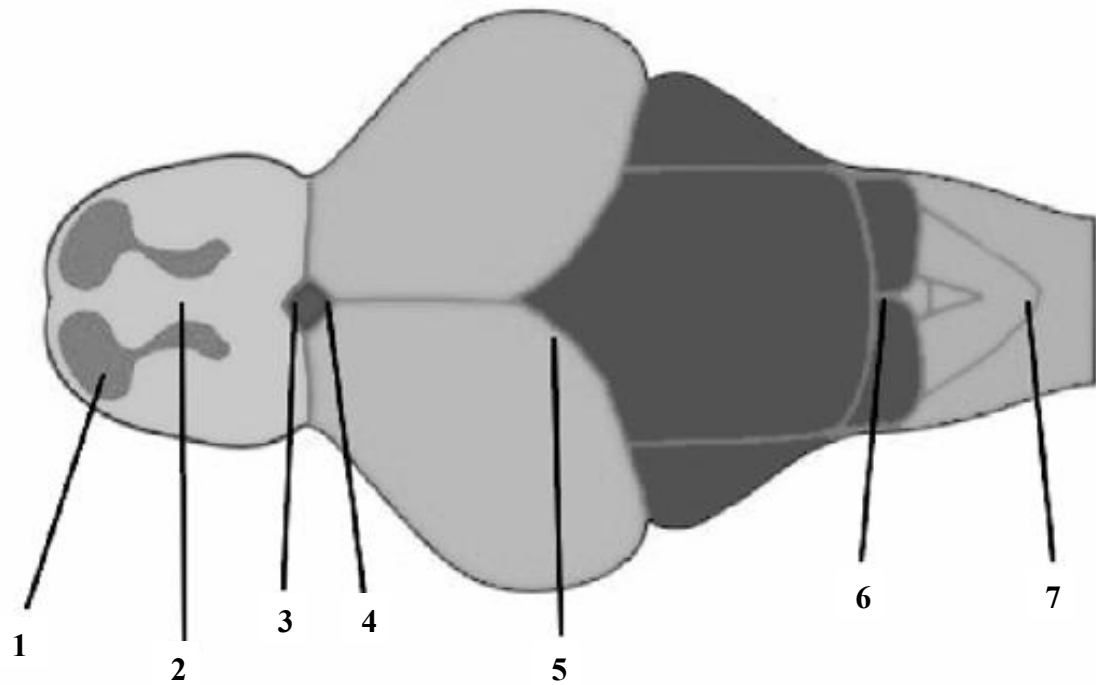
En los cerebros presentados se observan puntos de coloración oscura en la superficie. Éstos son fragmentos de epitelio que permanecieron adheridos al cerebro después de la extracción. Esto es fácilmente identificable observando las imágenes a una mayor escala.

6.2 Tinción con naranja de acridina

Los cerebros fueron obtenidos de larvas de 5 dpf, fueron teñidos y montados después del tratamiento con ácido kaínico, sin tiempo de recuperación, según los protocolos citados en la metodología.

Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal. Se registraron aproximadamente 100 imágenes por cerebro, de la parte ventral a la dorsal. Las aquí mostradas fueron seleccionadas por su claridad para representar las zonas del cerebro implicadas en el estudio.

En los primeros dos esquemas se señalan las distintas zonas examinadas en el estudio (Fig.14 y 15). Para cada tratamiento se muestra una imagen dorsal y otra ventral, posteriormente se muestran 2 imágenes dorsales intermedias y dos ventrales intermedias: el tratamiento I corresponde a 12 horas de exposición a 100 μ M de AK, el tratamiento II corresponde a 24 horas de exposición a 100 μ M de AK y el tratamiento III corresponde a 24 horas de exposición a 200 μ M de AK.



1. Bulbo olfatorio
2. Telencéfalo dorsal
3. Diencéfalo
4. Pre-tectum
5. Tectum óptico
6. Limite del cerebelo medio
7. Lóbulo caudal
(médula oblonga)

Figura 14. Imagen dorsal de las estructuras cerebrales que se examinaron para identificar procesos apoptóticos después de la exposición al ácido kaínico.

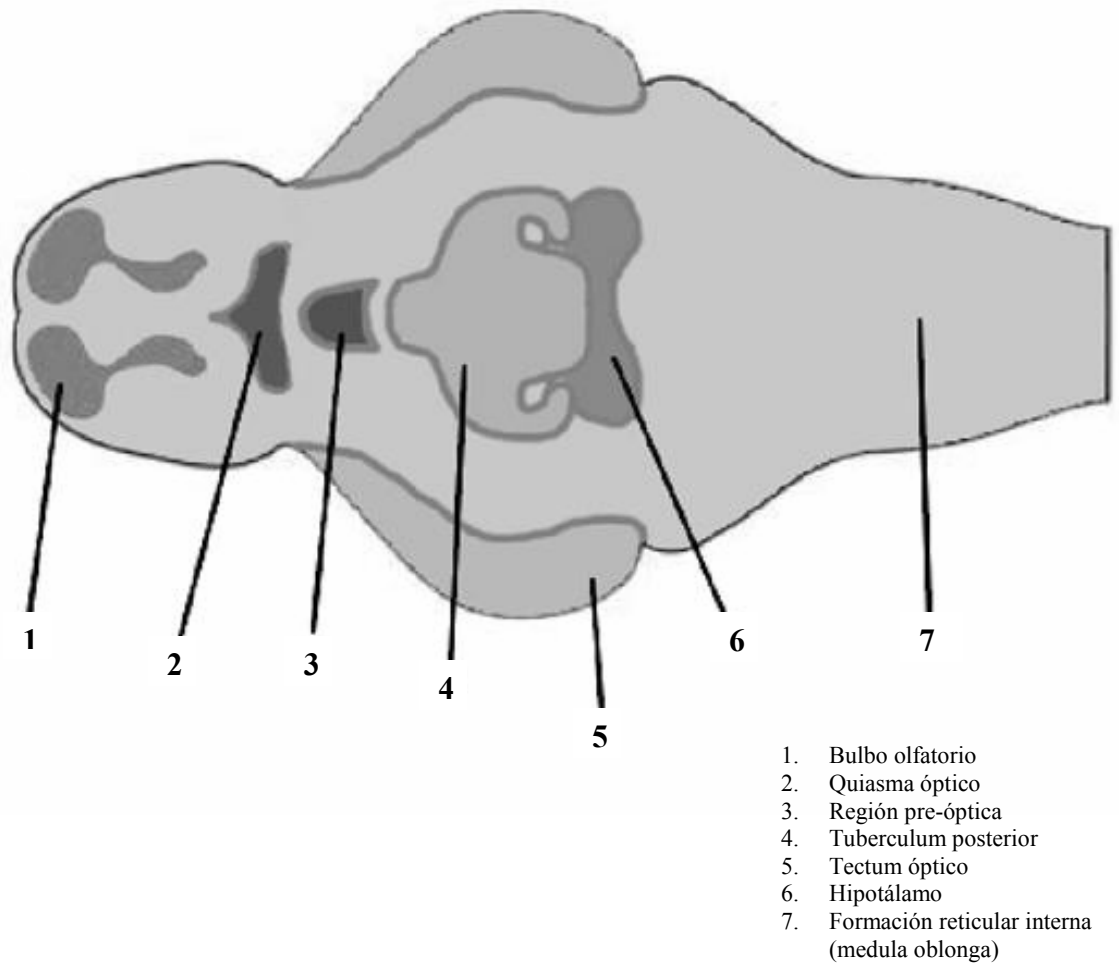
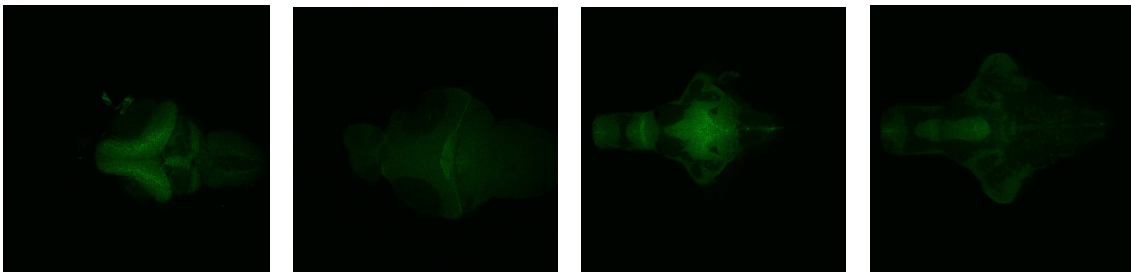
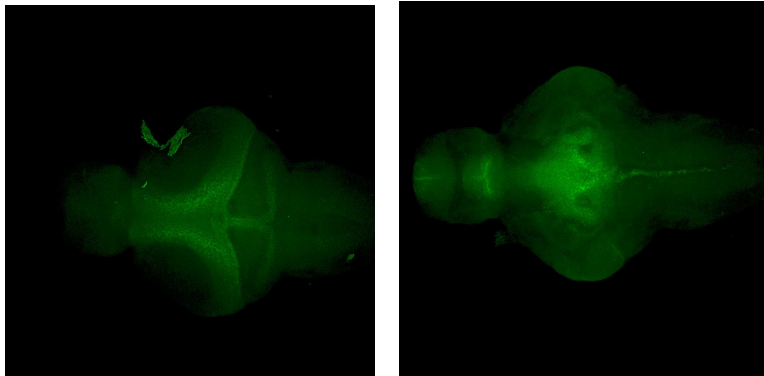
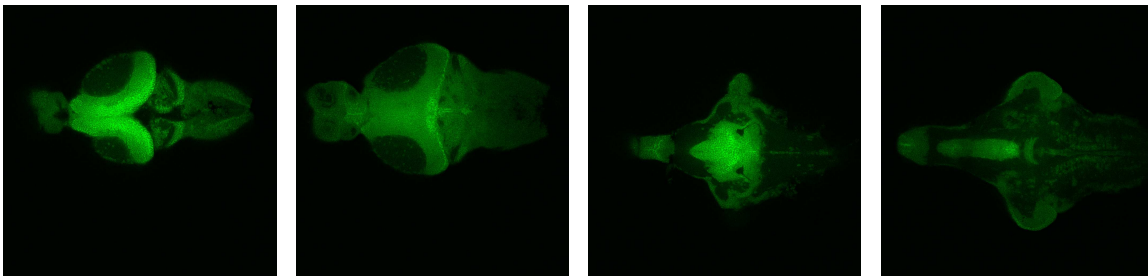
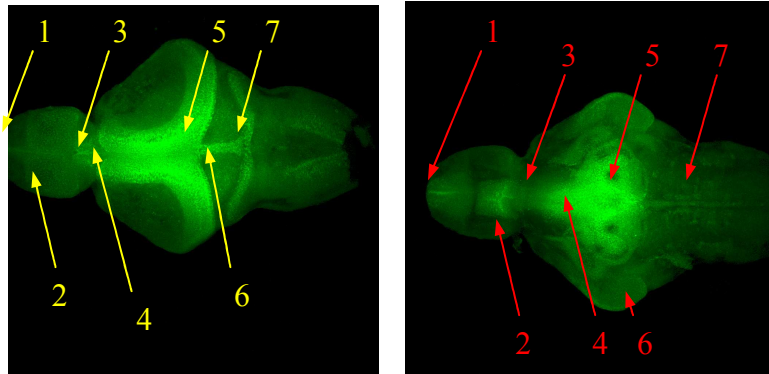


Figura 15. Imagen ventral de las estructuras cerebrales que se examinaron para identificar procesos apoptóticos después de la exposición al ácido kaínico.

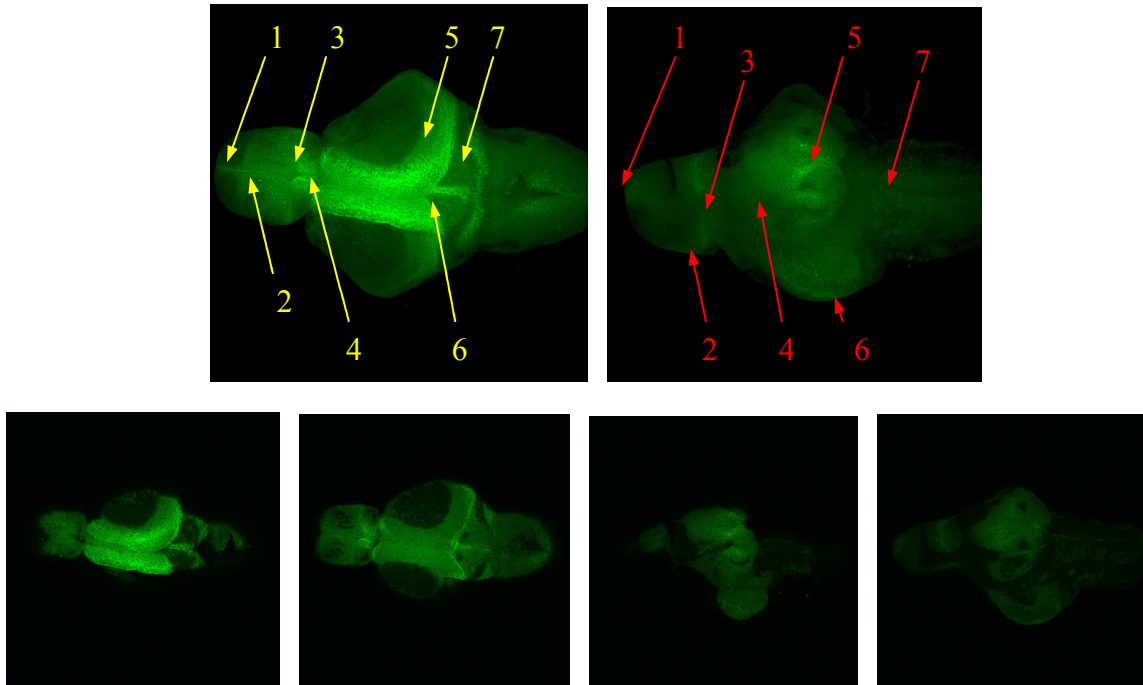
Control: dorsal y ventral



Tratamiento I - 12 horas 100µM: dorsal y ventral



Tratamiento II - 24 horas 100µM: dorsal y ventral



Tratamiento III - 24 horas 200 µM: dorsal y ventral

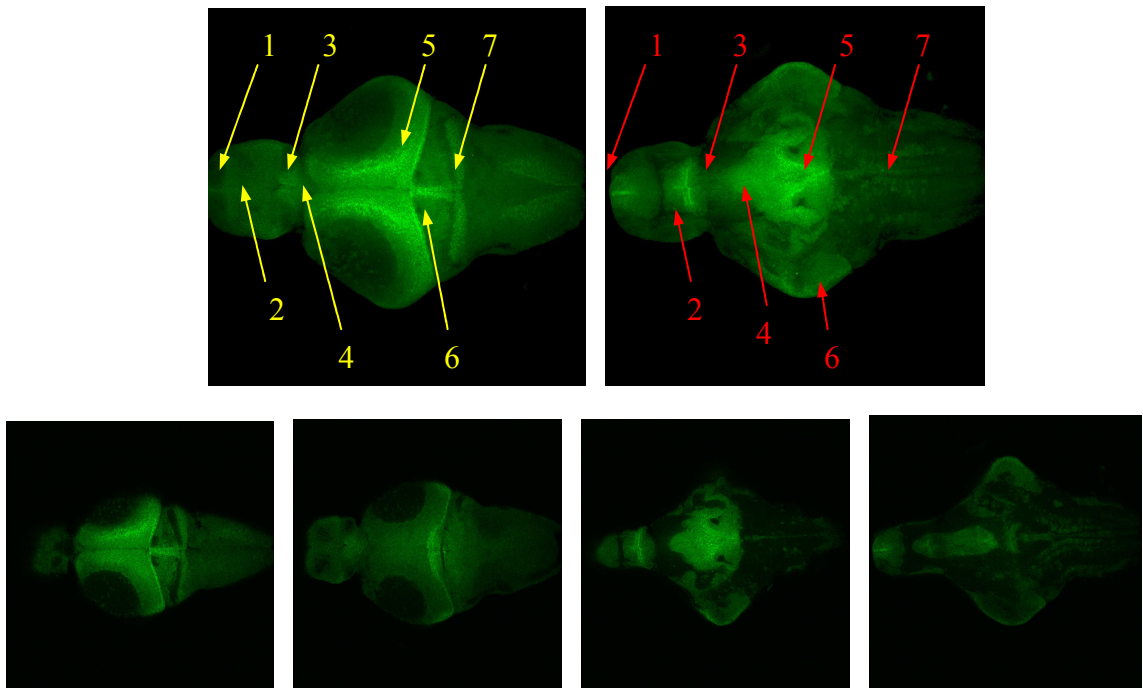


Figura 16. Tinción con naraja de acridina. Las flechas amarillas señalan estructuras dorsales marcadas en Fig. 14 con la misma numeración, las flechas rojas señalan estructuras ventrales señaladas en la Fig. 15.

A partir de la comparación con el cerebro control, es posible identificar claramente daño en diversas estructuras en todas las condiciones de exposición al AK. Los cerebros de larvas de pez cebra fueron analizados después de la exposición a distintas concentraciones de ácido kaínico (100 y 200 μM) y a distintos intervalos de tiempo (3, 6, 12 y 24 horas).

En las imágenes dorsales la fluorescencia es claramente abundante en la zona que corresponde al bulbo olfatorio, telencéfalo dorsal, pretectum, cerebelo y el lóbulo caudal.

En las imágenes ventrales es posible identificar daño en el bulbo olfatorio, en el telencéfalo, en la región pre-óptica, en el hipotálamo y en el tectum óptico.

En todas las condiciones se observa el daño celular pero con mayor grado de afectación en el tratamiento I correspondiente a 12 horas de exposición; no se observen diferencias significativas entre el tratamiento II y III, los cuales fueron expuestos el mismo tiempo, 24 horas, pero a las dos diferentes concentraciones.

El bulbo olfatorio fue afectado incluso en las concentraciones bajas de ácido kaínico.

6.3 Registros de patrones de nado

La tecnología empleada para este tipo de registros, Noldus Ethovision System Pro 3.1, fue originalmente diseñada para seguir la trayectoria de ratas y ratones. El uso de este sistema fue empleado con el pez cebra, pero ha necesitado de ciertos ajustes. Uno de ellos es que, al seguir la trayectoria del organismo en un medio acuoso y en un plato de material reflejante (plástico), se producen reflexiones de la luz emitida por el mismo sistema. Estas emisiones son registradas por la cámara a manera de líneas rectas. A pesar de intentar diferentes técnicas para eliminar este ruido experimental, como forrar cada pozo con una capa de parafilm, se logró sólo disminuirlo pero no eliminarlo. Por ello las imágenes que a continuación se muestran han sido editadas para eliminar estas reflexiones lo más posible; sin embargo, en algunos casos es imposible hacerlo por completo y por lo tanto se excluyeron algunos de los registros.

Se podrá observar que hay campos vacíos; esto quiere decir que el registro tuvo que ser eliminado por reflexiones excesivas o porque no había suficientes larvas. Al introducir a cada uno de los ejemplares a los platos de 48 pozos para realizar la evaluación se seleccionaron aquellos con movilidad y se descartaron los que estaban totalmente inmóviles. Estos especímenes pudieron, sin embargo, ser utilizados en la segunda o tercera evaluación, en caso de que se hubieran recuperado.

Sobre los registros de las trayectorias se identifican cambios en los patrones de nado que se marcan de la siguiente manera: los círculos azules señalan patrones de nado cortos y bizarros. Los círculos rojos señalan patrones de nado extensos pero que no corresponden al típico patrón de nado en círculos o patrón de huida, que es el más comúnmente observado. Algunas trayectorias no señaladas que parecerían ejemplos claros de patrones bizarros o anormales, son en realidad reflexiones. Esto se identifica claramente por las líneas rectas.

6.3a Fase I: Registros en larvas de 5, 6 y 7 dpf

A continuación se presentan los resultados de uno de los primeros experimentos. Se muestran 3 hojas de registros finales de nado correspondientes a 0, 24 y 48 horas después del tratamiento con ácido kaínico. En todos los casos el tratamiento se inició a los 4 dpf.

Análisis de los patrones de nado - 0 horas de recuperación

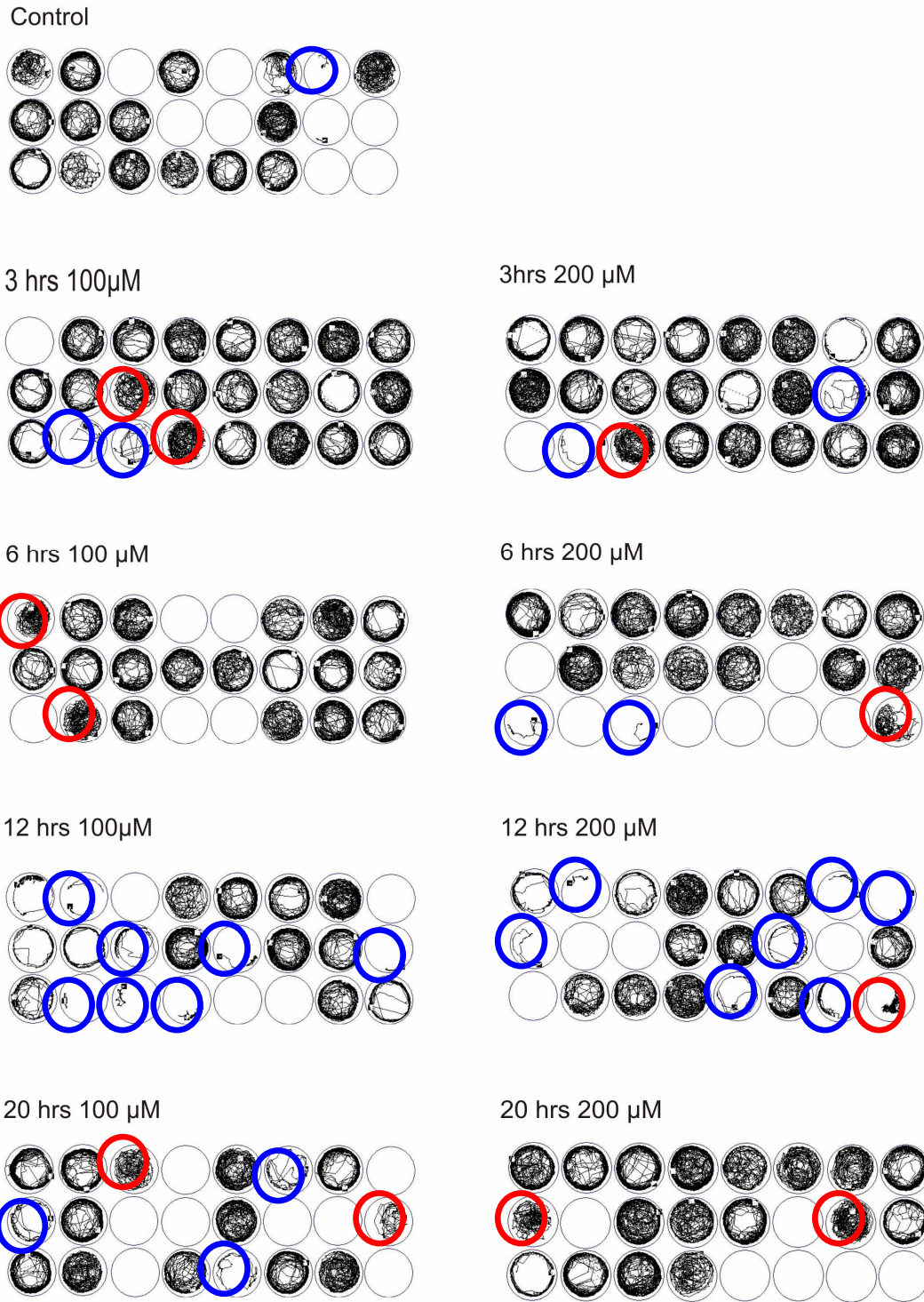


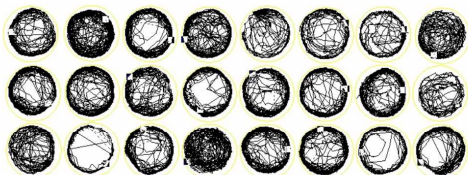
Figura 17. Imagen de un experimento representativo de la evaluación de los patrones de nado realizada 0 h después del tratamiento con AK en larvas de 5dpf.

En la figura 17 se muestra un registro de nado errático en el grupo control; esto posiblemente esté relacionado con alteraciones en el proceso de desarrollo del embrión y/o la larva.

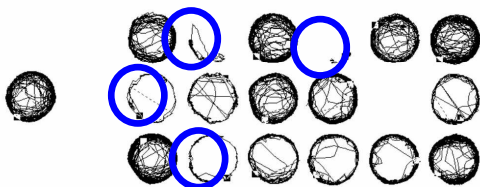
En los grupos de 3 y 6 horas de tratamiento se observaron solamente de 5 a 7 registros de nado errático; este número incrementó notablemente al aumentar el tiempo de exposición a 12 horas, observándose 16 arenas con el patrón de nado errático. En la condición de 20 horas de tratamiento con el AK se observaron 7 patrones de nado errático y un gran número de campos vacíos, indicando un grado de toxicidad elevado.

Análisis de los patrones de nado - 24 horas de recuperación

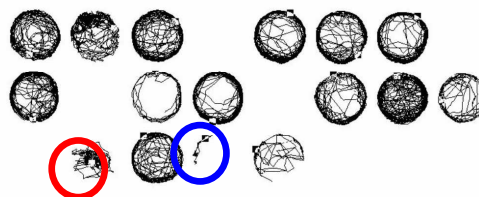
Control



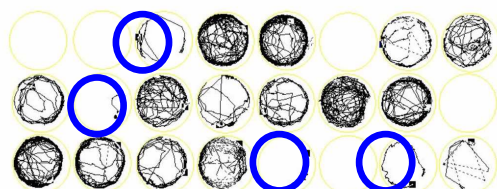
3 hrs 100µM



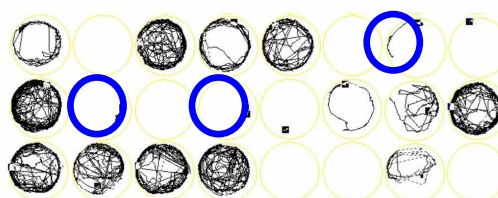
3hrs 200 µM



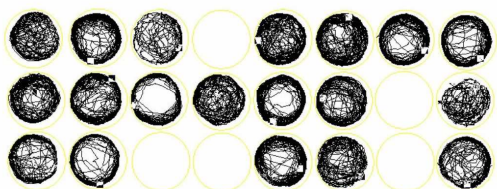
6 hrs 100 µM



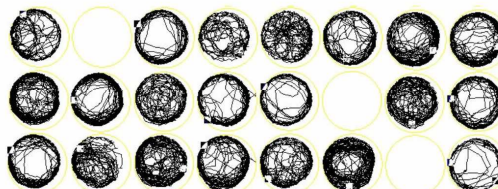
6 hrs 200 µM



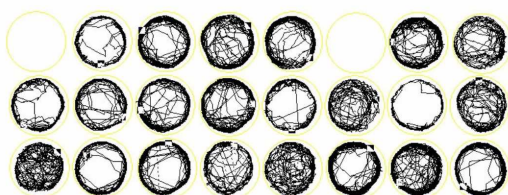
12 hrs 100µM



12 hrs 200 µM



20 hrs 100 µM



20 hrs 200 µM

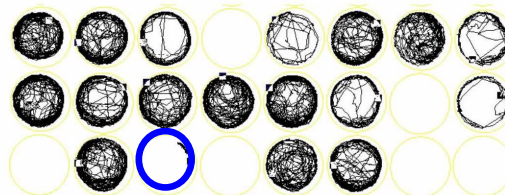


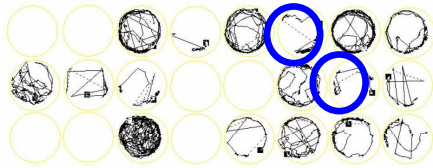
Figura 18. Imagen de un experimento representativo de la evaluación de los patrones de nado realizada 24 h después del tratamiento con AK en larvas de 6 dpf.

En los grupos de 3 y 6 horas de tratamiento se detectaron de 6 a 7 registros de nado errático. En el grupo expuesto durante 12 horas no se observó ninguno y en el grupo expuesto durante 24 horas al AK se observó solamente uno.

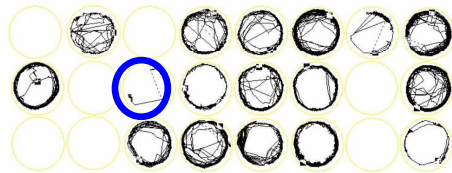
Se observaron 14 y 13 registros ausentes en los grupos de 3 y 6 horas de exposición y 8 en los grupos correspondientes a 12 y 20 horas. Estos resultados sugieren un alto grado de toxicidad en estas condiciones.

Análisis de los patrones de nado – 48 horas de recuperación

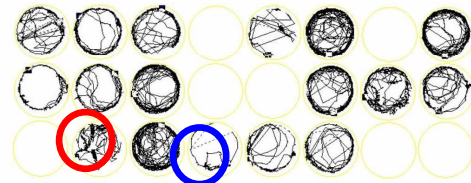
Control



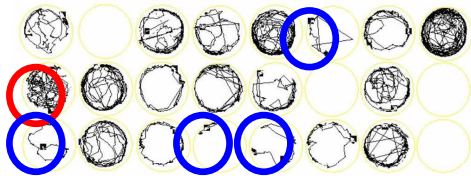
3 hrs 100µM



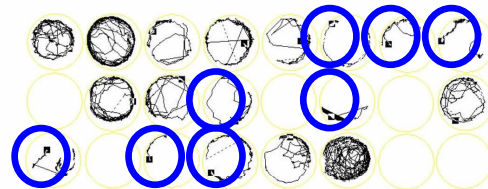
3hrs 200 µM



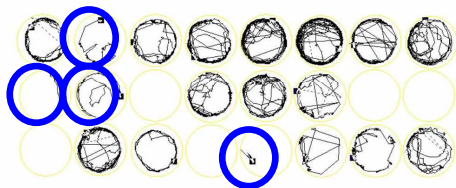
6 hrs 100 µM



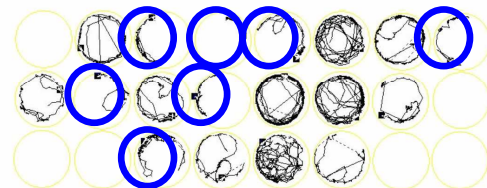
6 hrs 200 µM



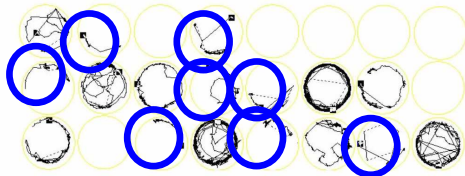
12 hrs 100µM



12 hrs 200 µM



20 hrs 100 µM



20 hrs 200 µM

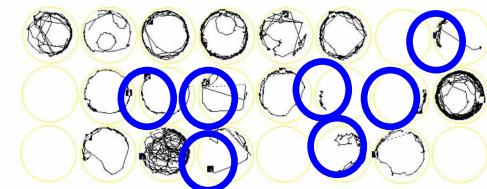


Figura 19. Imagen de un experimento representativo de la evaluación de los patrones de nado realizada 48 h después del tratamiento con AK en larvas de 7 dpf.

En el grupo control se observaron 2 patrones de nado errático, esto posiblemente esté relacionado con que las reservas de vitelo ya no fueron suficientes.

En el grupo de 3 horas de exposición al AK se observaron 3 patrones de nado errático, en el grupo de 6 horas se detectaron 13, en el grupo de 12 horas 10 y en el de 20 horas se encontraron 15 nados erráticos.

El número de campos vacíos en la hoja de registros correspondiente a 48 horas de recuperación incrementó notablemente en comparación con los tiempo de 0 y 24 horas.

6.3b Fase I: Análisis de los patrones de nado

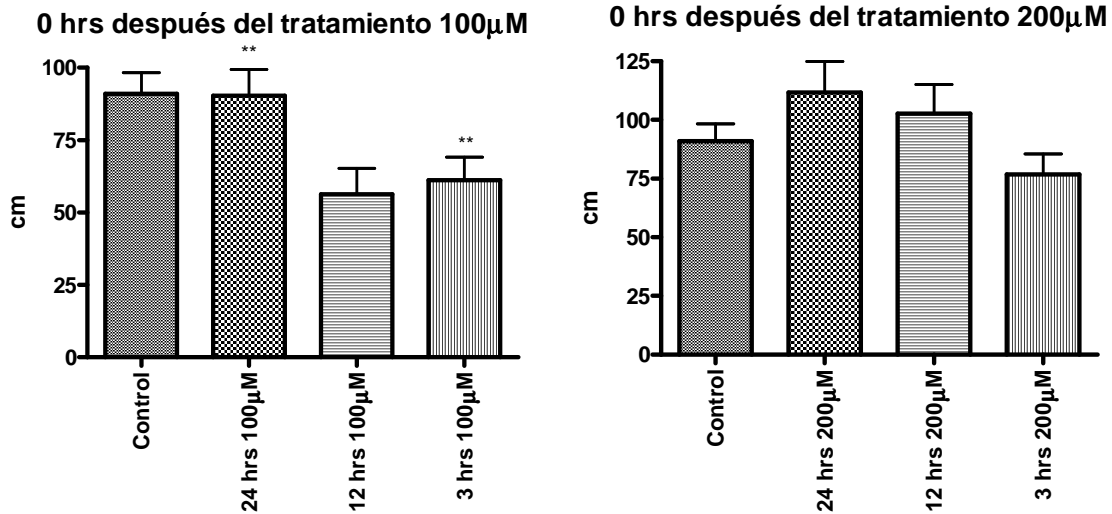
A continuación se muestran las gráficas del análisis de los patrones de nado evaluando los siguientes parámetros: distancia total, máxima distancia recorrida, ángulo de torsión, serpenteo y velocidad angular.

La evaluación fue realizada con una prueba de t de Student para observar si había cambios significativos con respecto al control. El error estándar se calculó con los siguientes valores de p: $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

Los resultados correspondientes al análisis de distancia total recorrida se presentan en cuatro gráficas. Las primeras dos gráficas (Fig. 20 A) corresponden a la evaluación realizada inmediatamente después del tratamiento con el AK. Las siguientes dos gráficas (Fig. 20 B) corresponden a la evaluación realizada después de 24 horas de recuperación.

Distancia total recorrida 4-5 dpf

A



B

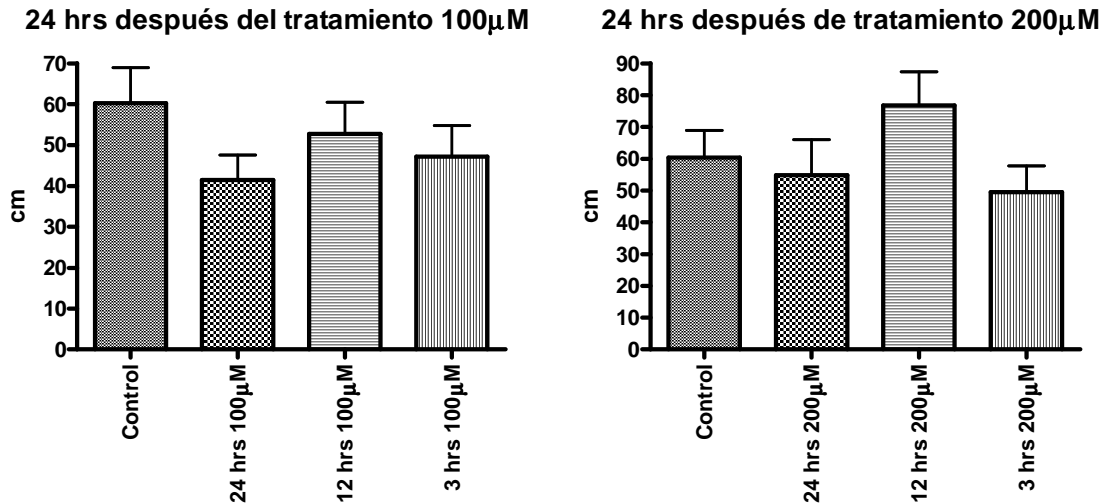


Figura 20. Análisis de la distancia total recorrida de los individuos de 4-5 dpf expuestos durante 3, 12 y 24 horas a AK 100 y 200 µM, evaluados inmediatamente después del tratamiento (A) y 24 horas después (B).

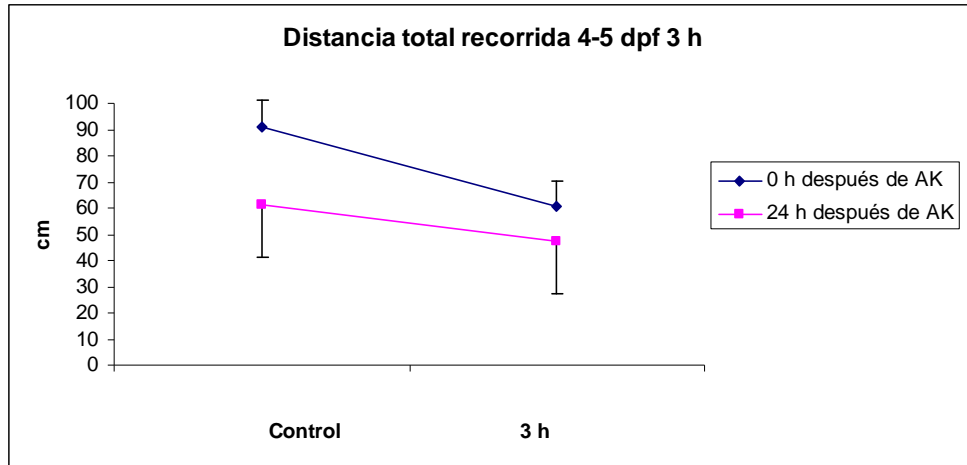
Las barras representan el promedio de 6 experimentos. Los datos se expresan como la media +/- el error estándar significativamente distintos del control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (prueba t de Student).

En la figura 20 A se muestran los resultados de la distancia recorrida, expresada en cm, en las condiciones experimentales indicadas. Se observó una diferencia significativa con

valores inferiores con respecto al control únicamente en los grupos evaluados inmediatamente después del tratamiento (A) y en los ejemplares tratados con el AK a una concentración de 100 μ M durante 3 y 12 horas. No se observaron cambios significativos 24 horas después (Fig. 20 B).

En la figura 21 se muestran dos gráficas comparando los resultados de las condiciones en las que se observaron diferencias significativas con respecto al control; es decir, 3 horas (Fig. 21 C) y 12 horas de exposición al AK (Fig. 21 D).

C



D

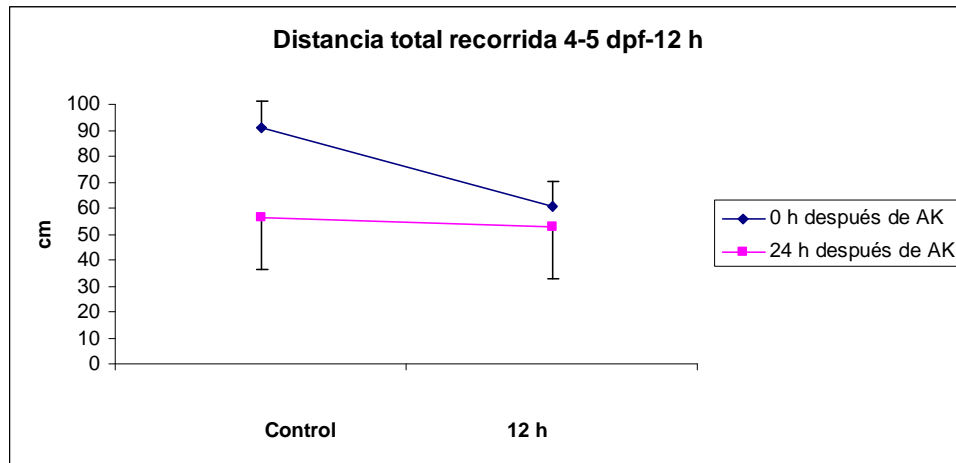


Figura 21. Análisis comparativo con respecto al control de la distancia total recorrida en larvas de 4-5 dpf en los tiempos de exposición de 3 horas (C) y 12 horas (D).

En estas dos gráficas se puede observar más claramente la disminución de la distancia total recorrida en los grupos tratados con AK durante 3 y 12 horas. En la evaluación realizada inmediatamente después de la exposición a la toxina (línea rosa) se observa una reducción más significativamente mayor con respecto al control que en los mismos grupos evaluados después de 24 horas de recuperación (línea azul).

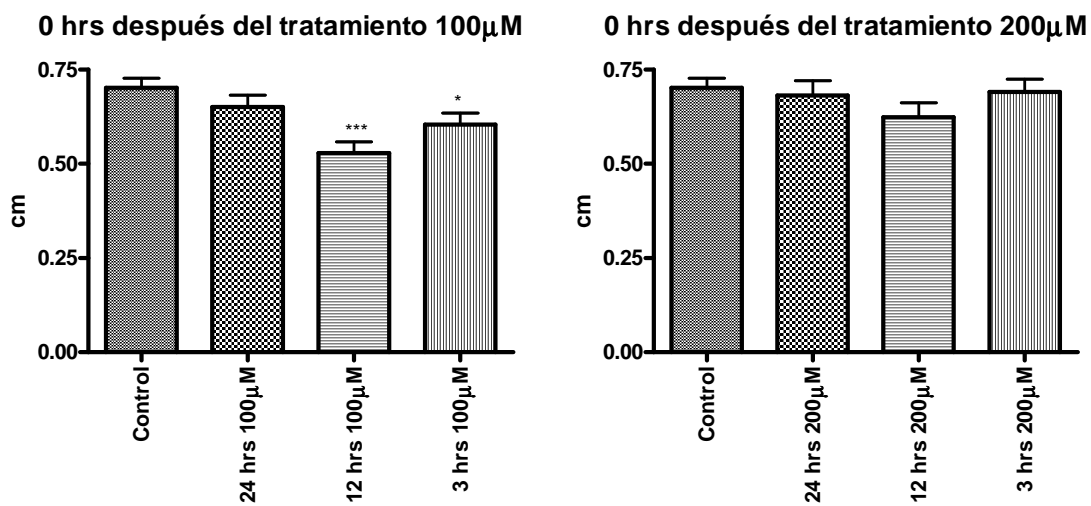
Los valores de distancia recorrida en los grupos control son menores en las larvas evaluadas después de 24 horas de recuperación que en aquellas examinadas inmediatamente después del tratamiento. Esta diferencia podría estar relacionada con la reducción de las reservas de

vitelo en las larvas, ya que el grupo examinado 24 horas después del tratamiento tiene un día más de desarrollo.

Los resultados correspondientes al análisis de máxima distancia recorrida se presentan en cuatro gráficas. Las primeras dos gráficas (Fig. 22 A) corresponden a la evaluación realizada inmediatamente después del tratamiento con el AK y las siguientes dos gráficas (Fig. 22 B) corresponden a la evaluación realizada después de 24 horas de recuperación.

Máxima distancia recorrida 4-5 dpf

A



B

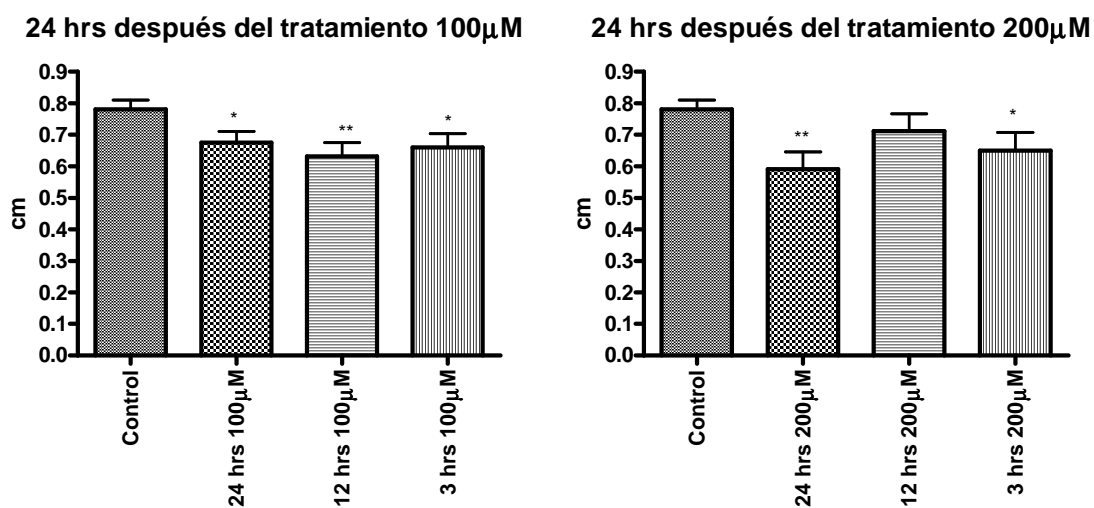


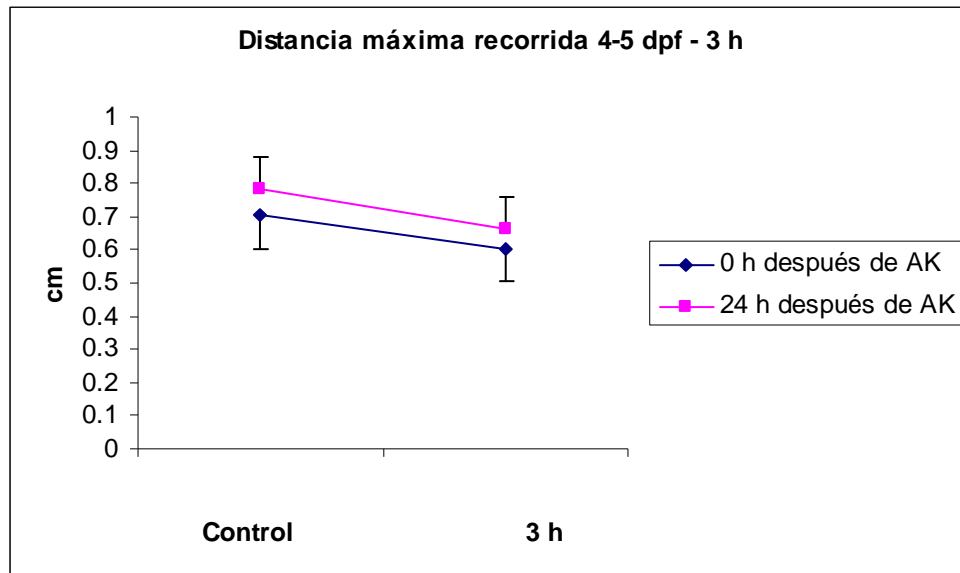
Figura 22. Análisis de la máxima distancia recorrida en larvas de 4-5 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 18.

En los grupos evaluados sin tiempo de recuperación (Fig. 22 A) se encontraron diferencias significativas en los grupos expuestos durante 3 y 12 horas a 100 μM de AK. Ambos presentaron valores inferiores con respecto al control.

Después de 24 horas de recuperación (Fig. 22 B) se observaron cambios significativos en el grupo expuesto durante 24 horas a 100 y 200 μ M de AK, en el grupo expuesto durante 12 horas a 100 μ M y en los grupos expuestos durante 3 horas en ambas concentraciones, todos con valores inferiores con respecto al control.

En la figura 23 se muestran dos gráficas comparando los resultados de las condiciones en las que se observaron diferencias significativas con respecto al control en la distancia máxima recorrida, es decir, 3 horas (Fig. 23 C) y 12 horas de exposición al AK (Fig. 23 D).

C



D

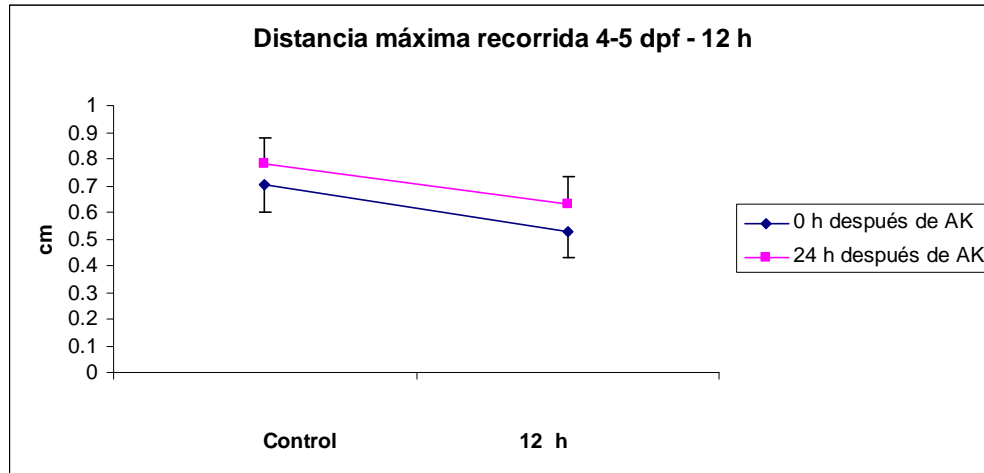


Figura 23. Análisis comparativo con respecto al control de la distancia máxima recorrida en larvas de 4-5 dpf en los tiempos de exposición de 3 horas (C) y 12 horas (D).

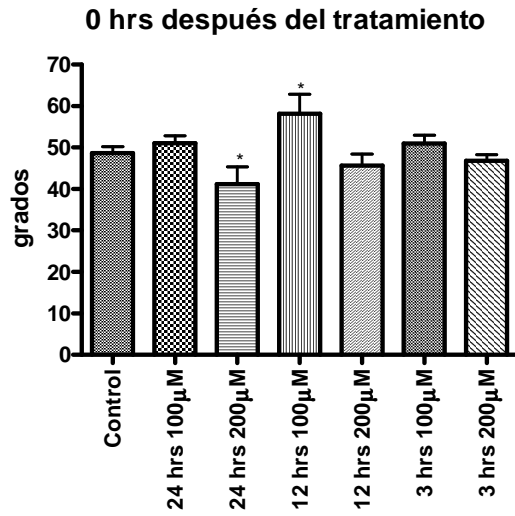
Estas gráficas muestran que en los grupos expuestos al AK durante 3 y 12 horas, la distancia máxima recorrida fue inferior con respecto al grupo control, tanto en la evaluación realizada con 0 horas de recuperación como después de 24 horas de recuperación.

Las figuras 24-26 muestran el resultado del análisis de los parámetros de ángulo de torsión, serpenteo y velocidad angular. En las figuras 24-26 A se muestran los resultados

correspondientes a 0 horas de recuperación y en las figuras 24-26 B los resultados de los mismos grupos después de 24 horas de recuperación.

Ángulo de torsión 4-5 dpf

A



B

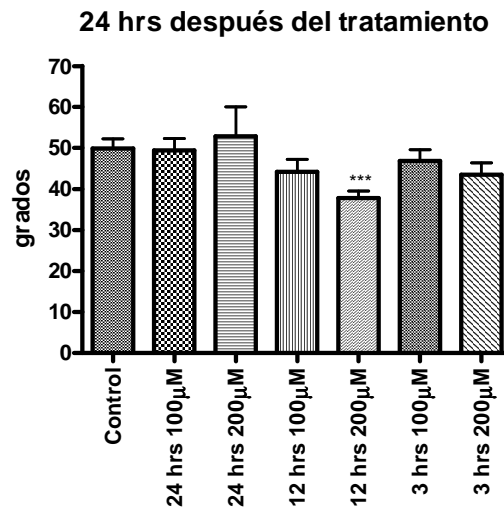
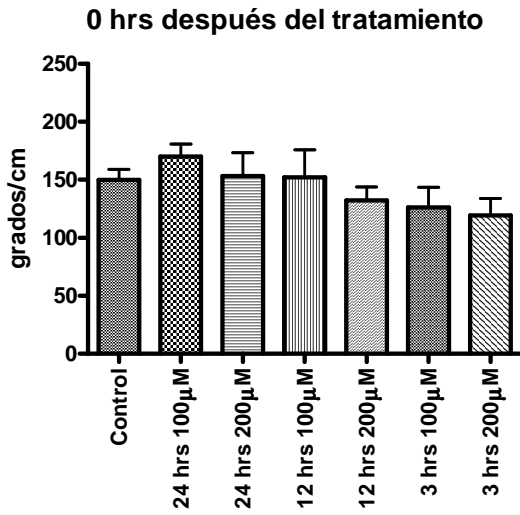


Figura 24. Análisis del ángulo de torsión en larvas de 4-5 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 19.

Serpenteo 4-5 dpf

A



B

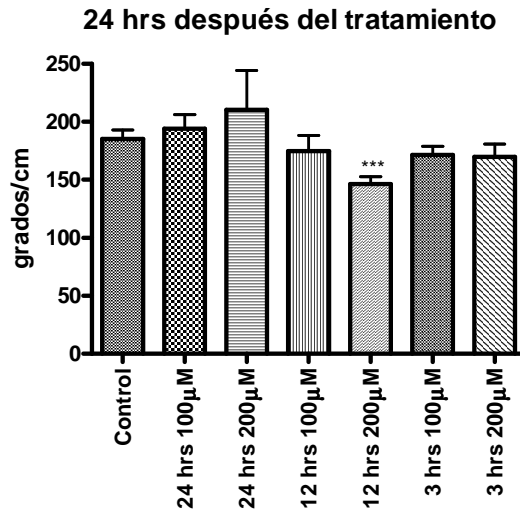
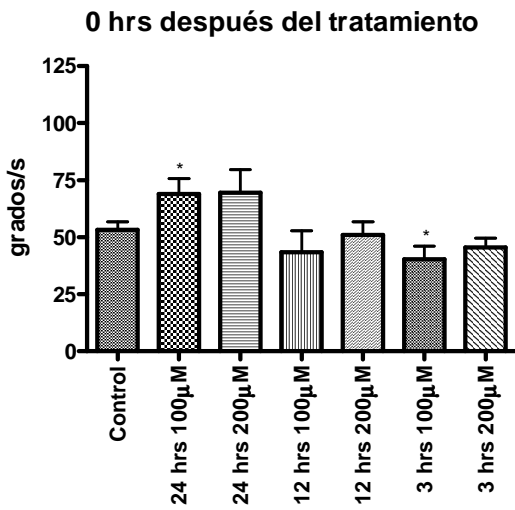


Figura 25. Análisis del serpenteo en larvas de 4-5 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 19.

Velocidad angular 4-5 dpf

A



B

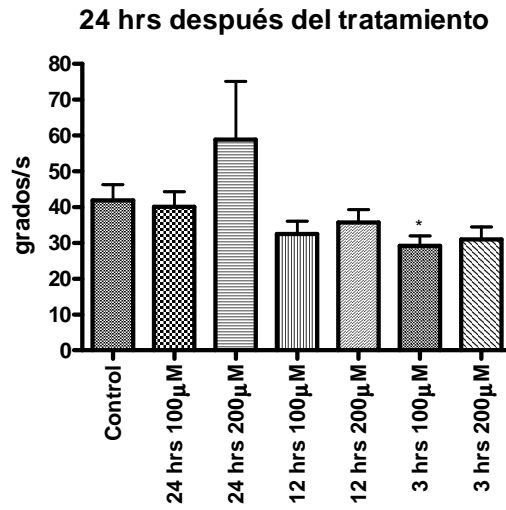


Figura 26. Análisis de la velocidad angular en larvas de 4-5 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 19.

En los parámetros de ángulo de torsión, serpenteo y velocidad angular (Fig. 24-26) se observaron algunas diferencias significativas en las distintas condiciones empleadas sin que

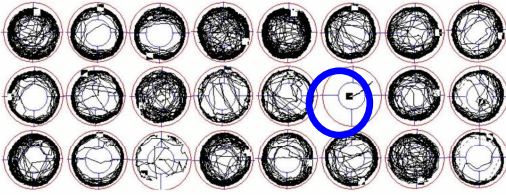
se pudieran establecer una correlación entre la concentración del AK, el tiempo de exposición y el tiempo de recuperación.

6.3c Fase II: Registros en larvas de 6 y 7 dpf

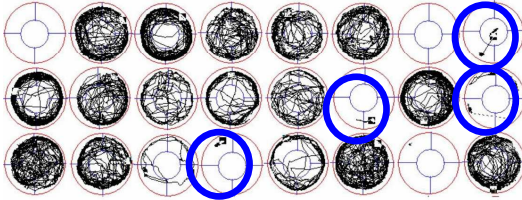
En la siguiente hoja de registros se presentan los resultados de uno de los experimentos realizados una vez que se establecieron las cinco zonas en cada arena. En estos experimentos, el tratamiento con AK se aplicó del día 5 pf al día 6 pf, a diferencia de los registros anteriores en los que las larvas fueron tratadas del día 4 pf al día 5 pf, las evaluaciones del registro de nado se realizaron ya sea inmediatamente después del tratamiento o 24 horas después. Al concluir el análisis de estos experimentos no se pudo apreciar una diferencia notable entre las distintas zonas por lo que los resultados se reportan igual que en caso de los pozos no divididos.

Análisis de los patrones de nado – 0 horas de recuperación

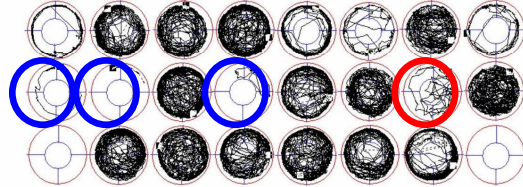
Control



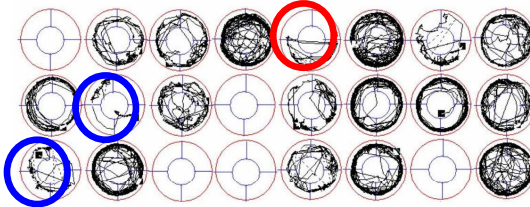
3 hrs 100 μ M



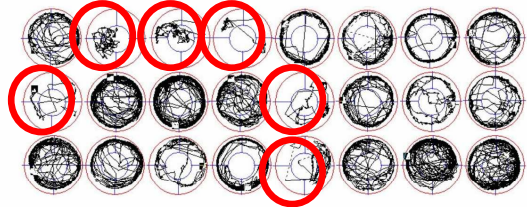
3hrs 200 μ M



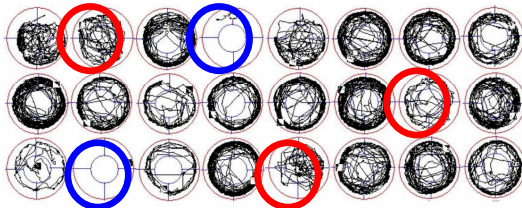
6 hrs 100 μ M



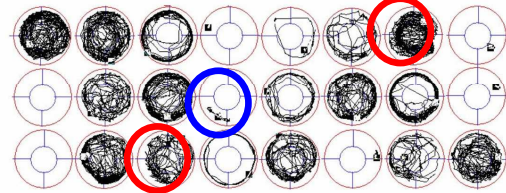
6 hrs 200 μ M



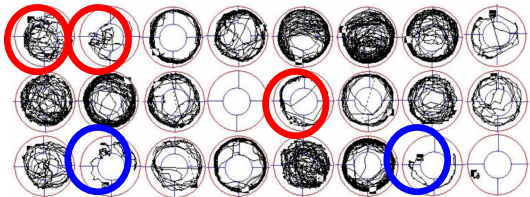
12 hrs 100 μ M



12 hrs 200 μ M



20 hrs 100 μ M



20 hrs 200 μ M

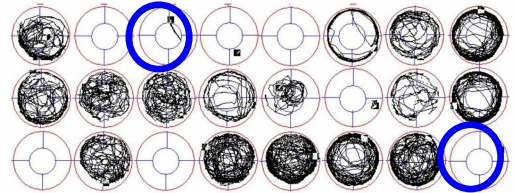


Figura 27. Imagen de un experimento representativo de la evaluación de los patrones de nado realizada 0 h después del tratamiento con AK en larvas de 6 dpf.

Se observó un registro de nado errático en el grupo control. En los grupos expuestos al AK durante 3, 6 y 12 horas se observaron 8 registros de nado errático, 9 registros de nado errático y 8 registros de nado errático, mientras que en el grupo expuesto 20 h se observaron 10 patrones de nado errático.

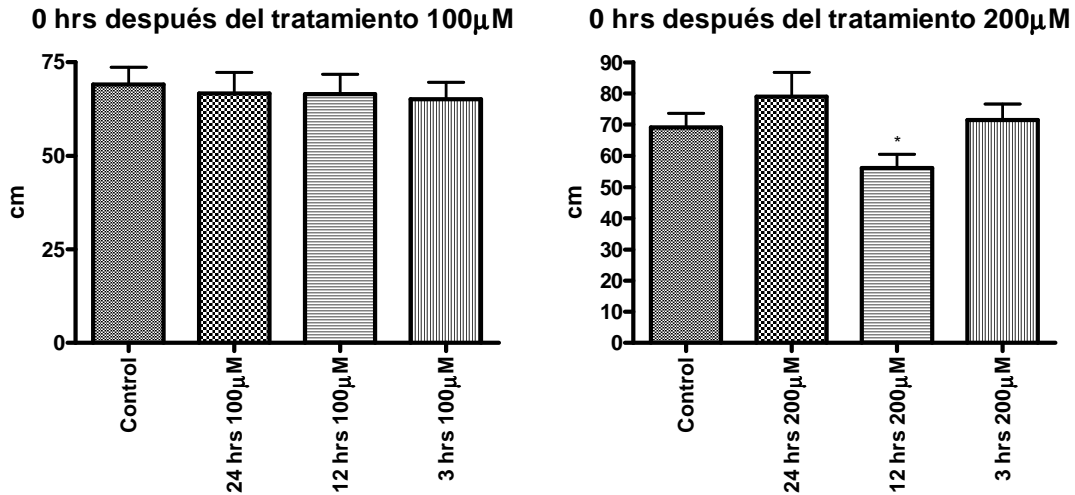
6.3d Fase II - Análisis de los patrones de nado

Las siguientes gráficas corresponden a los resultados de los experimentos en los que se aplicó el tratamiento de AK del día 5-6 pf. La evaluación se realizó de igual forma que en los experimentos en los que el campo no se había dividido considerando los mismos parámetros.

En el parámetro de distancia total recorrida se presentan cuatro gráficas; las primeras dos corresponden a la evaluación realizada inmediatamente después del tratamiento (Fig. 28 A) y las siguientes dos a la evaluación realizada después de 24 horas (Fig. 28 B).

Distancia total recorrida 5-6 dpf

A



B

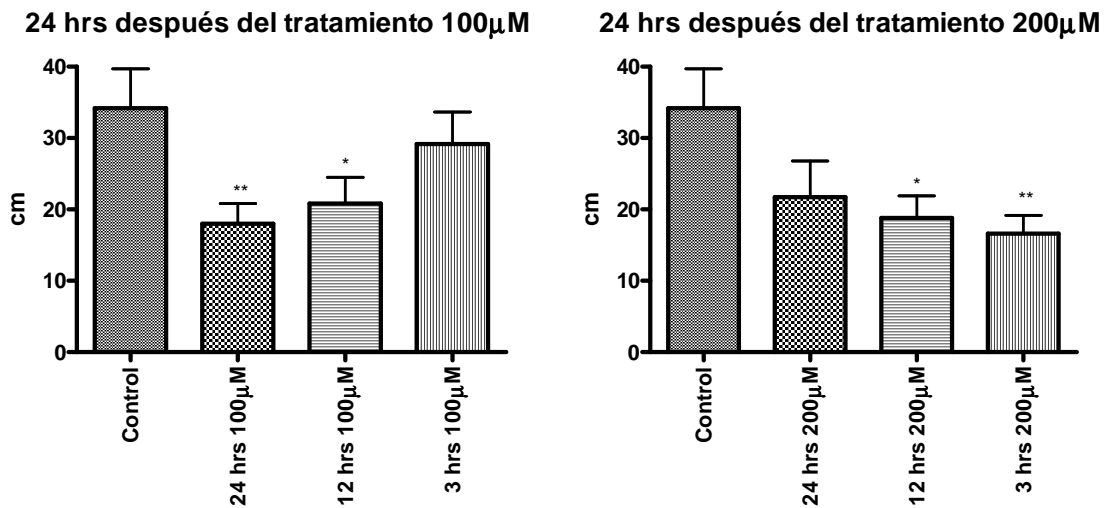


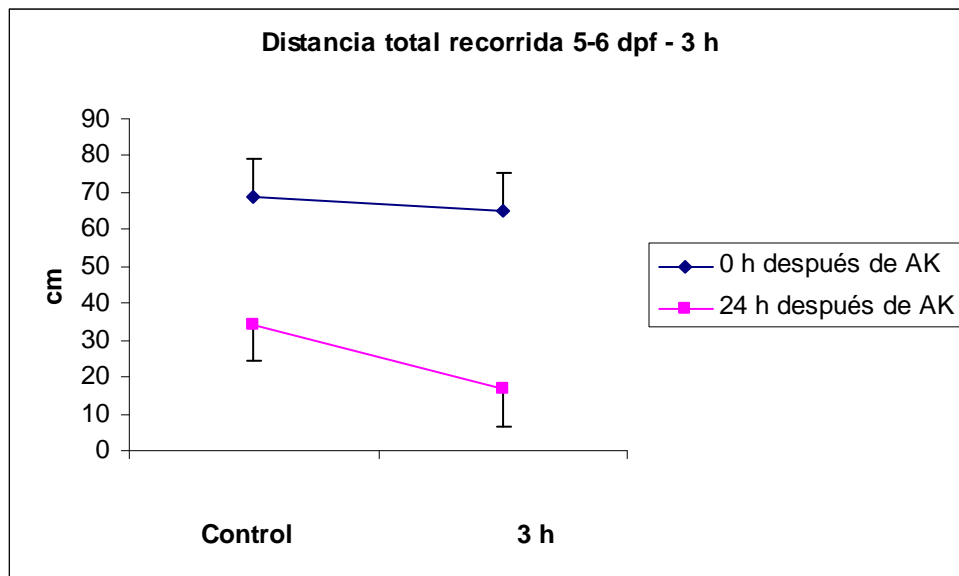
Figura 28. Análisis de la distancia total recorrida de los individuos de 5-6 dpf expuestos durante 3, 12 y 24 horas a AK 100 y 200 μ M, evaluados inmediatamente después del tratamiento (A) y 24 horas después (B). Las barras representan el promedio de 6 experimentos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar significativamente distintos del control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (prueba t de Student).

En el grupo correspondiente a 0 h de recuperación (Fig. 28 A) se observaron diferencias significativas en el grupo expuesto a KA durante 12 horas a 100 μ M, con valores inferiores al control.

En la evaluación realizada 24 h después del tratamiento (Fig. 28 B) se observaron cuatro grupos con reducciones significativas: en los grupos expuesto al AK 100 μ M durante 12 y 24 h, y en los grupos expuestos a 200 μ M durante 3 y 12 h.

En la figura 29 se muestran dos gráficas comparando los resultados de las condiciones 3 y 12 horas de exposición (Fig. 29 C y 29 D).

C



D

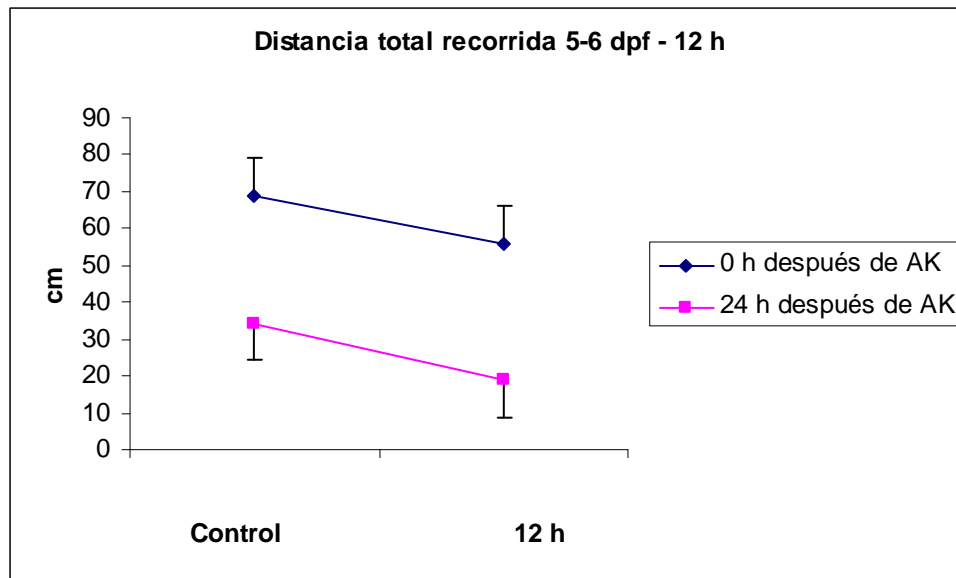


Figura 29. Análisis comparativo con respecto al control de la distancia total recorrida en larvas de 5-6 dpf en los tiempos de exposición de 3 horas (C) y 12 horas (D).

En estas gráficas (Fig. 29) se puede observar una reducción significativa en la distancia total recorrida de los grupos expuestos al AK durante 3 horas (Fig. 29 C) y 12 horas (Fig. 29 D) con respecto al control. Se muestra una reducción mayor en el grupo expuesto a KA 3 horas que en el grupo expuesto durante 12 horas. Se observan datos más bajos para los controles en el registro del día 6 pf. Esto puede estar relacionado con el decremento de las reservas de vitelo en las larvas.

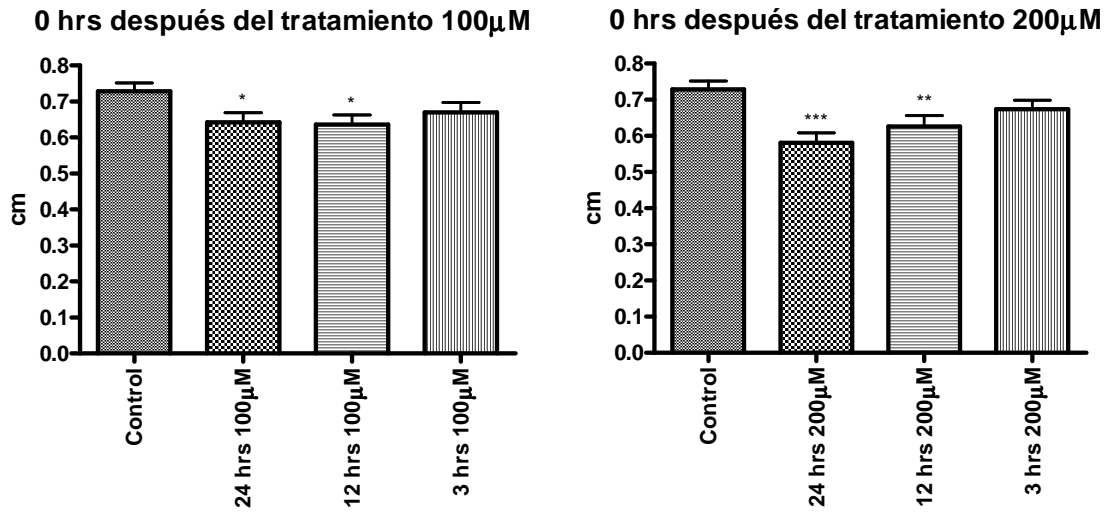
En estas dos gráficas se puede observar más claramente la disminución de la distancia total recorrida en los grupos tratados con AK durante 3 y 12 h. La evaluación realizada a 0 h de recuperación (esta señalada con una línea rosa) se observa una reducción más significativamente mayor con respecto al control que en los mismos grupos evaluados después de 24 h de recuperación (línea azul).

Los valores de distancia recorrida en los grupos control son menores en las larvas evaluadas después de 24 h de recuperación que en aquellas examinadas inmediatamente después del tratamiento. Esta diferencia podría estar relacionada con la reducción de las reservas de vitelo en las larvas, ya que el grupo examinado 24 h después del tratamiento tiene un día más de desarrollo.

Los resultado correspondientes al parámetro de máxima distancia recorrida se presentan en cuatro gráficas; las primeras dos corresponden a la evaluación realizada a 0 h de recuperación (Fig. 30 A) y las siguientes dos a la evaluación realizada después de 24 h de recuperación (Fig. 30 B).

Máxima distancia recorrida 5-6 dpf

A



B

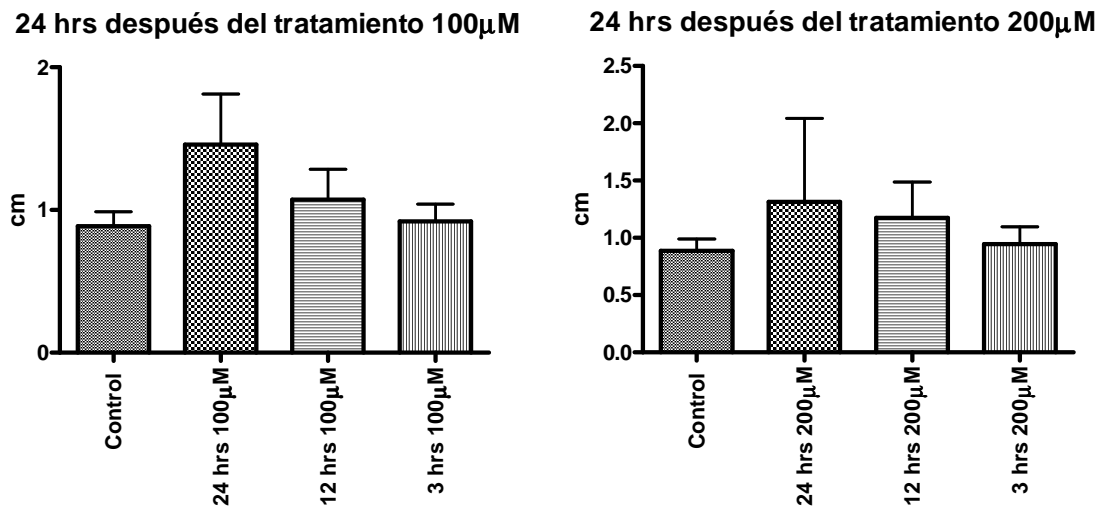


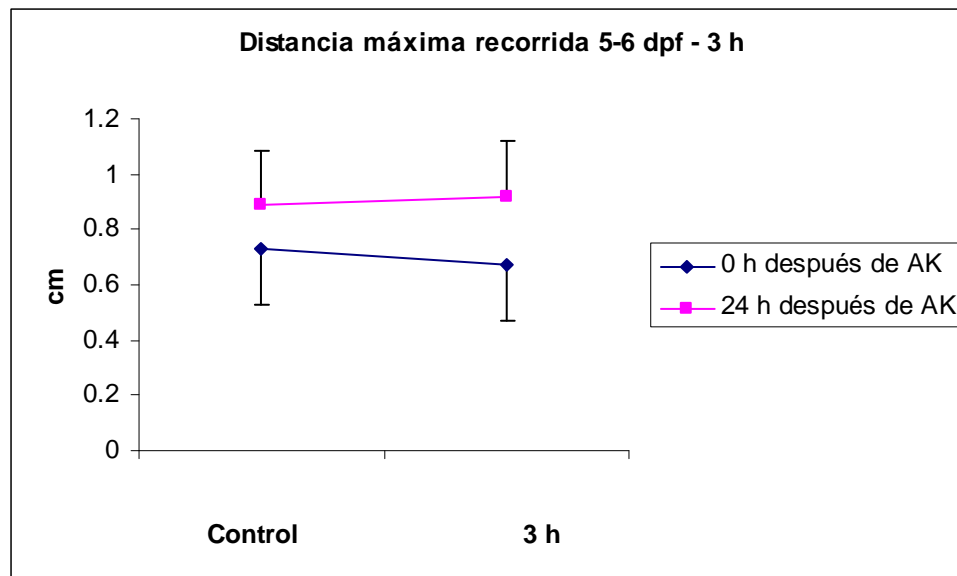
Figura 30. Análisis de la máxima distancia recorrida en larvas de 5-6 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 26.

En la evaluación realizada después del tratamiento con AK (Fig. 30 A) se observaron datos significativos en los grupos expuestos a AK durante 12 y 24 h en ambas concentraciones (100 y 200 μ M), los datos fueron inferiores con respecto al control.

En la evaluación realizada después de 24 h del tratamiento (Fig. 30 B) no se observaron datos significativos.

En la figura 31 se muestran dos gráficas comparando los resultados de las condiciones en las que se observaron diferencias significativas con respecto al control; 3 y 12 h de exposición (Fig. 31 C y 31 D).

C



D

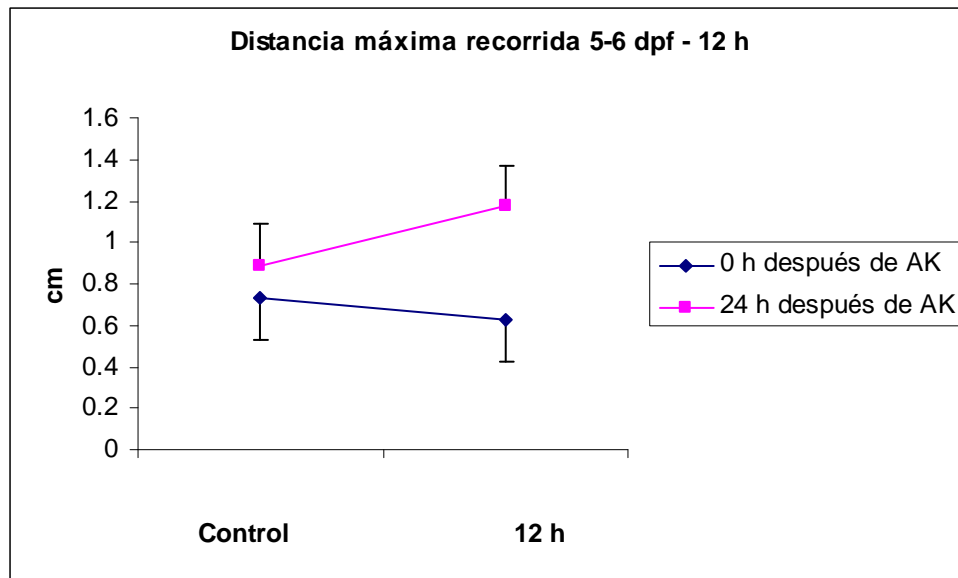


Figura 31. Análisis comparativo con respecto al control de la distancia máxima recorrida en larvas de 5-6 dpf en los tiempos de exposición de 3 horas (C) y 12 horas (D).

En las gráficas anteriores (Fig.31) se puede observar que en la evaluación realizada inmediatamente después de la exposición a AK en los grupos de 3 y 12 h de exposición la distancia máxima recorrida fue ligeramente inferior con respecto al grupo control, mientras que en la evaluación realizada después de 24 h de recuperación los grupos tratados con AK presentan valores por arriba de los registrados para el grupo control. El incremento en la distancia máxima recorrida puede deberse a una expresión diferencial en el SE que puede estar relacionado con el grado de afectación de los ejemplares, lo cual puede deberse a un estado de desarrollo cerebral más avanzado.

Para cada uno de los parámetros de ángulo de torsión, serpenteo y velocidad angular se presentan dos gráficas; la primera corresponde a la evaluación realizada inmediatamente después del tratamiento (32 A, 33 A y 34 A) y la segunda a los resultados de la evaluación realizada después de 24 h (32 B, 33 B y 34 B).

Ángulo de torsión 5-6 dpf

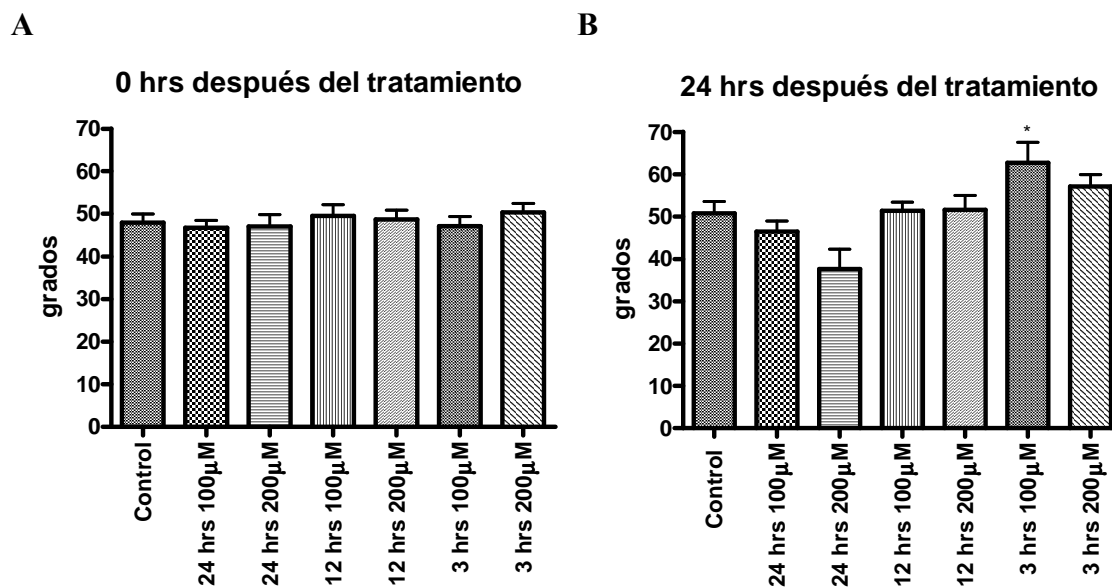
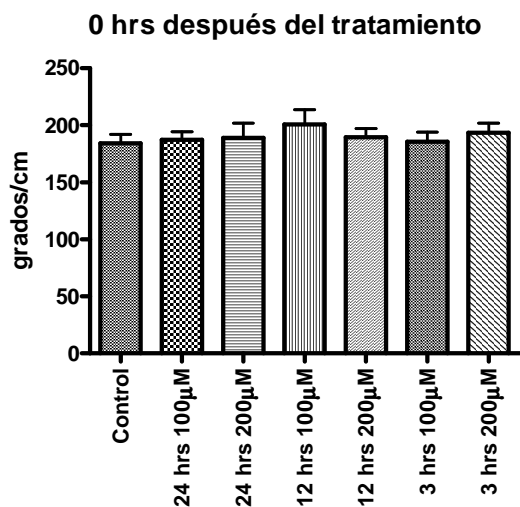


Figura 32. Análisis del ángulo de torsión en larvas de 5-6 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 26.

Serpenteo 5-6 dpf

A



B

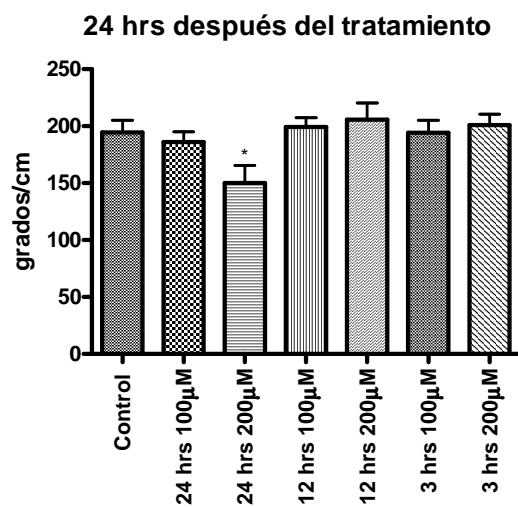
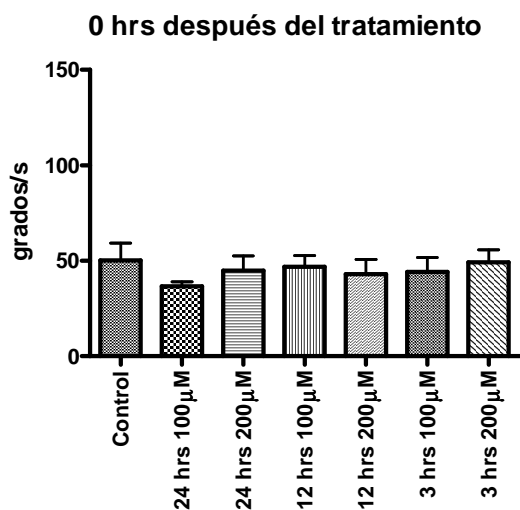


Figura 33. Análisis del serpenteo en larvas de 5-6 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 26.

Velocidad angular 5-6 dpf

A



B

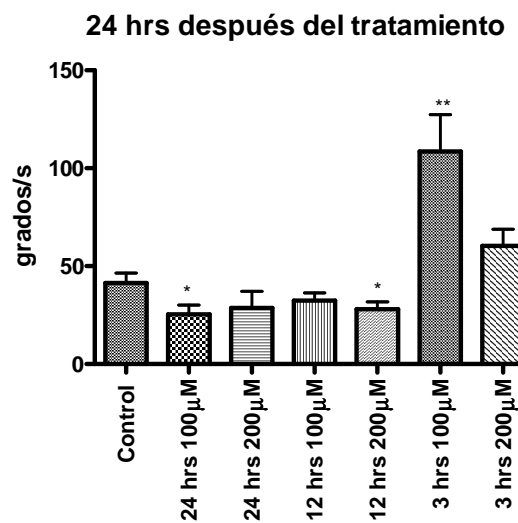


Figura 34. Análisis de la velocidad angular en larvas de 5-6 dpf expresado y evaluado en las mismas condiciones de la figura 26.

De igual manera que en los experimentos reportados anteriormente en los parámetros de ángulo de torsión, serpenteo y velocidad angular (Fig. 32-34) se observaron algunas diferencias significativas en las distintas condiciones sin que se pudiera establecer una correlación entre la concentración del AK, el tiempo de exposición y el tiempo de recuperación.

7. Discusión

El propósito de esta investigación fue probar el modelo de pez cebra en condiciones de epilepsia experimental inducida por el ácido kaínico. El pez cebra se ha empleado previamente para evaluar el efecto de convulsionantes como el pentileno-tetrazol que es un antagonista de GABA, y el ácido domóico, el cual es estructuralmente análogo al ácido kaínico (Berghmans, S. 2007, Tiedeken, J. 2005). El pentilentetrazol, al igual que el ácido domoico, administrados en larvas de 6 días pf. producen alteraciones en los patrones de nado, que se han homologado a las alteraciones observadas en la rata (Berghmans, S. 2007), los cuales fueron explicados previamente en la sección de resultados. En análisis electrofisiológicos y de expresión genética realizados en larvas de 7 días pf. expuestas a PTZ, se han reportado descargas eléctricas anormales en las zonas del tectum óptico, hipocampo y cerebelo, reproduciendo la actividad neuronal que caracteriza a la epilepsia, y se han descrito cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación de la respuesta al daño celular (Baraban, S. 2005). Para estos convulsionantes no se han hecho estudios histoquímicos de muerte celular. Hasta la fecha el pez cebra no se ha empleado para estudios de neurotoxicidad con ácido kaínico, y poco es conocido acerca de su efecto, tanto a nivel cerebral como de comportamiento.

En la primera parte de esta investigación se hizo un análisis del daño celular en el cerebro de las larvas generado por la exposición al AK, y en la segunda parte se evaluaron los cambios en los patrones de nado como posible consecuencia de las alteraciones causadas por la toxina.

Los resultados de las tinciones *in toto* de daño cerebral arrojaron datos concluyentes en cuanto al efecto del ácido kaínico en el cerebro del pez cebra, sobre todo la tinción con naranja de acridina, la cual resultó ser la más útil para identificar las áreas afectadas.

El daño observado fue evidente con las dos concentraciones de AK utilizadas en los experimentos (100 y 200 μM). El daño cerebral se observó desde el tiempo de exposición más corto correspondiente a 3 horas, siendo éste el máximo observado ya que no se incrementó aún en los tiempos de exposición más largos, de 12 y 24 horas. Es posible que los receptores tipo AMPA/KA se hayan saturado ya con la concentración mas baja de AK y en el periodo más corto de exposición, explicando así porque no se observó un aumento en los niveles el daño celular en los tiempos de exposición más largos.

En las imágenes dorsales de los cerebros expuestos al AK se muestra apoptosis en áreas relacionadas con la percepción, como el bulbo olfatorio, y en estructuras asociadas a los estímulos visuales como el tectum óptico y el pretectum. Las estructuras vinculadas al olfato y a la memoria se localizan también en estas áreas cerebrales y hay evidencia experimental que señala que el daño en esta área puede ser precursor a las alteraciones en la zona del hipocampo. Asimismo se observó daño celular significativo en el telencéfalo dorsal el cuál está asociado a los procesos de navegación y orientación. La zona del cerebelo presenta igualmente una afectación significativa; esta estructura está asociada al funcionamiento del sistema motor y a procesos sensoriales. Se observó también daño celular en la médula oblonga, que es una zona involucrada en las funciones autonómicas.

En las imágenes ventrales se observó daño en varias de las estructuras citadas en las imágenes dorsales. Además, fue posible apreciar daño celular en la zona correspondiente al hipotálamo, el cuál en esta especie está asociado, al igual que la médula oblonga, al sistema autonómico. Este patrón de daño en el pez cebra reportado en este trabajo presenta similitudes con el daño cerebral durante la epilepsia de lóbulo temporal que ha sido caracterizado en mamíferos (Ben-Ari, Y. 2000, Lerma J. 2004, Mares, P. 2004, Wang Q, 2005). El cuadro epiléptico induce alteraciones en el sistema límbico, incluyendo el hipocampo, y el daño celular en estructuras asociadas al olfato y a la memoria que se detecta en los mamíferos, se ha vinculado con alteraciones ulteriores en la zona del hipocampo (Kunz, T. 2002), También se ha observado muerte celular en otras áreas del sistema límbico como el cerebelo, el cortex y en la médula oblonga (Ben-Ari, Y. 2000).

Los resultados del presente estudio evidencian daño cerebral en las larvas del pez cebra, posiblemente debido a muerte neuronal inducida por la excitotoxina. En cuadros severos de epilepsia se ha identificado muerte neuronal, por mecanismos que aún no están completamente caracterizados (Benzon, J. 2002). Se ha descrito la activación de intermediarios tanto de la apoptosis como de la necrosis, asociadas ambas a la sobreactivación de los receptores de glutamato. En modelos animales, los factores como la duración y la intensidad de un episodio epiléptico, las alteraciones metabólicas y la activación de factores específicos asociados a la muerte celular parecen determinar la ruta de muerte (Benzon, J. 2002). En investigaciones en neuronas *in vitro* la exposición a concentraciones altas de excitotoxinas por tiempos prolongados produce muerte celular por

necrosis, mientras que si la exposición a la toxina es breve y en una concentración baja se detonan procesos apoptóticos (Bengzon, J. 2002).

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso regulado de gran importancia en el desarrollo y en el funcionamiento normal los organismos; es dependiente de energía e involucra una serie de cambios bioquímicos y morfológicos entre los que se encuentran la transcripción de genes, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y del ADN en sitios internucleosomales, cambios en la simetría y en la adhesividad de la membrana celular, mantenimiento de la integridad de los organelos y la disminución del volumen celular (Henshall, D. 2007). La apoptosis es controlada por señales de origen extracelular o intracelular que involucran a la activación de los receptores de los receptores de muerte celular (Fas y TNF) seguida de señales proapoptóticas intracelulares de diversa índole que culminan con la activación de caspasas y moléculas de la familia Bcl-2¹, así como la apertura de canales de membrana externa de la mitocondria, lo que incrementa la permeabilidad del calcio y promueve la liberación de citocromo c al citoplasma. El citocromo c confluye con las reacciones dependientes de las caspasas formando los apoptosomas característicos de la célula apoptótica (Bengzon, J. 2002, Henshall, D. 2007, Wang Q, 2005).

La necrosis es la muerte celular prematura causada por factores externos e involucra procesos morfológicos como pérdida de la estructura celular, engrosamiento de las mitocondrias, dilatación del retículo endoplásmico y lisis celular. La necrosis puede ser inducida durante la sobreactivación de los receptores al glutamato, asociada a la entrada excesiva de Ca y Na, que inducen hinchamiento, activación de proteasas, sobrecarga iónica y generación de especies reactivas de oxígeno (Charriaut-Marlangue, C. 1996).

De acuerdo a la evidencia disponible, la muerte celular que ocurre en los cuadros de epilepsia podría ser apoptótica y/o necrótica. En modelos en rata y ratón de la epilepsia del lóbulo temporal se han identificado procesos apoptóticos en el hipocampo (Charriaut-

¹ Las caspasas son una familia de cisteína proteasas específicas de ácido aspártico. En mamíferos se han identificado 14 caspasas que han sido clasificadas en dos grupos: las caspasas proinflamatorias (1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) y las caspasas reguladoras de apoptosis, que a su vez se catalogan en caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) que son las primeras en activarse, y las caspasas efectoras (3, 6 y 7), que son activadas por las iniciadoras. Las proteínas Bcl-2 se encuentran como monómeros en el citoplasma o asociados con la membrana externa mitocondrial y dependiendo de su función, una vez activadas, pueden promover la liberación de factores proapoptóticos, como el citocromo c, o mantenerlos secuestrados en la mitocondria.

Marlangue, C. 1996, Wang, Q. 2005). En investigaciones en ratas se ha detectado daño celular característico de la muerte celular programada después del status epiléptico, como por ejemplo fragmentación de ADN y la activación de ciertas caspasas; se ha mostrado que los procesos apoptóticos continúan incluso después del evento epiléptico y se ha comprobado la actividad de las caspasas efectoras (3 y 6) sobre todo en el hipocampo piramidal (Henshall, D. 2007, Wang, Q. 2005). En humanos con epilepsia del lóbulo temporal se ha detectado alteraciones en la actividad de caspasas y de proteínas Bcl-2 en hipocampo y corteza temporal, observándose un incremento en la expresión de la caspasa 3 en la corteza temporal de los pacientes con epilepsia que en individuos control (Henshall, D. 2007).

El AK se ha empleado como modelo para entender el daño cerebral en la epilepsia ya que tiene un efecto 30 veces más potente que el glutamato (Wang, Q. 2005). La muerte celular puede ocurrir a través de una interacción del AK con los receptores ionotrópicos tipo AMPA/KA. La activación de estos receptores incrementa los flujos de Ca, estimulando consecuentemente la generación de ROS y RNS, y generando una cadena autopropagada de daño celular (Fig. 35) (Wang, Q. 2005). Los flujos de Ca a través del receptor AMPA/KA están regulados por la subunidad GluR2 (Wang, Q. 2005). Los cambios de expresión en esta subunidad observados en modelos de epilepsia inducida por AK pueden explicar la muerte retardada que se observa en algunas regiones durante la epilepsia inducida por KA. Por ello, la distribución de estos receptores es importante para determinar la susceptibilidad del cerebro a la toxina y explicaría su efecto diferencial en las distintas zonas del cerebro. La muerte celular por apoptosis generada por el AK es consecuencia de la cadena de reacciones iniciada por la entrada de Ca y la generación de ROS/RNS, produciendo el colapso del potencial de membrana de la mitocondria y la apertura de los poros de transición de la misma, llevando a las reacciones características de la apoptosis (Wang, Q. 2005) (Fig. 35). La muerte necrótica responde a la serie de eventos asociados a la excitotoxicidad, antes descritos.

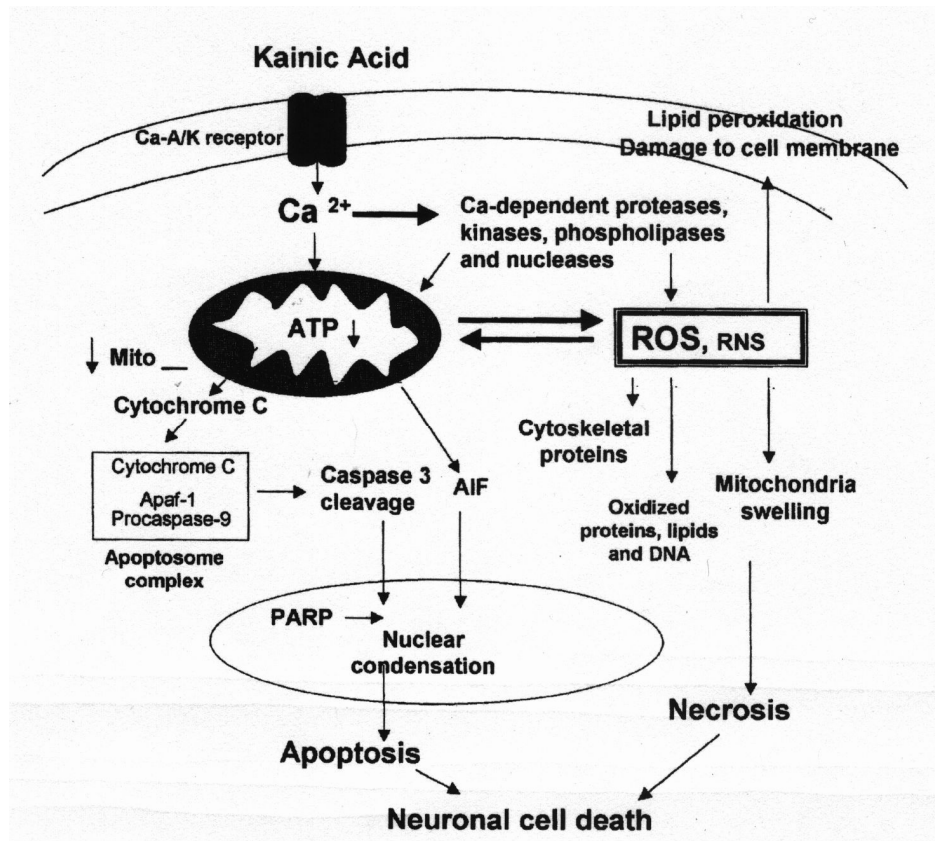


Figura 35. Esquema que expresa las rutas efectoras del AK. (Wang, Q. 2005)

7.1 Comportamiento

En este estudio se analizó el efecto del AK sobre los patrones de nado del pez cebra, examinando sus posibles alteraciones en función del daño celular causado por el excitotóxico, y su utilidad como un modelo experimental de epilepsia alterno al de los roedores. Los mecanismos de generación de la epilepsia no están totalmente esclarecidos, pero la función del glutamato como el neurotransmisor excitador más importante del cerebro está bien documentada (Henshall, D. 2007, Wang, Q. 2005). En este sentido el efecto de un antagonista de los receptores glutamatérgicos puede considerarse un modelo fisiológico.

En investigaciones previas se reporta que el glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en las regiones motoras del pez cebra en desarrollo (5 días post fertilización). Esta sustancia excitadora puede activar receptores tipo NMDA, y a estos mismos junto con receptores AMPA/K, en las dos regiones esenciales para el comportamiento motor:

cerebelo y médula espinal. Los resultado del estudio histoquímico en este trabajo mostraron daño celular en estas estructuras.

La investigación conductual se basó en el análisis de los patrones de nado, medida en dos fases experimentales con ejemplares de 5-6 días y de 6-7 días post fertilización. El pez cebra tiene un patrón general de nado fácilmente identificable descrito como conducta de huida; se trata de un patrón circular alrededor de las paredes del recipiente que lo contiene cruzando esporádicamente la zona central del tanque, sin que se observen cambios de dirección frecuentes. Este comportamiento se interpreta como un patrón normal de nado, que puede ser resultado de una conducta de exploración y de protección, ya que la proximidad con las paredes del tanque ofrece mayor refugio que la zona central, en la que los ejemplares están totalmente expuestos. Este comportamiento se ha observado en otros organismos como el salmón. A lo largo de la presente investigación se observó constantemente este tipo de patrones de nado en los grupos control.



Figura 36. Ejemplo del registro de una trayectoria de nado característico de huida

En investigaciones previas se han analizado los patrones de nado del pez cebra cuando ha sido expuesto a agentes convulsionantes como el pentilentetrazol (Tiedeken, J. 2007). Estos nados aberrantes han sido caracterizados y se han clasificado en tres estadios: el estadio I es cuando se observa un fuerte incremento en la actividad natatoria del pez; el estadio II es conocido como el efecto centrífuga, ya que el organismo tiende a nadar rápidamente en círculos y el estadio III describe movimientos clónicos, erráticos y pérdida de postura (Baraban, 2005). Se ha establecido una similitud entre los estadios y los patrones convulsivos en la epilepsia (Ben-Ari, Y. 2000).

En las hojas de registro de nado obtenidas en el curso de esta investigación se pudieron observar e identificar los 3 estadios a través de las marcas indicadas en los resultados siendo el estadio III el más frecuentemente observado y el II el de menor frecuencia de

aparición. Se observaron patrones de nado aberrantes en las larvas expuestas al AK en todos los experimentos, con alteraciones estadísticamente significativas en varios parámetros siendo el más afectado el correspondiente a la distancia total recorrida, el cual es fundamental para valorar las alteraciones motoras.

En promedio los peces más jóvenes (tratamiento con AK a los 4-5 dpf) nadaron mayores distancias que aquellos con un día más de desarrollo. Esto puede estar relacionado con un incremento en la susceptibilidad al AK dependiendo de la madurez de los receptores de kainato en ciertas estructuras del cerebro, o con la reducción de las reservas de vitelo. A lo largo del desarrollo postnatal las manifestaciones de la afectación se modifican, esto es posiblemente debido al crecimiento asociado a la migración de nuevos caminos neuronales y a la sinaptogénesis.

No se encontró ninguna relación entre la frecuencia de los nados aberrantes en los diferentes grupos y el tiempo de recuperación después del tratamiento (0 y 24 h), lo que sugiere una limitada capacidad de regeneración cerebral. En el cerebro del pez cebra adulto el potencial de regeneración celular ha sido ampliamente documentado y caracterizado para regiones determinadas como el bulbo olfatorio, el telencéfalo dorsal, el área preóptica, el tectum óptico y algunas regiones en el cerebelo y en la médula oblonga (Adolf, B. 2006). De acuerdo a los resultados de este trabajo parecería que la capacidad de regeneración celular en las estructuras cerebrales de las larvas no fue lo suficientemente rápida como para que se viera reflejado en el análisis estadístico de los datos de esta investigación.

En este estudio se hizo un intento por examinar los cambios en los patrones de nado en el área total y en un campo dividido en cinco zonas, esperando obtener información más detallada en términos espaciales, de los posibles cambios en los patrones de nado. Sin embargo, aunque se detectó una disminución en el espacio del campo ocupado por la larva y una preferencia por permanecer en la zona externa, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los resultados del presente estudio, en el aspecto del análisis del comportamiento, deben considerarse como preliminares y la investigación debe profundizarse, en particular en lo que se refiere al tiempo de evaluación de las trayectorias de nado de las larvas, ya que es posible que el intervalo analizado en el presente trabajo no haya sido suficiente para detectar efectos aberrantes, equivalentes a un status epiléptico, debidos al AK. Estos efectos

podrían presentarse con una mayor latencia y a diferentes tiempos de aparición, no sincronizados, dentro de la población examinada.

8. Conclusiones

En la presente investigación se analizaron los efectos del AK como una excitotoxina que replica el daño cerebral observado para modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal en los roedores. Se llevaron a cabo análisis histoquímicos y de comportamiento.

Los resultados del análisis de la tinción en bloque fueron claros y concluyentes, encontrándose lesiones bien delimitadas de manera específica en distintas áreas cerebrales, relacionadas con las áreas afectadas en modelos de epilepsia experimental en roedores y en epilepsia del lóbulo temporal en humanos.

Los registros de nado obtenidos durante las distintas fases del estudio, mostraron patrones visiblemente aberrantes, que pudieron correlacionarse de manera clara con los tiempos de exposición y las concentraciones del AK, en el parámetro de distancia total recorrida. En lo que se refiere a otros parámetros como ángulo de torsión, serpenteo y distancia máxima recorrida, a pesar de que se detectaron algunas alteraciones en los distintos grupos, los resultados en promedio, no alcanzaron una significancia estadística.

A partir de este estudio podemos entonces sugerir, de manera preliminar, que el pez cebra es un buen modelo para la evaluación de medicamentos anticonvulsivos y antiapoptóticos, particularmente si el análisis de los efectos de las sustancias se realiza primordialmente a nivel de daño celular cerebral y no a través de la evaluación del comportamiento.

9. Perspectivas

Los resultados de esta investigación muestran líneas clara a través de las cuales este estudio debe continuarse. En relación con la sección de histoquímica podría diseñarse un protocolo para detectar el tiempo más corto en el cuál se expresa funcionalmente y de manera máxima el AK.

En cuanto a la sección de comportamiento, el estudio debe proseguir midiendo los patrones de nado aberrantes en función del tiempo de observación y evaluación.

10. Bibliografía

Adolf. B, Chapouton P, Sok Lam C, Topp S, Tannhäuser B, Strähle U, Götz M, Bally-Cuif L.(2006) *Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon*. Developmental Biology 295:278-293.

Anichtchik O. (2004) *Neurochemical and behavioural changes in zebrafish Danio rerio after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. J Neurochem, Enero 88(2):443-453.

Baran H. (2006) *Alterations of taurine in the brain of chronic kainic acid epilepsy*. Amino Acids. 31(3):303-307.

Baran H, Vass, K, Lassmann H, Hornykiewicz O. (1994) *The cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor BW755C protects rats against kainic acid-induced seizures and neurotoxicity*. Brain Research, 646:2001-2006.

[Ben-Ari Y](#), [Cossart R](#) (2000) *Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress*. [Trends Neurosci](#). 23(11):580-7.

Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. (2002) [Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures](#). Prog Brain Res.;135:111-9.

Berghmans S, [Hunt J](#), [Roach A](#), [Goldsmith P](#). (2007) *Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants*. Epilepsy Research 75:18-28.

Brailowsky, S. *Epilepsia, enfermedad sagrada del cerebro*. Col. La ciencia para todos, Vol. 170. Fondo de Cultura Economía. México, 1999, pp. 144.

Castillo P.E, Malenka, R.C, Nicoll R.A, (1997) *Kainate receptors mediate slow post-synaptic current in hippocampal CA3 neurons*. Nature, 388 182-186.

Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zouaoui D, Represa A, Ben-Ari Y. (1996) [Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity](#). Trends Neuroscience 19(3):109-14.

[Farooqui AA, Yi Ong W, Lu XR, Halliwell B, Horrocks LA](#). (2001) *Neurochemical consequences of kainate-induced toxicity in brain: involvement of arachidonic acid release and prevention of toxicity by phospholipase A(2) inhibitors*. [Brain Res Brain Res Rev](#).38(1-2):61-78.

Henshall DC, Murphy BM. (2008) [Modulators of neuronal cell death in epilepsy](#). Curr Opin Pharmacol. 8(1):75-81.

Kaslin J. *The aminergic and cholinergic neurotransmitter system in the zebrafish brain*. The Finnish Graduate School of Neuroscience, Finland, Henslinki, 2004, pp 453.

[Kunz T](#). (2002) *The Role of Cyclooxygenase-2 in Models of Epilepsy and Traumatic Brain Injury : Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors*. Acta Universitatis Upsaliensis.

Lerma J, (2004) *Fisiología sináptica de los receptores de Kainato y sus implicaciones en la epileptogénesis*. Neurología, 19:106-116.

[Lerma J](#). (2006) *Kainate receptor physiology*. [Curr Opin Pharmacol](#).6(1):89-97.

Louzada P, Lima A, Mendonça-Silva D, Noel F, De Mello F, Ferreira S. (2004) *Taurine prevents the neurotoxicity of β -amyloid and glutamate receptor agonists: Activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders*. The FASEB Journal, 18:512-518.

Mares P, Folbergrová J, Kubová H. (2004) [Excitatory aminoacids and epileptic seizures in immature brain.](#) *Physiol Res.*;53 Suppl 1:S115-24.

Panula P, [Karlstedt K](#), [Sallmen T](#), [Peitsaro N](#), [Kaslin J](#), [Michelsen KA](#), [Anichtchik O](#), [Kukko-Lukjanov T](#), [Lintunen M](#). (2000) The *histaminergic system in the brain: structural characteristics and changes in hibernation.* [J Chem Neuroanat.](#) 18(1-2): 65-74.

Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, Moshnyakov M, Podlasz P. (2006) [Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases.](#) *Zebrafish.*3(2):235-47.

[Patel M](#), [Li QY](#).(2003) *Age dependence of seizure-induced oxidative stress.* *Neuroscience* 118(2):431-7.

[Peitsaro N](#), [Kaslin J](#), [Anichtchik OV](#), [Panula P](#). (2003) *Modulation of the histaminergic system and behaviour by alpha-fluoromethylhistidine in zebrafish.* [J Neurochem.](#) 86(2):432-41.

Pinheiro P, Mulle C. (2006) *Kainate receptors,* *Cell Tissue Res* 326:457-482.

[Tiedeken JA](#), [Ramsdell JS](#), [Ramsdell AF](#). (2005) *Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (Danio rerio).* [Neurotoxicol Teratol.](#) 27(5):711-7.

[Tiedeken JA](#), [Ramsdell JS](#). (2007) *Embryonic exposure to domoic Acid increases the susceptibility of zebrafish larvae to the chemical convulsant pentylenetetrazole.* [Environ Health Perspect.](#)115(11):1547-52.

[Wang Q](#), [Yu S](#), [Simonyi A](#), [Sun GY](#), [Sun AY](#). (2005) *Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration.* [Mol Neurobiol.](#)31(1-3):3-16.

Westerfield M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 2002 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.