



Alumna	VERÓNICA FARFÁN SILVA		
Número de Cuenta	510008297	Clave	70-4077
Posgrado	MAESTRÍA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)		

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA:

“ Estudio funcional del Sistema Nervioso Central y Músculo Esquelético en el modelo de pilocarpina como inductor de crisis epilépticas ”

DIRECTORA DE TESIS:

ALICIA ORTEGA AGUILAR

Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica – UNAM.

Integrantes del Comité Tutor:

- 1.- Dra. Alicia Ortega Aguilar.
- 2.- Dr. Miguel Ángel Ávila.
- 3.- Dr. Fidel Ramón Romero.

México D.F. Marzo del 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice general

1.	Introducción	6
1.1.1.	Epilepsia.....	8
1.1.2.	Clasificación.....	10
1.2.	Sistema nervioso humano.....	12
1.2.1.	Organización del sistema nervioso.....	14
1.2.2.	Histología del sistema nervioso.....	15
1.2.3.	La neurona.....	17
1.3.	Sistema límbico: hipocampo y amígdala.....	17
1.3.1.	Formación hipocámpica.....	19
1.4.	Comunicación entre el sistema nervioso central y el tejido muscular.....	20
1.5.	Tejido muscular.....	21
1.5.1.	Músculo esquelético.....	22
1.5.2.	Mecánica de la contracción muscular.....	26
1.5.2.1.	Descripción de la contracción.....	26
1.5.2.2.	Tipos de contracción muscular.....	28
1.6.	Modelos experimentales de epilepsia.....	29
1.6.1.	Modelo de epilepsia de pilocarpina.....	30
2.	Planteamiento del problema	32
2.1.	Objetivos.....	32

2.2.	Hipótesis.....	33
3.	Técnicas	34
3.1.	Tomografía por emisión de positrones.....	34
3.2.	Bases teóricas de la tomografía por emisión de positrones (PET).....	38
3.3.	Radiofármacos.....	41
3.4.	Tomografía por emisión de positrones de pequeños animales (MicroPET).....	42
3.5.	Electrofisiología.....	44
3.5.1.	Técnica electrofisiológica.....	44
3.6.	Modelos Biomecánicas de la contracción.....	46
3.7.	Resultados recientes de algunos trabajos sobre epilepsia de lóbulo temporal.....	47
3.8.	Perspectivas.....	50
4.	Materiales y métodos	51
4.1.	Animales.....	51
4.2.	Protocolo del modelo experimental.....	52
4.3.	Preparación del animal para el estudio PET.....	52
4.4.	Preparación del animal para Electrofisiología.....	55
4.5.	Arreglo experimental.....	57
4.6.	Estudios mecánicos del músculo.....	57
4.7.	Protocolo de estimulación.....	58
5.	Resultados	62
5.1.	Efecto de la pilocarpina sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.....	62
5.1.1.	Efecto de la pilocarpina en la estimulación tetánica.....	62

5.1.2.	Efecto de la pilocarpina en la fatiga.....	65
5.1.3.	Efecto de la pilocarpina en la recuperación.....	67
5.2.	Descripción conductual en el modelo de epilepsia inducido por Pilocarpina en la rata.....	68
5.3.	Análisis mediante técnica PET del daño en el sistema nervioso de la rata con Epilepsia crónica.....	72
5.4.	Efecto de la epilepsia sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.....	80
5.4.1.	Efecto de la epilepsia de estadio latente en el índice de fatiga del músculo esquelético.....	80
5.4.2.	Efecto de la epilepsia latente en la fatiga y recuperación del músculo esquelético.....	83
5.4.3.	Efecto de la epilepsia de estadio crónico en el índice de fatiga del músculo esquelético.....	88
5.4.4.	Efecto de la epilepsia crónica en la fatiga y recuperación del músculo esquelético.....	90
6.	Discusión y Conclusiones	95
6.1.	Pilocarpina sobre músculo esquelético de rata.....	96
6.2.	Alteraciones en el comportamiento de la rata tratada con pilocarpina.....	97
6.3.	Estudio funcional del sistema nervioso de rata con epilepsia crónica.....	98
6.4.	Estudio mecánico de las propiedades contráctiles del músculo esquelético de rata epiléptica.....	101
6.4.1.	Índice de fatiga del EDL en la epilepsia latente.....	103
6.4.2.	Fatiga y Recuperación del EDL en la epilepsia latente.....	103
6.4.3.	Índice de fatiga del EDL en la epilepsia crónica.....	104

6.4.4. Fatiga y Recuperación del EDL en la epilepsia crónica.....	104
Bibliografía	106

Capítulo 1

Introducción

La epilepsia es una alteración del sistema nervioso central (SNC). Afecta del 1 al 2% de la población mundial y representa la segunda causa más importante de consulta neurológica, después de las cefaleas. Sus consecuencias van más allá de las alteraciones que se producen durante la crisis convulsiva, ya que también se asocia a una estigmatización social y a una problemática psicológica, familiar y económica importante^[1].

Se caracteriza por generar crisis epilépticas, trastornos conductuales, movimientos no habituales y/o síncope (*status epilepticus*, SE). Las crisis epilépticas son la manifestación conductual sintomática de la descarga de alta frecuencia en forma anormal, espontánea y sincrónica de una población de neuronas^[2] hiperexcitables localizadas generalmente en estructuras hipocampales y neocorticales.

Existen diversos modelos animales para el estudio de éste síndrome. Estos modelos se han generado por medio de lesiones físicas a nivel cerebral o por la administración de drogas. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual se establece la epilepsia en el ser humano.

Uno de los modelos animales más usados para la inducción de epilepsia del lóbulo temporal (ELT) está basado en la administración de pilocarpina, cuya activación repercute en la inducción de un estado de hiperexcitabilidad neuronal en las células musgosas y en las piramidales del tipo CA1 y CA3, localizadas principalmente en el hipocampo (ver Figura 1.1), generando un patrón característico de descargas eléctricas que resultarán en un status epiléptico. Sin embargo, las causas desencadenantes y los procesos fisiopatológicos que expliquen la génesis de las crisis epilépticas en humanos son aún desconocidos. El modelo de pilocarpina ha sido el idóneo debido a que las alteraciones anatómicas presentes en el hipocampo de las ratas sometidas a este tratamiento resultan similares a las descritas en el humano.

En este trabajo se emplea el modelo de pilocarpina para inducir el *status epiléptico* en ratas para analizar su metabolismo cerebral durante la fase crónica de epilepsia y evaluar el efecto de la epilepsia sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.

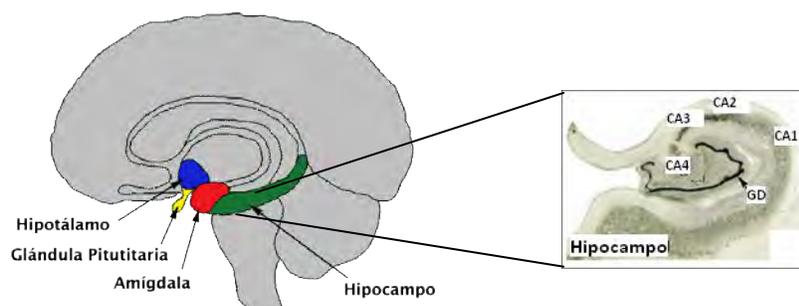


Figura 1.1 Corte sagital del cerebro, se observa el hipocampo donde se localizan principalmente las células musgosas y piramidales involucradas en el desarrollo de un *status epiléptico*. Y, regiones corticales del sistema límbico; el cual se encuentra alterado durante la epilepsia. GD: giro dentado. Adaptada de [3].

La epilepsia humana desencadena un efecto sobre el sistema locomotor; por lo que el estudio de los mecanismos del efecto de la epilepsia a nivel de la fibra muscular proveerá información para entender el efecto adaptativo del músculo ante esta manifestación patológica del SNC. La participación del músculo esquelético durante el SE es extensa y afecta tanto a músculos lentos como rápidos. Sin embargo, aún se desconoce el compromiso del tejido muscular durante la evolución del SE, el efecto sobre las propiedades mecánicas del músculo puede evaluarse de manera cuantitativa y valorar la reversibilidad del efecto. La lesión del SNC en el modelo de epilepsia inducido por pilocarpina puede evaluarse por la tomografía por emisión de positrones (PET), ésta técnica ha permitido la adquisición de información funcional o metabólica en tres dimensiones. Con esta técnica se evalúa la actividad cerebral en el modelo animal, proporcionando un nuevo enfoque para investigar la naturaleza y la evolución de los cambios cerebrales que ocurren de manera temporal y espacial en las crisis epilépticas. Ofreciendo con ello la ventaja de identificar en forma temprana los cambios neurobiológicos con valor predictivo en el desarrollo de la epilepsia. Por lo anterior, se analizan imágenes PET del metabolismo glucolítico cerebral en el modelo de rata con lesión cerebral por pilocarpina garantizando que la lesión del SNC es la fuente de los cambios observados en el músculo esquelético.

1.1.1. Epilepsia

Los mecanismos biológicos de la epilepsia involucran metabolismo energético, pérdida neuronal y neurogénesis^[4,5].

Definiciones

- i. La epilepsia es un grupo de padecimientos en los cuales hay episodios de extensión anormal de una excitación neuronal a través del encéfalo y que en su forma típica produce pérdida de la conciencia y convulsiones^[6].
- ii. La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por ataques espontáneos debidos a la hiperactividad neuronal. La ELT es un forma común entre las epilepsias, incluyendo alrededor del 40% de todos los casos^[7].
- iii. La epilepsia es una enfermedad que se caracteriza por crisis epilépticas recurrentes. Por lo tanto, una única crisis no constituye una epilepsia. Tampoco lo son las crisis reactivas a alteraciones transitorias del SNC que se resuelven espontáneamente o son tratadas satisfactoriamente,^[8].

Independientemente de la definición de epilepsia, varios autores convergen en identificarla como una actividad excitatoria en el SNC en los mamíferos involucrando principalmente al neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central: el glutamato. Este aminoácido que tiene la función de neurotransmisor está involucrado en eventos fisiológicos, desde el desarrollo cerebral hasta en procesos como la memoria y el aprendizaje. Por lo que una sobreestimulación del sistema glutamatérgico esta implicada en disfunciones cerebrales agudas y crónicas,^[9]. El fino balance entre concentraciones sinápticas fisiológicas y tóxicas de glutamato está regulado por la acción concertada del aparato de exocitosis y transportadores de glutamato, localizadas en las neuronas y en la glía. La neurotransmisión glutamatérgica también juega un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de los estados convulsivos. La liberación pronunciada de glutamato seguida por la activación de N-methyl-D-aspartato (NMDA), kainato, amino-3-hidroxiácido propiónico 5-metil-4-isoxazol y receptores metabotrópicos se han asociado a la excitotoxicidad del glutamato y a la muerte neuronal en varias

estructuras corticales durante el SE,^[10,11]. Hay evidencias que destacan que durante el SE de corta duración hay un aumento en la liberación de glutamato en el hipocampo^[12].

La epilepsia es en general una alteración en la cual una excitación sináptica anormal causa propagación descontrolada de potenciales de acción en el encéfalo, como se ilustra en la Figura 1.2. Aunque la epilepsia es un episodio que es llamado de distintas formas tales como: ataque, crisis o status epiléptico y puede iniciar con síntomas sensitivos o una alteración subjetiva de extrañeza y quietud a la que se le denomina “*aura*”. El *aura* con frecuencia incluye el fenómeno conocido como “lo ya visto (déjàvu)”, el cual es un sentimiento raro de familiaridad con los alrededores y circunstancias, esta condición se atribuye a la actividad en la formación hipocámpica, amígdala y corteza sensitiva de asociación de lóbulo temporal. En la epilepsia adquirida hay evidencia de que la pérdida de neuronas induce a una reorganización sináptica aberrante, lo cual potencia la transmisión excitadora y en menor medida la inhibitoria. Dando lugar a una hipersincronización espontánea.

Sin embargo, muy poco se conoce sobre el cómo comienzan dichas crisis y el por qué se detienen. La terminación de la crisis es un proceso activo en el que están involucrados neurotransmisores como la adenosina y los opiáceos endógenos. Estos mismos mecanismos que detienen la crisis también producirán los síntomas postcríticos. Los mecanismos conocidos son seis^[8]:

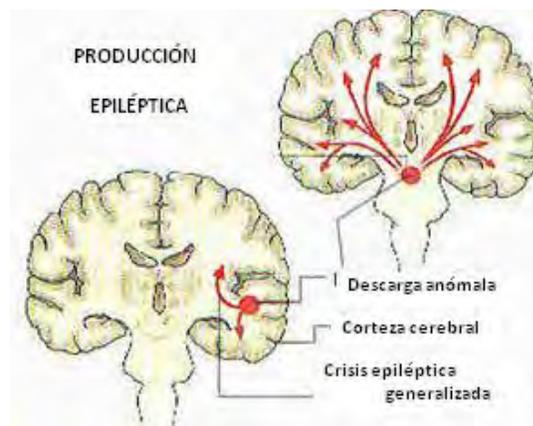


Figura 1.2 Epilepsia, excitación sináptica anormal generada en áreas corticales cerebrales específicas que se propagan en todo el cerebro. Adaptada de ^[13].

1.-Inhibición defectuosa de los receptores GABA_A. Dicho receptor está unido a los canales del cloro y es el blanco principal de acción para muchos antiepilepticos (benzodiazepinas, fenobarbital, topiramato, etc.) Cada uno de estos fármacos aumentará la frecuencia de apertura de los canales de cloro o la duración de dicha apertura.

2.-Activación defectuosa de los receptores GABA por las proyecciones provenientes del hipocampo.

3.-Amortiguación defectuosa del calcio intracelular.

4.-Activación aumentada de los receptores NMDA.

5.-Incremento de la sincronización neuronal debido a las interacciones efácticas. Los campos eléctricos creados por la activación de las neuronas piramidales del hipocampo pueden aumentar la excitabilidad de las neuronas vecinas mediante interacciones no sinápticas (efácticas).

6.-Incremento de la sincronización o activación debido a redes colaterales recurrentes excitadoras.

1.1.2. Clasificación

Las crisis epilépticas duran típicamente de uno a varios minutos y pueden estar seguidas de un periodo variable de depresión cerebral que se manifiesta por déficits neurológicos localizados (pérdida de fuerza en extremidades –parálisis de Todd-, alteraciones sensitivas, etc.) o difusos (somnolencia, cansancio, agitación, delirio, cefalea, etc.). Las crisis pueden ser reactivas cuando son consecuencia de una respuesta cerebral a un estrés transitorio como traumatismo cráneo-encefálico, fiebre, desequilibrios metabólicos, contacto con tóxicos, abstinencia o abuso de alcohol y/o drogas y lesiones permanentes cerebrales^[8].

La Clasificación Internacional de las crisis epilépticas (Comisión para la Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia ILAE-1981) divide las manifestaciones clínicas en crisis parciales (comienzan en un área hemisférica específica) y en crisis generalizadas (comienzan en los dos hemisferios simultáneamente), ver **Tabla 1**. Este Organismo Internacional contra la Epilepsia define al SE como una crisis que persiste por lo menos 30 min o son varias con un intervalo entre ellas tan corto que no permite la recuperación de la conciencia por el tiempo mencionado. Alrededor del 30% de los nuevos casos de epilepsia son provocados por SE; existen dos grupos de causas que originan un SE: por causas epilépticas y no epilépticas. Ejemplos del primer caso: una epilepsia preexistente complicada por dejar el tratamiento, por alcoholismo, etc. Ejemplos del segundo caso y que además representan el 50% de los casos de SE son: alteraciones metabólicas, infecciones del sistema nervioso, por sustancias tóxicas^[14].

Cuando una crisis parcial no produce alteración de la conciencia se denomina crisis parcial simple. Si la conciencia está alterada se denominan crisis parciales complejas. Los síntomas o signos de las crisis parciales simples dependerán del área cortical involucrada en el foco epiléptico y se dividen en: motoras, sensitivas, autonómicas y psíquicas.

Clasificación internacional de las crisis epilépticas

1. Crisis parciales o focales

1. a. Crisis parciales simples:

- 1. A.1. Con signos motores
- 1. A.2. Con síntomas somatomotores o sensoriales especiales
- 1. A.3. Con signos o síntomas autonómicos
- 1. A.4. Con síntomas psíquicos

1. b. Crisis parciales complejas:

- 1. B.1. Crisis parciales simples seguidas de alteración de la conciencia
- 1. B.2. Con empeoramiento de la conciencia desde el inicio

1. c. Crisis parciales con evolución secundaria hacia crisis generalizadas

- 1. C.1. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis generalizadas
- 1. C.2. Crisis parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas
- 1. C.3. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas y después a crisis generalizadas

2. Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas)

2.a. Crisis de ausencia

- 2. A.1. Ausencias típicas
- 2. A.2. Ausencias atípicas

2.B. Crisis mioclónicas

2.C. Crisis clónicas

2.D. Crisis tónicas

2.E. Crisis tónico-clónicas

2.F. Crisis atónicas (crisis astáticas)

3. Crisis epilépticas inclasificables

Tabla 1. Adaptada de la *Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. Epilepsy 1981; 22:489-501.*

Las **crisis parciales simples** sin síntomas motores son denominados **auras**. Las crisis generalizadas pueden ser convulsivas y no convulsivas. Las convulsivas incluyen las tónicas (contracciones sostenidas), clónicas (movimientos repetitivos de un grupo muscular) y tónico-clónicas. Las no convulsivas incluyen las crisis de ausencia que consisten en lapsos de pérdida de conciencia de segundos de duración (menor a 10 segundos), se pueden observar movimientos simples como

parpadeo o muecas faciales; crisis mioclónicas que son sacudidas musculares bilaterales y simétricas, súbitas y breves, sin alteración de la conciencia; crisis tónicas que son breves contracciones musculares más prolongadas, simétricas y bilaterales, con o sin empeoramiento de la conciencia y que con frecuencia causan la caída del paciente al suelo; y las crisis atónicas que consisten en una pérdida de tono bilateral y súbito, con o sin empeoramiento del nivel de la conciencia y que frecuentemente causan caídas. También podemos encontrar eventos epilépticos que son inducidos por un estímulo específico como la luz, la lectura, un susto, olores etc., y son denominadas epilepsias reflejas^[8].

La **epilepsia del lóbulo temporal (ELT)**, es una de las más frecuentes dentro de las epilepsias conocidas. Como se mencionó en párrafos anteriores, se clasifica así porque el área cortical involucrada es comúnmente el foco epileptógeno. En la ELT las **crisis epilépticas** que se presentan son de tipo convulsivo **tónico-clónicas generalizadas**. El término tónicas refiere a **contracciones sostenidas**, y, clónicas: que son **movimientos repetitivos de un grupo muscular**^[1].

DIAGNÓSTICO

La epilepsia del lóbulo temporal se asocia frecuentemente con la esclerosis del hipocampo resultando en la neurodegeneración significativa en el hilio y las subregiones del hipocampo CA1 y CA3^[15]. El tratamiento convencional es el farmacológico, principalmente con sustancias que aumentan la neurotransmisión gabaérgica o disminuyen la glutamatérgica. Sin embargo, en la mayoría de los casos clínicos, es muy difícil controlar la epilepsia de tipo del lóbulo temporal porque son refractarias a tratamiento farmacológico^[16,17].

En varios casos, las crisis no se extienden a todo el encéfalo y se puede pasar por alto el diagnóstico si hay ausencia de convulsiones. La naturaleza del *aura* puede aportar un indicio para la localización del foco epileptogénico, es decir en el cual se inicia la actividad anormal. A menudo un ataque inicia con una alucinación de un olor desagradable pero no identificable debido a la estimulación de la corteza del uncus y los núcleos cortico mediales de la amígdala.

La electroencefalografía proporciona información en la investigación clínica de la epilepsia. Las anormalidades en el electroencefalograma (EEG) caracterizan los diferentes tipos de epilepsia y pueden ayudar a localizar el foco epileptógeno en el cual inicia la descarga anormal.

Hay fármacos anticonvulsivantes disponibles para el tratamiento de los diversos tipos de epilepsia estos reducen la frecuencia y gravedad de los ataques. Es factible algunas veces curar la alteración

mediante la localización del foco epileptógeno y la remoción de éste por medios quirúrgicos.

1.2 Sistema nervioso humano

El sistema nervioso central se forma a partir del tubo neural y el sistema nervioso periférico de la cresta neural, ambos derivan del ectodermo en el desarrollo embrionario. Las principales divisiones del sistema nervioso central se generan a partir de la cuarta semana después de la fecundación. Estas son la médula espinal, médula oblongata, puente, mesencéfalo, diencefalo y hemisferios cerebrales. El cerebro humano tiene hemisferios cerebrales grandes con una corteza cerebral extensa y muy plegada. El cerebelo, es una protusión del tallo cerebral que también está muy desarrollado en el humano^[6].

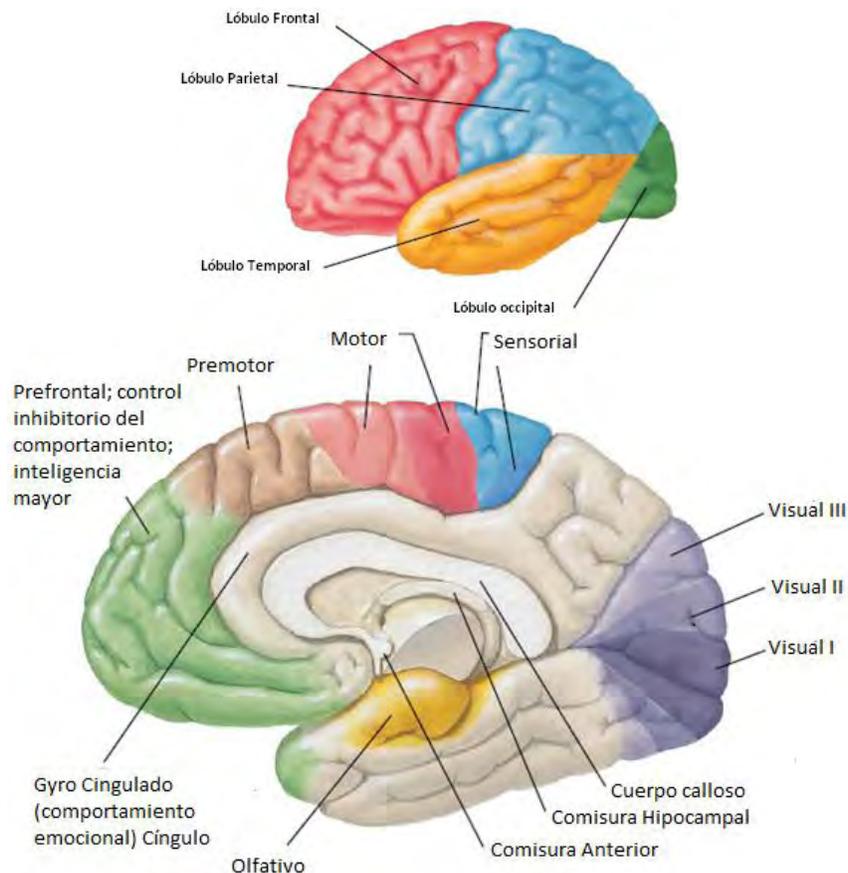


Figura 1.3 Organización funcional de la corteza cerebral. Adaptada de: Atlas de Neuroanatomy and Neurophysiology, 2002.

El tejido nervioso está formado de células excitables, que permiten la generación de impulsos eléctricos que hacen posible la comunicación y la regulación de la mayor parte de los tejidos del organismo, ver

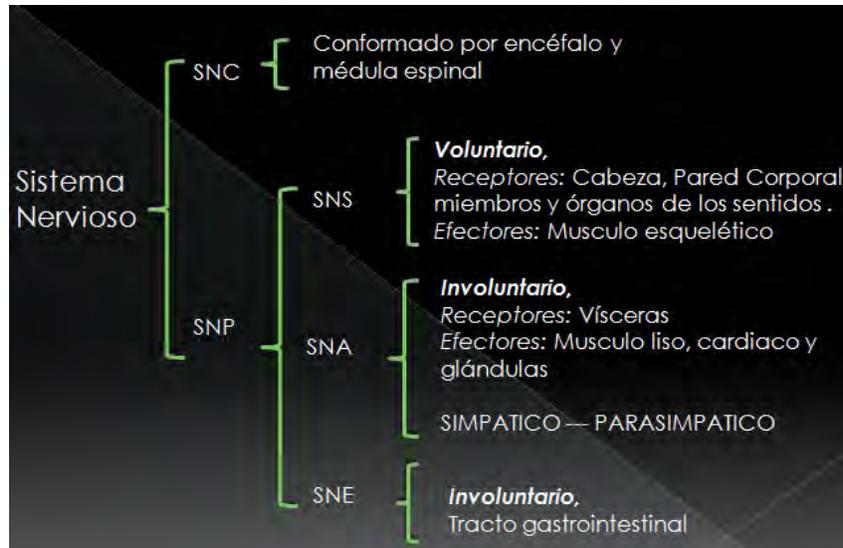
Figura 1.3. El cerebro humano de una persona adulta, pesa aproximadamente 2 kg y está constituido por el encéfalo que a su vez está constituido por cien mil millones de neuronas aproximadamente; los nervios craneales; la medula espinal con 100 millones de neuronas; los nervios espinales: 31 pares que inervan todo el cuerpo; los ganglios: cúmulos de cuerpos neurales ubicados fuera del cerebro y, los plexos entéricos: redes de neuronas en el aparato digestivo.

Las funciones principales del sistema nervioso son: la función sensitiva, integradora y motora. La *función sensitiva*, detecta estímulos internos y externos a través de los receptores y, las neuronas aferentes los transportan al encéfalo y a la medula espinal. La *función integradora*, procesa la información para efectuar una respuesta. La *función motora* realiza la respuesta mediante el músculo esquelético.

1.2.1. Organización del sistema nervioso

La corteza cerebral representa el mayor centro para el procesamiento de señales motoras y sensoriales. En general, el lóbulo frontal procesa información motora, visual, del habla y la personalidad. El lóbulo parietal procesa la información sensorial; el lóbulo temporal, auditiva y de memoria; y el lóbulo occipital, la visión; Figura 1.3. El cerebelo coordina ligeras actividades motoras y procesos de posición del músculo. El tronco encefálico (bulbo raquídeo, médula espinal, mesencéfalo) transmite información motora y sensorial y regula importantes funciones autónomas. La columna vertebral recibe información sensorial y transmite información somática y motora autonómica hacia blancos periféricos (músculos, vísceras). El sistema nervioso central consiste en sustancia gris y blanca, Figura 1.5. La sustancia gris contiene los cuerpos celulares de las neuronas y las dendritas. La sustancia blanca consiste principalmente de los axones, la mayoría de los cuales tienen vainas de mielina¹. En el Cuadro 1.1, se describe brevemente la organización del Sistema Nervioso.

¹ Mielina: actúa como aislante eléctrico del axón y aumenta la velocidad de conducción del impulso nervioso.



Cuadro 1.1 Estructuración del sistema nervioso humano^[18]. SNC: Sistema Nervioso Central; SNP: Sistema Nervioso Periférico; SNS: Sistema Nervioso Somático; SNA: Sistema Nervioso Autónomo y, SNE: Sistema Nervioso Entérico.

1.2.2. Histología del sistema nervioso

Las primeras células en diferenciarse en el sistema nervioso son las neuronas, las cuales se especializan en la comunicación. Son seguidas por las células de sostén conocidas como neuroglía o glía. Todos los organismos vivos responden a estímulos químicos y físicos. La respuesta puede ser un movimiento o la expulsión de productos biosintéticos de la célula. Estas funciones receptoras,

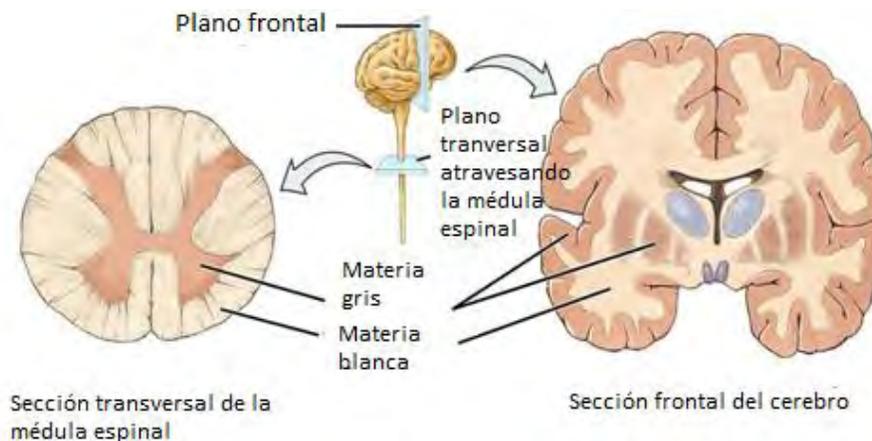
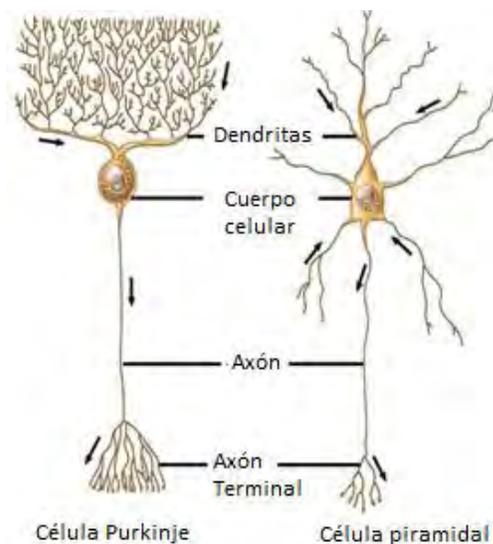


Figura 1.4 El sistema nervioso central consiste en sustancia gris y blanca. Adaptada de^[18].

motoras y secretorias se combinan en una célula individual tanto en organismos unicelulares como en los animales multicelulares más simples. En los demás grupos de animales, las células son capaces de comunicarse, por lo que la recepción de un estímulo por una célula puede resultar en actividad motora o secretoria de otras células. Las células especializadas conocidas como neuronas (Figura 1.6) sirven para transferir información con rapidez de una parte del cuerpo del animal a otra. Todas las neuronas de un organismo, junto con la glia, constituyen el sistema nervioso. Para llevar a cabo su función de comunicación, una neurona presenta dos actividades diferentes, pero acopladas: la conducción de una señal desde una parte de la célula a otra y la transmisión sináptica, que es la comunicación entre células adyacentes.

Un impulso es una onda de despolarización eléctrica que se propaga en la superficie de la membrana de la neurona. Un estímulo aplicado a una parte de la neurona inicia un impulso que se difunde a las demás partes de la célula. Por lo común, las neuronas tienen procesos citoplasmáticos largos, conocidos como neuritas. Los extremos de las neuritas se llaman terminaciones sinápticas y los contactos de célula a célula se conocen como sinapsis. Las neuritas en los animales superiores con frecuencia se especializan para formar dendritas y axones, procesos que se caracterizan por conducir impulsos hacia el cuerpo celular y desde él, respectivamente. La llegada de un impulso a una terminación activa la transmisión sináptica. Este hecho por lo común incluye la liberación de un compuesto químico desde el citoplasma neuronal que provoca el mismo tipo de respuesta en la célula postsináptica.



En algunas sinapsis, las dos células se acoplan en forma eléctrica. Existe otro tipo de neurona (células neurosecretoras) que descarga sus productos químicos hacia la circulación sanguínea y por lo tanto influye en partes distales del cuerpo, [6].

Figura 1.5 Elementos constitutivos de células nerviosas. Células Purkinje, tienen forma de canasta y se localizan en el cerebelo. Células piramidales, se localizan en la corteza cerebral. Las flechas indican la dirección por la que viaja el impulso eléctrico. Adaptada de [18].

1.2.3. La neurona

La barrera hematoencefálica es la interfaz celular entre la sangre y el sistema nervioso central. Mantiene el fluido intersticial que garantiza una óptima funcionalidad de las neuronas. Las neuronas pueden ser de tres tipos, dependiendo de la dirección en la que transmiten los impulsos: neuronas sensitivas, interneuronas y neuronas motoras. Las neuronas sensitivas también llamadas neuronas aferentes transmiten impulsos hacia la médula espinal y el encéfalo desde todas las partes del cuerpo. Las interneuronas también llamadas neuronas conectoras conducen impulsos desde las neuronas sensitivas hasta las motoras. Las neuronas motoras o neuronas eferentes transmiten impulsos en dirección desde el encéfalo y la médula espinal hacia la periferia; estos impulsos se dirigen principalmente hacia el músculo (Figura 1.8).

La comunicación del sistema nervioso se da a través de la sinapsis que permite a las neuronas formar una red de circuitos neuronales. La sinapsis es una unión intercelular donde se lleva a cabo la transmisión del impulso eléctrico entre la membrana plasmática de las terminal presináptica de una neurona emisora y la terminal postsináptica de una neurona receptora; durante este proceso se liberan sustancias químicas denominadas neurotransmisores, transformando así una señal eléctrica en otra química. La actividad neuronal también depende de las concentraciones iónicas presentes en el espacio intra y extra celular. En particular, la concentración de potasio extracelular incrementa con la actividad neuronal intensa, lo cual resulta en un aumento en la excitabilidad neuronal. Durante la transición del estado interictal al ictal, la concentración extracelular de potasio se incrementa de un nivel basal de 3 mM hasta un valor de 10-12 mM^[19]. Una vez liberado de las neuronas, el potasio debe retirarse del espacio extracelular. Se piensa que su depuración ocurre por difusión, recaptura activa por neuronas y glía o recaptura pasiva por parte de la glía.

1.3 Sistema límbico: hipocampo y amígdala

El sistema límbico comprende el lóbulo límbico, formación hipocámpica, giro dentado, circunvoluciones del cuerpo calloso, la amígdala, la corteza olfatoria, tálamo, hipotálamo y núcleos subcorticales asociados: amigdalino, mamilar, septales, núcleo anterior del tálamo y del hipotálamo y

parte de los núcleos basales principalmente los núcleos o cuerpos estriados. Los componentes más grandes del lóbulo son el hipocampo, giro parahipocampal y giro del cíngulo. El sistema límbico participa en la memoria, aprendizaje y en las respuestas viscerales y motoras relacionadas con la defensa y la reproducción. En la epilepsia del lóbulo temporal, se encuentra alterado el metabolismo glucolítico de estructuras límbicas y con ello su función fisiológica en los procesos ya mencionados. Aunque, la epilepsia no afecta directamente a todos los componentes que constituyen el sistema límbico, la alteración fisiológica en uno de ellos desencadena una respuesta anormal en todo el sistema límbico, ya que, se encuentran intrínsecamente conectados entre sí. La siguiente Figura muestra esquemáticamente las conexiones que suceden dentro del sistema límbico.

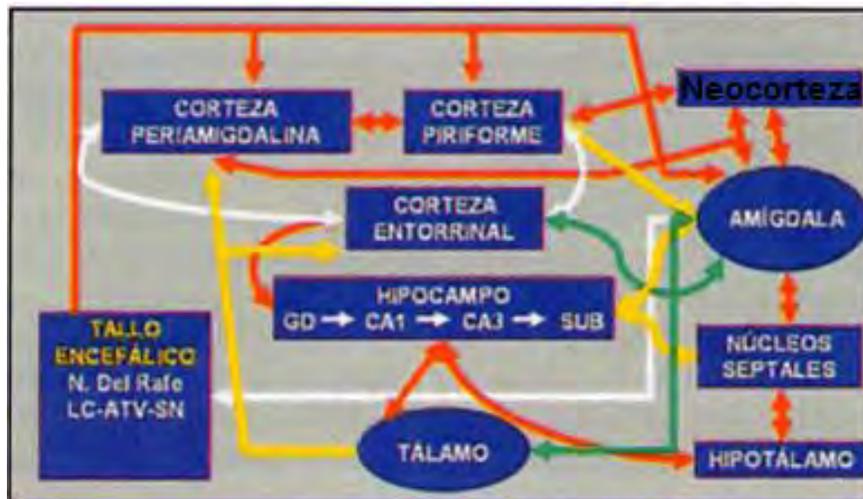


Figura 1.6 Esquema de las conexiones intralímbicas. GD: giro dentado; SUB: subiculum; SN: sustancia nigra.

Adaptada de [20].

Estudios experimentales y clínicos reportados en la literatura, han demostrado que el sistema límbico en especial, la amígdala, es responsable de fuertes reacciones afectivas como el miedo y la cólera y las emociones relacionadas con conducta sexual. Algunos cambios en la función visceral y motora somática acompañan a estas emociones y está demostrado que la estimulación eléctrica de la amígdala produce respuestas similares. La estimulación eléctrica de la amígdala en seres humanos induce sentimientos de miedo o cólera.

CUERPOS ESTRIADOS.

El cuerpo o núcleo estriado se ubica por fuera del tálamo y representa uno de los principales componentes de los ganglios basales; siendo además la vía principal de entrada de información hacia

éstos. El cuerpo estriado se encuentra dividido por una banda de sustancia blanca (fibras nerviosas) formando dos sectores: el núcleo caudado y el núcleo lenticular el cual a su vez está conformado por el putamen y el globo pálido. Los cuerpos estriados también reciben información de fibras aferentes desde diferentes áreas de la corteza cerebral, tálamo, subtálamo y tronco encefálico. La función del cuerpo estriado está vinculada con el control del movimiento muscular, emociones y cognición.

1.3.1. Formación hipocámpica

La formación hipocámpica tiene importancia primordial, ya que, es un centro de memoria y aprendizaje. Está constituido por el hipocampo, giro dentado y la mayor parte del giro parahipocámpal. Al lado de la formación hipocámpica se encuentra el núcleo amigdalino, que tiene que ver con las respuestas motoras relacionadas con el instinto. Además tiene relación con la conducta y emociones; y con el sistema límbico.

El hipocampo es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica al interior del lóbulo temporal. Es de color amarillo claro, debido a que está cubierto por una capa de sustancia blanca llamada *álveo*, que corresponde a fibras mielinizadas, es decir, a los axones de las células piramidales del hipocampo. El ***hipocampo es la estructura cerebral más comúnmente involucrada en epilepsia del lóbulo temporal*** tanto en humanos como en modelos de roedores^[21].

Organización intrínseca y circuitos: el ***hipocampo***, visto en corte coronal, tiene tres áreas o sectores: CA1, CA2 y CA3. La nomenclatura CA, es por *Cuerno de Ammón*. Se compone de dos tipos celulares principales: las células piramidales y células granulosas, las cuales se encuentran distribuidas en tres capas discretas, con aferencias y eferencias altamente organizadas en forma laminar denominadas lámina molecular que se compone de axones y dendritas, se ubica en el centro de la formación hipocámpica, alrededor del surco del hipocampo; lámina de células piramidales que se compone por neuronas piramidales, las cuales son las células principales del hipocampo y la más abundante en CA1, CA2 y CA3, además son las primeras en verse afectadas cuando existen alteraciones que producen pérdida de la memoria y funciones intelectuales; y lámina polimórfica compuesta de axones, dendritas e interneuronas^[6].

La distribución de éstas células del hipocampo forman vías de comunicación entre sí formando una red interna en el que cada sector se proyecta al siguiente, de esta manera, la información fluye hacia lo largo del hipocampo mediante diferentes vías tales como: circuito trisináptico, vía entre la corteza entorrinal, CA1 y subiculum, vía entre el hipocampo y septum. Sin embargo, la principal vía a través del hipocampo es el circuito trisináptico que se compone de las células del giro dentado, CA3 y CA1 y sus interconexiones. Donde la primera conexión sináptica está formada entre la corteza entorrinal y el giro dentado. De aquí se proyecta a las células piramidales de CA3 y son de aferencias glutamatérgicas. La segunda conexión es entre el giro dentado y CA3. En la tercera conexión, los axones de CA3 forman una conexión con las dendritas de CA1. Mediante tales conexiones, le permiten sincronizar la excitación e inhibición de las células piramidales. La mayoría de las neuronas septales se proyectan principalmente al hipocampo ipsilateral y tienen fibras colinérgicas y gabaérgicas. Las aferencias colinérgicas llevan impulsos modulatorios a las células piramidales y a las interneuronas gabaérgicas del hipocampo. Las neuronas gabaérgicas se proyectan hacia las interneuronas gabaérgicas del hipocampo y esto produce una desinhibición masiva de las células piramidales ^[22].

Función del hipocampo.

La función del hipocampo está relacionada con la memoria. Este hecho se ha confirmado ampliamente de investigaciones y estudios en animales, por ejemplo, la eliminación de ambos hipocampos, para inhibir las crisis epilépticas, origina pérdida de la memoria a corto plazo ^[22].

1.4. Comunicación entre el sistema nervioso central y el tejido muscular

Las neuronas transfieren información de una parte del cuerpo a otra mediante la sinapsis. Los músculos están inervados por neuronas motoras. Esto es, para que un músculo pueda contraerse y mover un hueso debe ser estimulado primero por impulsos nerviosos. Las células musculares son estimuladas por las fibras de una célula nerviosa llamada neurona motora. El punto de contacto entre la terminación nerviosa y la fibra muscular se conoce como unión neuromuscular, donde la neurona motora libera sustancias químicas (neurotransmisores) en respuesta al estímulo nervioso. Tales sustancias químicas generan después una serie de acontecimientos dentro de la célula muscular que conducen a su contracción o acortamiento (ver Figura 1.8). Una sola neurona motora establece su

contacto con un promedio de 150 fibras musculares, esto significa que la activación de una neurona provoca la contracción simultánea de unas 150 fibras musculares. En el laboratorio es posible aislar una sola fibra muscular y someterla a estímulos de intensidad variable para estudiar su respuesta. Entre los factores que influyen en la fuerza muscular, se encuentran principalmente, el buen funcionamiento del sistema nervioso central entre otros. Existen trastornos del sistema nervioso que desconectan los impulsos hacia ciertos músculos esqueléticos y conducen así a la parálisis.

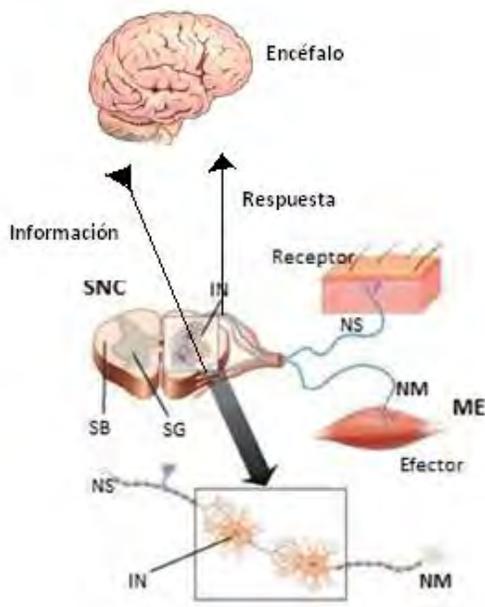


Figura 1.7 Esquema de la comunicación entre el sistema nervioso y el tejido muscular. El músculo esquelético (**ME**) se contrae bajo el control del sistema nervioso central (**SNC**). **NS**: neurona sensitiva, **IN**: interneurona, **NM**: neurona motora, **SB**: sustancia blanca, **SG**: sustancia gris. Adaptada de ^[23].

1.5. Tejido muscular

El sistema muscular está compuesto por dos estructuras, los tendones y los músculos. Los tendones son las estructuras que mantienen al músculo unido con el sistema óseo y forman parte de los elementos elásticos. Cuando el músculo se contrae, el tendón transmite esa fuerza para que se produzca el movimiento. Los tendones son estructuras resistentes y sin capacidad para contraerse. Las propiedades intrínsecas de los músculos, contractilidad y elasticidad, son las que hacen posible la generación de fuerza y movimiento del tejido muscular. Además, el tejido muscular es el responsable de mantener la postura, el conducto a través del cual se expresa el sistema nervioso y principal reservorio de proteínas estructurales. El movimiento se produce por la capacidad de acortamiento o contracción de las células musculares. Éstas se acortan mediante conversión de energía química en mecánica, lo que causa el movimiento.

1.5.1. Músculo esquelético

De los tres tipos de músculo (liso, cardíaco y esquelético) que posee el ser humano, el esquelético es el más abundante^[24]. Representa del 45 al 50% del peso corporal de un humano; y el 75% de éste se concentra en las extremidades del humano^[25].

El músculo esquelético (ME) también es conocido como estriado, denominado así por su apariencia microscópica. Es un tipo de músculo que desarrolla un esfuerzo sostenido y generalmente voluntario. Su función principal es mecánica, por lo que se encarga del movimiento y de la postura del organismo. Este desplazamiento es posible mediante los elementos activos, los cuales son los encargados de transformar la energía química en energía mecánica o fuerza.

Célula muscular

La célula del músculo son células excitables, que se contraen como respuesta a un estímulo que, fisiológicamente, les llega por vía nerviosa; se denominan fibra muscular y existen tres tipos: estriadas², cardíacas³ y lisas⁴. En su interior contienen organelas, mitocondrias, glucógeno, ácidos grasos, aminoácidos, enzimas y minerales. Además poseen una proteína, la mioglobina, que actúa en el transporte y reserva de oxígeno dentro del músculo. Las células del músculo esquelético (fibra muscular estriada), son multinucleadas poseen formas cilíndricas con diámetros entre 10 a 100 μm y alargadas hasta 35 cm de longitud en el humano^[26].

Estructura del músculo esquelético (ME)

²Fibras musculares estriadas: poseen varios núcleos y bandas transversales dándole un aspecto estriado. Los músculos esqueléticos están formados por fibras musculares estriadas que se contraen rápidamente y de forma voluntaria.

³Fibras musculares cardíacas: poseen un aspecto alargado y estriaciones transversales, con solo uno o dos núcleos de ubicación central. Están presentes en las paredes del corazón y su movimiento es involuntario.

⁴Fibra muscular lisas: poseen sólo un núcleo y no presenta estriaciones. Las fibras musculares lisas están en las paredes del tracto digestivo favoreciendo el peristaltismo, en el tracto respiratorio, urogenital y en los capilares sanguíneos y linfáticos.

Está formado principalmente por fibras musculares estriadas (ó elementos activos) y tejido conectivo (ó elementos pasivos). Se encuentra altamente vascularizado e inervado. Cerca del 80% de la masa muscular son fibras musculares. El tejido conectivo ofrece soporte estructural envolviendo los diferentes elementos de un músculo estriado, trabaja como tejido de intercambio permitiendo la nutrición de otros tejidos y órganos. Estructuralmente se compone por una matriz fibrosa cuyos elementos lo conforman principalmente, colágena, elastina, epimisio, perimisio y endomisio. Siendo la colágena la formación fibrilar y proteína más abundante en el cuerpo humano, se encuentra presente en los tejidos conjuntivos de carácter fibroso como los tendones, ligamentos, la dermis de la piel y el hueso. La elastina le confiere propiedades mecánicas de elasticidad al músculo. Una fascia de tejido conectivo fibroso, el epimisio, envuelve el músculo, el cual se compone de muchos haces o fascículos. Los fascículos a su vez, están cubiertos por una vaina de tejido conectivo denso, el perimisio. En la Figura 1.9, se muestra la conformación estructural macroscópica del musculo esquelético (ME).

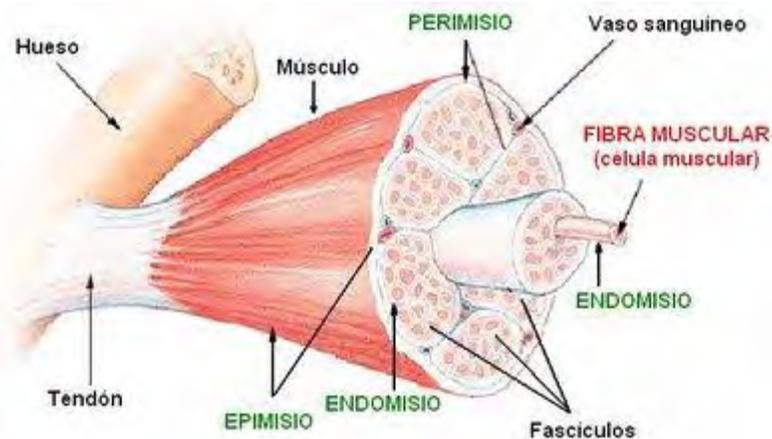


Figura 1.8 Dibujo esquemático de la organización estructural del músculo esquelético (ME). Todo el músculo está rodeado por vainas o fascias de tejido conectivo; el Epimisio rodea el músculo y se extiende dentro del mismo formando el Perimisio, que a su vez divide al músculo en una serie de fascículos, cada uno de los cuales contiene varias fibras musculares. Dentro del fascículo, las fibras musculares están separadas unas de otras por el Endomisio. Tomada de ^[27].

Estructura microscópica

La estructura microscópica de la fibra muscular proporciona el modo de funcionamiento del músculo, ya que, a nivel funcional, las fibras musculares se agrupan formando unidades motoras⁵, que se contraen

⁵ Unidades motoras: se constituye de una neurona motora más todas las fibras musculares que inerva.

al unísono, cuando la célula nerviosa envía el impulso. Las fibras musculares se agrupan entre sí para dar origen a una organización conocida como fascículo. Cada fascículo contiene numerosas fibras y está sujeto a otro fascículo mediante tejido conectivo. La fibra muscular se compone de miofibrillas que son arreglos longitudinales de miofilamentos gruesos y finos de proteínas, miosina y actina, respectivamente. Son éstos los que permiten la contracción del músculo ante estímulos eléctricos o químicos. Estructuralmente, una fibra muscular es un arreglo longitudinal de unidades contráctiles llamadas sarcómeros. A la membrana celular de la fibra muscular se le denomina sarcolema, el cual está asociado con la parte terminal de la fibra mediante proteínas de colágeno que se agrupan para dar lugar a los tendones.

La distribución de las proteínas que constituyen la fibra muscular, miosina y actina, es lo que da origen a estructuras que se repiten denominadas sarcómeros. Cada sarcómero está formado por un filamento de miosina y dos filamentos de actina superpuestos en arreglos longitudinales. Además, dentro de cada sarcómero se observan diferentes estructuras denominadas *bandas* y *líneas*. En la *banda I*, se encuentran los miofilamentos delgados de actina y se visualiza mediante tinciones como la región más clara. En la *banda A*, se encuentran los miofilamentos gruesos de miosina y fragmentos de actina que se introducen entre los de miosina y se visualiza como el área más oscura. La *banda H*, está conformada únicamente por miofilamentos de miosina. La *línea M*, representa el punto de unión de los miofilamentos de miosina. Y, la *línea Z*, es la estructura limitante entre dos sarcómeros. Cuando se produce el estímulo, las miofibrillas se acortan. En consecuencia, las *bandas H* y las *bandas I* se acortan. De esta forma los sarcómeros y toda la estructura muscular se acorta, generando el movimiento. Finalmente, cuando sobreviene la relajación, los miofilamentos se separan y las fibras se alargan. En la Figura 1.10, se muestra un esquema completo de la estructura macro y microscópica de la conformación del musculo esquelético.

Por otro lado, las miofibrillas de cada fibra muscular están separadas y suspendidas dentro de un líquido que contiene grandes cantidades de potasio, magnesio, fosfato y enzimas, llamado sarcoplasma. Y, en el sarcoplasma existe un extenso y elaborado sistema de membranas en forma de red denominado **Retículo Sarcoplásmico**. Este organelo es el principal reservorio de calcio y tiene una participación fundamental en la contracción y relajación muscular. En el *retículo sarcoplásmico*, es en donde se encuentran las proteínas que inician el proceso de contracción al dejar salir el calcio (canales de calcio, receptor de rianodina). Mientras que, el proceso de relajación lo realiza la enzima **SERCA**, que es una ATPasa de calcio, conocida como el factor relajante del músculo^[28]. La función de

SERCA consiste en secuestrar el calcio liberado por el *retículo sarcoplásmico* para regresarlo nuevamente a la célula. Este proceso es necesario para que se vuelva a producir otra contracción, por lo que, en casos normales, la eficiencia de consecutivas contracciones dependerán de la duración empleada por *SERCA* para recapturar el calcio liberado.



Figura 1.9 Estructura y composición del músculo esquelético - célula muscular - sarcómero. Tomada de [27].

Tipos de fibras musculares estriadas

La función del músculo también va a depender de las propiedades de sus fibras. La mayoría de los músculos esqueléticos de los mamíferos están constituidos por una población heterogénea y característica de fibras de diferentes tipos. Se conocen principalmente tres tipos: I, II e intermedias. Se clasifican así de acuerdo a criterios de su metabolismo y función. Las fibras de tipo I, también denominadas lentas o rojas, tienen un metabolismo oxidativo y gran contenido de mioglobina, lo que permite generar contracciones potentes, lentas y duraderas; mientras que las fibras de tipo II, también denominadas rápidas tienen un metabolismo glucolítico y se especializan en movimientos rápidos y precisos. En una unidad motora, todas las fibras son del mismo tipo lento o rápido, y por tanto, puede hablarse también de unidades motoras lentas y rápidas. Sin embargo, los músculos contienen fibras o

unidades motoras de ambos tipos, pero de acuerdo con la función principal del músculo en cuestión, existe mayor proporción de una de ellas y se pueden denominar así, como músculos lentos o rápidos.

1.5.2. Mecánica de la contracción muscular

Desde un punto de vista mecánico, la característica más importante del músculo esquelético es su capacidad de acortarse, ejerciendo así fuerza de tracción. Es gracias a esta fuerza que los animales pueden realizar movimientos. En el caso de los vertebrados estos movimientos se efectúan mediante una estructura mecánica compuesta por unidades contráctiles (los músculos) que ejercen fuerza de tracción mediante cuerdas (los tendones) sobre un sistema de palancas articuladas (los huesos) ^[29].

En otras palabras, la actividad del músculo se pone de manifiesto por un acortamiento, por el desarrollo de fuerza de tracción o por ambas cosas. Este proceso recibe el nombre de contracción muscular, y el pasaje del estado de actividad al de reposo se llama relajación.

Como ya se mencionó, la subunidad funcional contráctil básica es el sarcómero que se compone de miofilamentos: miosina y actina. La superposición de estos miofilamentos y determinadas fuentes de energía es lo que da origen a la contracción. Éste mecanismo se debe al desplazamiento de los miofilamentos superponiéndose lo que implica que el músculo realiza trabajo y por lo tanto es necesaria cierta cantidad de energía. Esta energía la aporta el ATP, así cuanto mayor sea la cantidad de trabajo que realiza el músculo, mayor será la cantidad de ATP que se hidroliza en ADP y Fosfato. La concentración de ATP en la fibra muscular es alrededor de 4 mM y es suficiente para mantener la contracción durante 1 a 2 segundos. El ATP se hidroliza para formar ADP, que transfiere la energía de la molécula de ATP al mecanismo contráctil de la fibra muscular. El ADP se vuelve a fosforilar en fracciones de segundo, lo que permite que el músculo sostenga su contracción. Las diferentes formas de energía implicadas (calor, energía química, etc.), y el estudio de ellas son el objeto de la termodinámica muscular. En el músculo, la energía química se transforma parcialmente en trabajo y parte es degradada en forma de calor.

1.5.2.1. Descripción de la contracción

Es posible hacer una descripción de la contracción de músculo esquelético mediante la explicación de dos fenómenos fisiológicos mecánicos que produce el organismo de manera voluntaria y que es

posible reproducir en el laboratorio, sacudida simple y tétano, a continuación se describen.

Si se aísla un músculo y se coloca mediante un arreglo experimental –como el que se muestra en la Figura 1.10 A; Figura 3.8 B de la sección 3.5.1 y Figura 4.1 de la sección 4.1- de modo que uno de sus extremos este fijo y el otro extremo pueda realizar pequeños desplazamientos colocado sobre una aguja inscriptora o dispositivo electrónico (transductor), se obtendría como respuesta una gráfica del acortamiento o diferencia de potencial en función del tiempo (Figura 1.10 B).

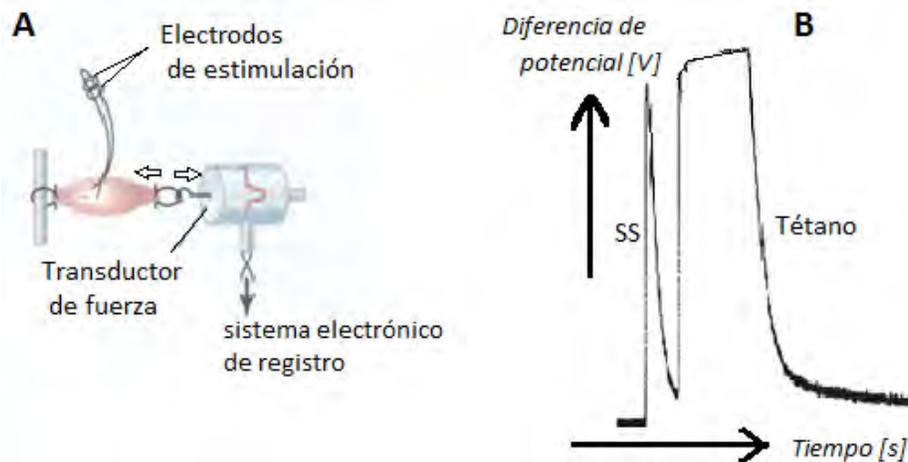


Figura 1.10 Registro gráfico del proceso de la contracción isotónica del músculo esquelético. **A)** Esquema de un arreglo experimental para obtener propiamente la contracción. **B)** Diagrama de la sacudida simple (SS) y de un tétano, que resultan del proceso mencionado.

Si por medio de electrodos se estimula al músculo con una breve descarga eléctrica, el músculo se contrae bruscamente y se relaja de inmediato. Este proceso recibe el nombre de **sacudida simple** (SS) y la curva que se registra por el sistema electrónico se puede representar matemáticamente por una Función Delta de Dirac, Figura 1.10 B. En una *sacudida simple*, el acortamiento se realiza en un tiempo más breve que el de la relajación, alrededor de 10 y 200 milisegundos, según el músculo en cuestión y las condiciones experimentales, especialmente la temperatura^[29]. En el caso en el que los extremos del músculo estén fijos, el músculo no se acortaría pero su actividad también se pondría de manifiesto por un aumento de tensión, magnitud que se puede registrar mediante un transductor obteniendo una curva similar a la mostrada en la Figura 1.10 B.

En el caso de un **tétano**, si antes de que se produzca la relajación completa se aplica un segundo estímulo, se produce una nueva contracción, y si el estímulo se repite a intervalos iguales y son lo

suficientemente frecuentes, la relajación no tiene tiempo de producirse, observándose una curva en meseta como se aprecia en la Figura 1.10 B. Este tipo de **contracción sostenida** recibe el nombre de **contracción tetánica** o simplemente *tétano*.

1.5.2.2. Tipos de contracción muscular

Como ya mencionamos, tanto el acortamiento como el desarrollo de tensión son el resultado de la actividad muscular, tales manifestaciones de la contracción pueden combinarse de distintas maneras, dando lugar a diferentes tipos de contracción, de los cuales describiremos a continuación las dos clasificaciones fisiológicas más conocidas.

- a) **Contracción isométrica:** se presenta cuando un músculo se contrae sin variar su longitud. Para lograr una contracción de este tipo es necesario sujetar los dos extremos del músculo a soportes fijos. Una vez sujeto, el músculo tendrá una longitud determinada y estará sometido a una tensión inicial. Al contraerse el músculo, dado que sus extremos se hallan fijos, su longitud no cambia y sólo varía la tensión. Es importante aclarar que no existe en la realidad la contracción absolutamente isométrica, pues unas partes del músculo pueden acortarse a expensas del alargamiento de otras, tales como las estructuras elásticas del tejido conectivo que liga y sostiene las fibras musculares y forma los tendones.
- b) **Contracción isotónica:** (iso, constante; tónico, fuerza) se presenta cuando el músculo al contraerse varía su longitud debido a un acortamiento de las fibras musculares pero mantiene constante la fuerza ejercida durante toda la contracción. Para lograr un proceso de este tipo, un extremo del músculo se sujeta a un soporte fijo, y en el otro, se ata un hilo que pasa por una polea y sostiene una pesa. Estando el músculo en reposo, la tensión que lo extiende es el peso de la pesa, y le corresponde una longitud inicial. De esta forma, al contraerse el músculo disminuye la longitud inicial y eleva la pesa, ejerciendo constantemente la misma fuerza. También es posible colocar el extremo móvil del músculo sobre la aguja de un dispositivo electrónico, éste va a censar el acortamiento del músculo traduciendo los cortos desplazamientos (señal mecánica) en una modificación del potencial (señal eléctrica); en la Figura 1.10. se ilustra una contracción isotónica.

1.6. Modelos experimentales de epilepsia

Para desarrollar un modelo experimental de epilepsia, generalmente se eligen mamíferos que presenten manifestaciones eléctricas y conductuales similares a los de una epilepsia humana. El tipo de epilepsia más frecuente es la del lóbulo temporal^[30], sus principales características son: la localización de un foco epiléptico en el sistema límbico, generalmente en el hipocampo, corteza entorrinal y amígdala^[31]; un intervalo de tiempo en donde no hay crisis epilépticas y al cual se le llama epileptogénesis y una alta incidencia de alteraciones por muerte neuronal, secundarias a las crisis como la esclerosis hipocampal o mesial^[32]. La mayor parte de éstas características pueden ser reproducidas en modelos animales de ELT crónico, como el *kindling* y el *status epilepticus*.

Estos son los dos modelos más usados para estudiar la Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELT) en animales de laboratorio. Aunque ambos inducen un estado epiléptico crónico, el proceso de epileptogénesis difiere sustancialmente, así como diferentes aspectos fisiopatológicos^[33]. El fenómeno de *kindling*, fue descubierto por Goddard en los años sesenta y consiste en la estimulación repetida y periódica de descargas eléctricas en estructuras del sistema límbico (generalmente de la amígdala, la corteza o el hipocampo), que da lugar a la aparición de crisis epilépticas secundariamente generalizadas. Durante una fase inicial, la estimulación eléctrica induce descargas focales con escasas manifestación clínica. Sin embargo, en sesiones consecutivas progresa a crisis tónico clónicas secundariamente generalizadas^[34]. Por lo que, en este modelo las crisis espontáneas no se desarrollan a no ser que se haya realizado un gran número de estimulaciones. Este modelo se usa en la evaluación de fármacos antiepilépticos, pues se ha demostrado que los compuestos que son efectivos en el tratamiento de la ELT en el hombre, inhiben las crisis inducidas por *kindling*,^[35]. En el **modelo de *status epilepticus***, se utilizan diferentes agentes convulsionantes (inyección sistémica o intracerebral), como la **pilocarpina** y el ácido kaínico, para inducir una fase aguda de estado epiléptico caracterizado por la **presencia de crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas de origen límbico** que no ceden. Una vez superada esta fase, que debe interrumpirse farmacológicamente, los animales desarrollan un período libre de crisis –fase latente-, seguida de la emergencia brusca de crisis recurrentes espontáneas –fase crónica- semanas más tarde,^[36,37]. En contraste con el modelo de *kindling*, las ratas sometidas al **modelo de el *status epilepticus***, presentan alteraciones anatómicas en el hipocampo, como la esclerosis hipocampal,

similares a las descritas en la epilepsia humana, por lo que éste constituye el **modelo más aceptado de ELT**^[33] para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de esta alteración neurológica.

1.6.1. Modelo de epilepsia de pilocarpina

El modelo de *status epilepticus* usando pilocarpina como agente convulsivante, ha sido ampliamente utilizado desde su primera descripción en la década de los ochentas por Turski y colaboradores^[80]. Las características más importantes de este modelo son: que la inducción del SE es más rápida que usando otras sustancias inductoras; la presencia de un período de latencia o epileptogénesis seguido de la aparición de crisis espontáneas y recurrentes (fase crónica)^[38,39]; la aparición de lesiones cerebrales por muerte neuronal y otras por una reorganización de la red neuronal^[40]; y reproduce las principales características que se observan en ELT en humanos como la esclerosis del hipocampo, la dispersión de células granulares, la brotación de fibras musgosas y un aumento en la liberación de glutamato. Por lo que, ha sido ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos básicos de epileptogénesis^[41]. Este modelo se basa en la administración sistémica de una inyección vía intraperitoneal de pilocarpina (350-380 mg/kg) en ratones de la cepa Wistar.

Pilocarpina

La pilocarpina es un alcaloide que se obtiene de las hojas de los arbustos *Pilocarpus*. Es un potente agonista colinérgico muscarínico, no-selectivo de los receptores muscarínicos con acción parasimpaticomimética⁶, ^[42]. Su fórmula química es $C_{11}H_{16}N_2O_2$, su peso molecular es de 244.72 g/mol. El mecanismo de acción de la pilocarpina involucra dos vías: activando receptores muscarínicos en los órganos efectores en forma directa; e interactuando con receptores muscarínicos presinápticos en las terminales nerviosas inhibiendo la liberación de neurotransmisores, de esta manera modifica indirectamente el funcionamiento del órgano^[43]. Los receptores muscarínicos, además de estar localizados en las células efectoras, pueden estar localizados sobre la terminación nerviosa y actúan como autorreceptores o pueden estar presentes en interneuronas GABAérgicas inhibiendo la liberación de Acetilcolina desde la terminación nerviosa^[44]; en ambos casos tienen un efecto inhibitorio de la

⁶ Parasimpaticomimética: mimetizan la acción de la acetilcolina sobre receptores muscarínicos.

respuesta celular. La administración sistémica de pilocarpina en ratas, induce un estado de convulsiones continuas que se convierten en secundariamente generalizadas hasta evolucionar a un SE que dura hasta 24 horas, conocido como fase o período agudo. La fase aguda es seguida por un período sin cambios en el comportamiento. La fase crónica se caracteriza por la aparición de convulsiones espontáneas^[45]. Por tanto, la administración de dicho fármaco promueve cambios secuenciales de comportamiento electroencefalográficos que se pueden dividir en tres períodos distintos:

- (a) Un período agudo que se fue desarrollando progresivamente en el SE límbico y que dura 24 horas.
- (b) Un período de silencio con una normalización progresiva del electroencefalograma y comportamiento que varía de 4 a 44 días.
- (c) Un período crónico con convulsiones recurrentes espontáneas. Estos ataques espontáneos recurrentes ocurren con una frecuencia de 3 a 5 veces por semana y sus principales características se asemejan a las crisis parciales complejas en humanos.

Capítulo 2

Planteamiento del problema

Se conocen las áreas cerebrales afectadas del sistema nervioso central en modelos experimentales de epilepsia y, que el músculo esquelético se expresa a través de este órgano. Sin embargo, se desconoce el mecanismo fisiopatológico de la presentación de epilepsia así como la constancia del daño o cambio metabólico cerebral durante períodos interictales en un estadio avanzado de esta alteración y, el posible efecto que pudiera tener sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.

2.1. Objetivos

Objetivo General.

Determinar el daño inducido por la pilocarpina en el sistema nervioso y el efecto de la epilepsia sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.

Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto de la pilocarpina directamente sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético aislado.

2. Analizar mediante la técnica de tomografía por emisión de positrones el daño en el sistema nervioso de la rata epiléptica inducida por pilocarpina en un estadio crónico.
3. Determinar el efecto de la epilepsia sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético.

2.2. Hipótesis

En el modelo epiléptico inducido por pilocarpina, el síntoma motor principal es la convulsión tónico-clónica. Sin embargo, al ser la epilepsia un proceso crónico, proponemos la existencia de estimulación constante durante el período interictal, por lo que esperamos encontrar un cambio en las propiedades mecánicas del músculo esquelético.

Capítulo 3

Técnicas

En las siguientes secciones se describirán las bases teóricas de las técnicas empleadas, así como la caracterización del equipo usado y las razones fisiológicas de usar determinado radiofármaco para los estudios PET; información basada principalmente en algunos apartados de los libros: *Physics in Nuclear Medicine*, Cherry et al., 2003; *MOLECULAR IMAGING Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Vallabhajosula, 2009; *PET y PET/CT en oncología*, Altamirano J., et al., 2005; *PET Physics, Instrumentation, and Scanners*, Michael E. Phelps, PhD, Springer 2006.

Se revisarán algunos artículos recientes de trabajos realizados sobre epilepsia enfocándonos en aquellos resultados reportados en la literatura en los que se hayan empleado las mismas técnicas que se describen aquí. Y, finalmente, las perspectivas que pretendemos lograr con este trabajo de tesis.

3.1. Tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones (o PET por sus siglas en inglés), es una técnica de imagen para el diagnóstico clínico, pertenece a la medicina nuclear molecular y se caracteriza por ser no invasiva, y ofrece información metabólica y funcional del sujeto de estudio. En la Figura 3.1, se muestra un diagrama esquemático del funcionamiento de un escáner PET. Este proceso se inicia al inyectar por vía intravenosa un determinado radiofármaco con el objetivo de estudiar un determinado proceso fisiológico. El radionúclido unido al radiofármaco, sufre decaimiento radiactivo para emitir el exceso de protones. El positrón que es emitido como resultado del decaimiento, viaja a través del tejido perdiendo así energía cinética, éste recorre cortas distancias dentro del tejido hasta encontrarse con un electrón del medio para aniquilarse. De la aniquilación se producen dos fotones o rayos gamma que

salen del sujeto de estudio para ser registrados en coincidencia por el escáner PET; la información registrada se analiza y almacena en *sinogramas*. A los *sinogramas* se les aplican algoritmos matemáticos para obtener la imagen visualizada en el monitor del ordenador como se ilustra a continuación en la Figura. En los siguientes párrafos se describirá con mayor detalle el mecanismo físico de cada una de las partes que conforman el proceso PET.

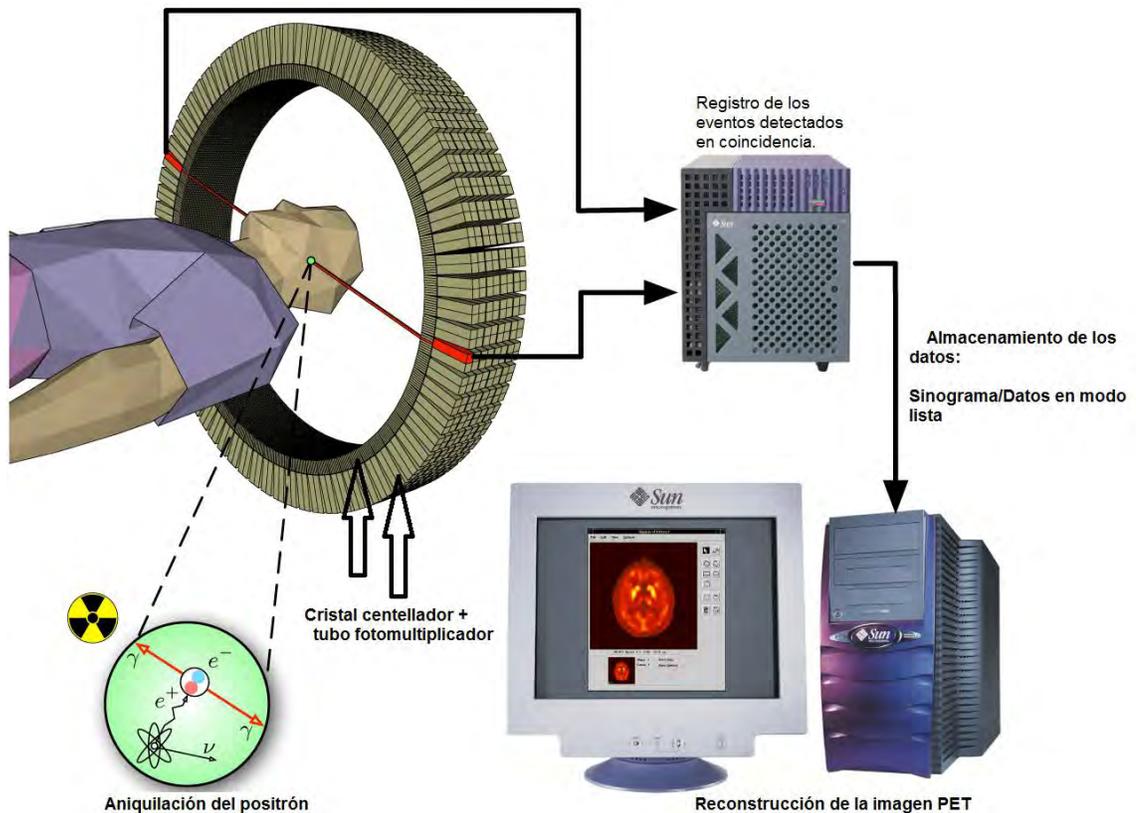


Figura 3.1 Diagrama esquemático del funcionamiento de un escáner PET. Explicación en el texto. Adaptada de [46].

En PET se emplean radionúclidos⁷ emisores de positrones. Éstos son producidos en un acelerador de partículas llamado ciclotrón mediante el bombardeo de materiales blanco, algunos ejemplos se describen en el Cuadro 3.1.

⁷ Radionúclido: son átomos con núcleos radiactivos, y existen de manera natural o artificial. Generalmente los primeros tienen vidas medias largas (>1000 años) y son elementos pesados y tóxicos (por ejemplo: Uranio, Actinio, Torio, Radio).

	^{11}C	^{13}N	^{15}O	^{18}F
Reacción	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$	$^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$
Blanco	Gas, $^{nat}\text{N}_2$	H_2O	Gas, $[^{15}\text{N}]\text{N}_2$	$[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$
Abundancia	99.6%	99.7%	0.4%	0.2%
Vida media	20 min	10 min	2 min	110 min

Cuadro 3.1 Reacción nuclear para producir los radionúclidos emisores de positrones usados en la técnica PET. Se bombardea el material blanco con iones de H^- que son acelerados mediante el ciclotrón^[47].

Existen ciertos materiales llamados **centelladores**, los cuales son empleados para detectar la radiación. Su funcionamiento se basa en registrar los destellos luminosos producidos durante la interacción de la radiación con éstos (centelladores); el material del que están constituidos puede ser orgánico o inorgánico, sólido, líquido y gas, y poseen determinadas propiedades físicas y químicas^[48] que los hacen idóneos para ser empleados como detectores.

El escáner PET es un sistema detector de radiación de fotones gamma que está constituido por un conjunto de bloques detectores, generalmente en forma de anillo, (Figura 3.2). Los bloques detectores son cristales **centelladores** acoplados a **tubos fotomultiplicadores**. Un tubo fotomultiplicador es un dispositivo que convierte radiación electromagnética en señal electrónica. Esta constituido por un fotocátodo, varios dinodos y un ánodo, como se ilustra en la Figura 3.3. Los tubos se construyen al vacío y tienen diversas formas geométricas con el fin de reducir el tiempo de tránsito de los electrones y para aumentar la ganancia. El fotocátodo debe tener una función de trabajo (energía necesaria para arrancar un electrón) suficientemente baja para ser sensible a fotones luminosos con un espesor adecuado para que absorba la luz pero no muy grueso para que no absorba los electrones que produce. Los dinodos deben ser del mismo material que el fotocátodo o de cobre-berilio, su ganancia depende del voltaje. La señal eléctrica de salida que se obtiene con este dispositivo puede ser como un pico de voltaje o un pulso, amplificada por un factor de 10^6 .

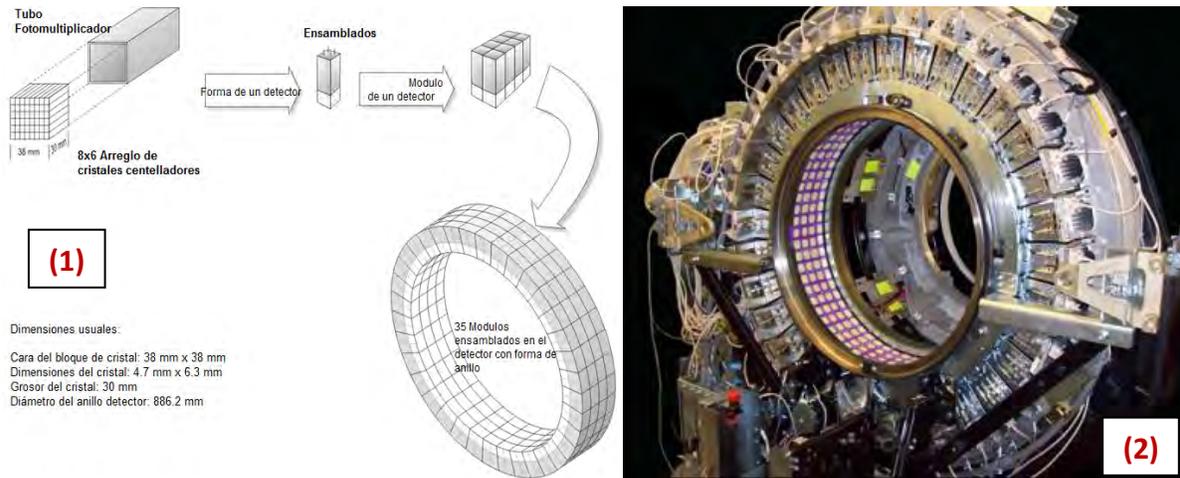


Figura 3.2 Interior de un escáner PET. (1) Dimensiones típicas de bloques detectores dentro de un escáner PET. Cristales centelladores acoplados a tubos fotomultiplicadores. (2) Imagen del anillo de un detector PET.

En general, un sistema detector está constituido por el centellador y el tubo fotomultiplicador; y el proceso físico de detección consiste de varias etapas:

1. La radiación gamma interacciona sobre el cristal centellador produciendo ionización y excitación, con lo cual la energía se transforma en fotones del visible. Es decir, el proceso de centelleo consiste en la absorción de una forma de energía (luz, calor, radiación ionizante, etc.) y su re emisión como radiación electromagnética (fotones).
2. Los fotones viajan hacia el tubo fotomultiplicador incidiendo sobre el fotocátodo, como se muestra en Figura 3.3., arrancando electrones por el efecto fotoeléctrico.
3. Estos electrones chocan con una serie de dinodos, y son acelerados por la diferencia de potencial entre cada dinodo, liberando más electrones en cada etapa hasta que finalmente llegan a los electrodos del ánodo para producir un pico de voltaje con amplitud suficiente para su manejo, conteo o medición.

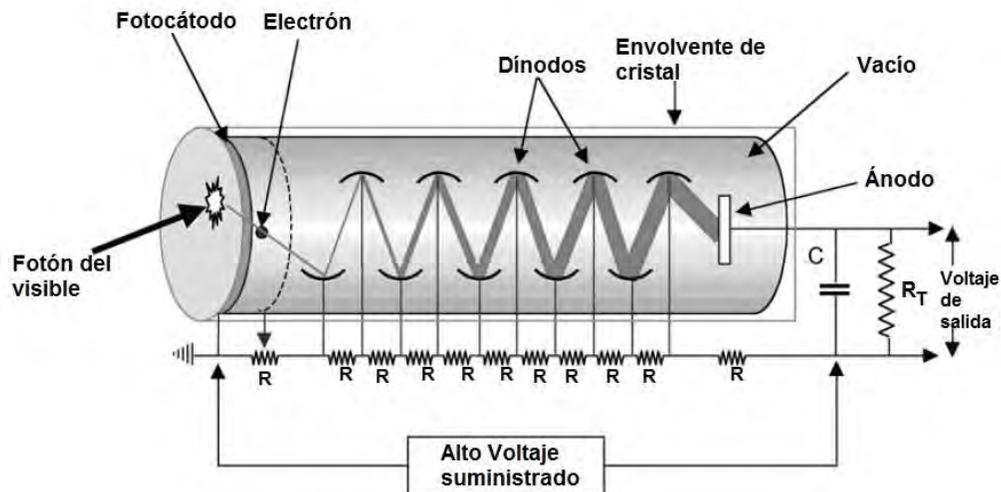


Figura 3.3 Diagrama esquemático de un tubo fotomultiplicador. Explicación en el texto. Adaptada de ^[46].

3.2. Bases teóricas de la tomografía por emisión de positrones (PET)

Los radionúclidos utilizados en la técnica PET, al ser átomos inestables decaen liberando éste exceso de energía para lograr la estabilidad nuclear mediante el proceso de transformación radiactiva denominado: decaimiento beta más (β^+). En el cual uno de los protones del núcleo atómico se transforma en neutrón, como resultado de la transformación se emite un positrón y un neutrino que salen del núcleo del átomo. Este proceso se favorece en núcleos con excesos de protones pero de número atómico bajo. De esta manera el positrón sale del núcleo junto con un neutrino, el positrón recorre distancias del orden de milímetros hasta que pierde la energía cinética e interacciona con un electrón y se aniquilan produciendo una reacción de aniquilación en la que se liberan dos fotones de 511 keV, colineales y en sentido opuesto, como se ilustra en la Figura 3.4.

Existen radionúclidos ricos en protones, que también pueden decaer por captura electrónica (el núcleo captura un electrón orbital convirtiendo un protón en un neutrón).

Los eventos⁸ detectados con la electrónica de coincidencia⁹ son corregidos por atenuación, registrados y discriminados de acuerdo a determinados parámetros físicos tales como la ventana de energía (típicamente de $\Delta E = [350,650] keV$), ventana temporal (típicamente de $\Delta t = 12 ns$), y si la

⁸ Evento: se produce cuando las señales eléctricas de direcciones opuestas provenientes del tubo fotomultiplicador se registran al mismo tiempo.

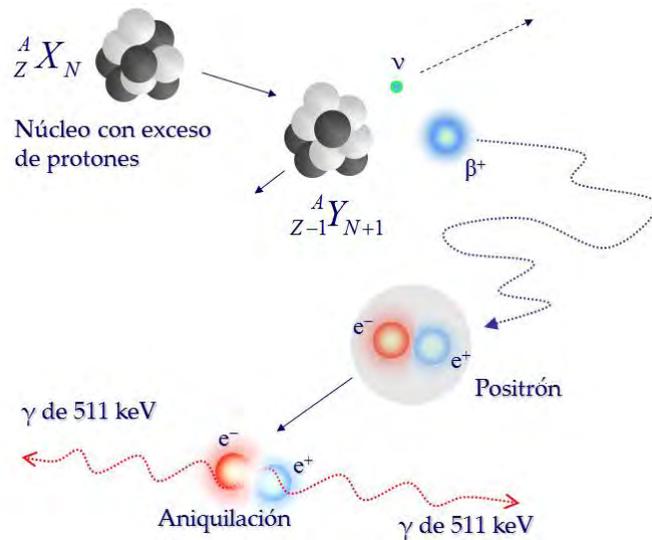


Figura 3.4 Proceso de decaimiento radiactivo que ocurre en los radionúclidos PET para emitir positrones. Decaimiento beta positivo: un protón se transforma en neutrón emitiendo un positrón y un neutrino. Explicación en el texto. Imagen cortesía del Dr. Héctor Alva Sánchez.

detección ocurrió a $180^\circ \pm 0.25^\circ$. Estos parámetros en conjunto también son conocidos como *detección en coincidencia* y se le asigna a cada evento una línea de respuesta (LOR, por sus siglas en inglés), ver Figura 3.5. Es decir, de la totalidad de los fotones provenientes del sujeto en estudio mediante el tomógrafo PET, se detectan y registran sólo si cumplen con los tres parámetros físicos ya mencionados.

Una vez registrados y almacenados en *sinogramas*, el algoritmo matemático más común para la reconstrucción de la imagen se conoce como retroproyección filtrada que parte de la Transformada de Radón, la cual define una proyección y utiliza Transformadas de Fourier para obtener la imagen del sujeto en estudio. El tomógrafo que empleamos para los estudios emplea éste algoritmo en la reconstrucción de las imágenes.

⁹ Electrónica de coincidencia: es un circuito eléctrico diseñado para detectar y registrar eventos. La señal es amplificada y enviada a un analizador de altura de pulsos. Si la altura del pulso es proporcional a un determinado rango de energía (ventana de energía), se genera un pulso lógico. Después se determinan si los pulsos producidos caen dentro de un rango de tiempo (ventana temporal) correspondiente a la longitud de dos pulsos.

En otras palabras, la reconstrucción de la imagen se basa en datos almacenados en función de sus coordenadas polares debido a la simetría axial (donde el plano $Z=0$) del sistema de detección, simetría que facilita la reconstrucción desde el punto de vista matemático. A la representación de los datos en dichas coordenadas, proyecciones, se le denomina *sinograma*. De esta manera, al finalizar una adquisición se obtiene la información sobre el número de aniquilaciones que tuvieron lugar para cada línea de respuesta entre dos detectores, y se van almacenando en forma de valores, con los cuales el sistema puede asignar al conjunto de la imagen, diferentes niveles de intensidad en función de la concentración del radiofármaco.

Por tanto, con este proceso de reconstrucción se logra tener en el volumen de la imagen una relación proporcional entre la intensidad de la señal en un voxel (área del pixel x espesor del corte) particular y la cantidad de radionúclido en el mismo. Obteniéndose una imagen con la distribución espacial del fármaco en el cuerpo del paciente.



Figura 3.5 Línea de respuesta (LOR) o detección en coincidencia que determina si el evento es registrado. Imagen cortesía del Dr. Héctor Alva Sánchez.

Calidad de la imagen PET

Existen varios factores como el tiempo muerto del detector, ruido (estadístico debido a fluctuaciones aleatorias en el decaimiento radiactivo, o ruido estructurado debido a artefactos producidos por el instrumento de medida), artefactos producidos por el movimiento del sujeto de estudio y los introducidos por el método de reconstrucción de imagen, que ocasionan una disminución en la calidad de los datos almacenados, generando así, una imagen con pobre resolución. Sin embargo, uno de los factores que afecta en gran medida la calidad de la imagen es la **resolución espacial** del escáner.

La *resolución espacial* es la habilidad del sistema para proveer información sobre objetos pequeños en la imagen; y, está principalmente condicionada por el tipo de material del que está hecho el cristal centellador debido a sus características físicas y químicas que presenta, tales como: índice de

refracción, densidad, resistencia mecánica y química, longitud de onda de la luz emitida, etc.

3.3. Radiofármacos

Los radiofármacos empleados en un estudio PET son moléculas radiactivas que resultan de la unión de un radionúclido más una molécula de interés biológico que en conjunto actúan como vehículo marcando un proceso concreto fisiológico o patológico del organismo. A través de las imágenes, en donde se ve la distribución de estos radiofármacos, por lo cual es posible estudiar procesos bioquímicos y funcionales de ciertos órganos o tejidos. Actualmente, se producen diferentes radiofármacos, los más comunes a nivel nacional se mencionan en el Cuadro 3.2. Sin embargo, el radiofármaco estándar en PET sigue siendo la $[^{18}\text{F}]FDG$ fluorodeoxiglucosa, mejor conocido como FDG ^[49].

RADIOFÁRMACO	UTILIDAD CLÍNICA
<i>FDG</i>	Fluorodeoxiglucosa marcada con ^{18}F . Permite evaluar la actividad glucolítica que es más elevada en células neoplásicas comparadas con células normales
$[^{18}\text{F}]NaF$	Fluoruro de sodio marcado con ^{18}F . Es útil en estudios óseos para la detección de tumores primarios y metástasis así como para diferenciar lesiones malignas y benignas
$[^{18}\text{F}]FLT$	Fluorotimidina marcada con ^{18}F . Es un marcador de proliferación celular que permite evaluar la respuesta temprana a tratamientos de manera más precisa que el FDG
$[^{11}\text{C}]Acetato$	Acetato marcado con ^{11}C . Útil para estudiar el metabolismo β^- oxidativo del miocardio, también es útil en oncología
$[^{13}\text{N}]Amoníaco$	Amoníaco marcado con ^{13}N . Se esparce a través de la membrana celular convirtiéndose en glutamina, es usado para estudios de perfusión miocárdica

Cuadro 3.2 Principales radiofármacos que produce la Unidad PET/CT – Ciclotrón UNAM ^[49].

El *FDG*, actúa como un análogo de la glucosa en el cual un grupo hidroxilo ha sido reemplazado por un átomo de flúor radioactivo, (Figura 3.6). Esta composición le permite ser incorporado por células con elevado consumo de glucosa, como el cerebro, y las células cancerígenas, sin embargo, el organismo no la metaboliza porque no entra al ciclo de la glucólisis, (Figura 3.7). La acumulación del radiofármaco dentro de la célula permite la obtención de imágenes tomográficas tipo PET.

3.4. Tomografía por emisión de positrones de pequeños animales

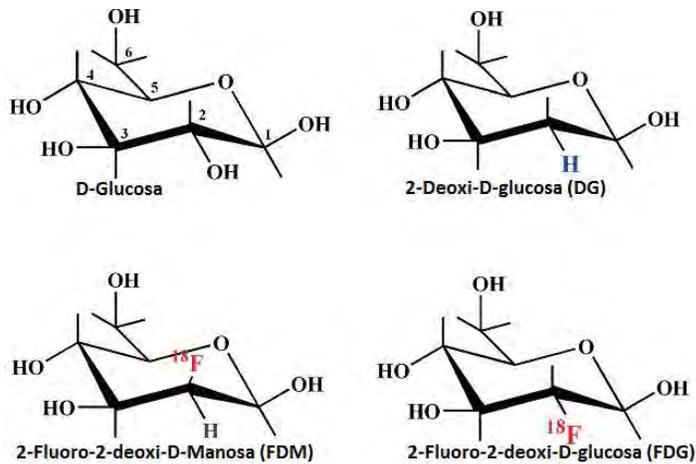
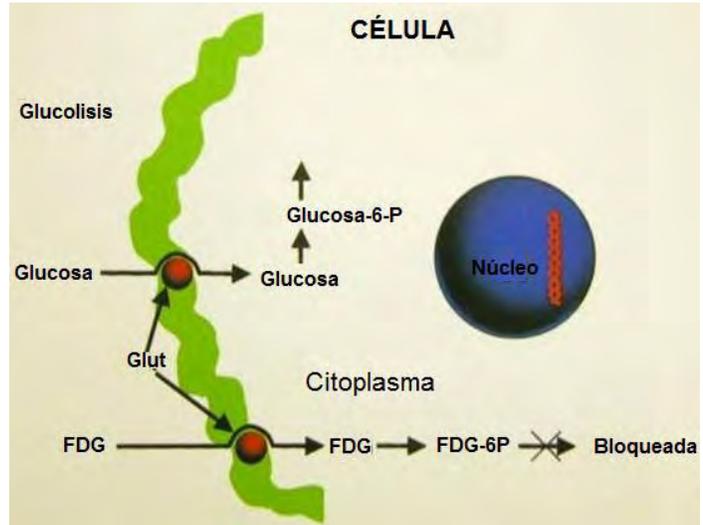


Figura 3.6
Estructura química de la glucosa y uno de sus análogos, el FDG. Adaptada de [50].

Figura 3.7 Vías de captación de FDG. Es transportado dentro de la célula por medio de Glut y se fosforila siendo captado por los órganos con mayor actividad glucolítica para luego ser desechado mediante la orina. P: Fosfato.



3.4. Tomografía por emisión de positrones de pequeños animales (microPET)

El equipo microPET es un pequeño tomógrafo, diseñado especialmente para su uso en pequeños animales como roedores (ratas y ratones), conejos, reptiles y algunos monos pequeños (especialmente para investigación neurológica), donde a través de la administración de fármacos, metabolitos, receptores o genes marcados con radionúclidos se pueden estudiar múltiples vías metabólicas, fisiológicas o bien, procesos patológicos, para la investigación en el área de cardiología, neurología y oncología. Este equipo, presenta los mismos fundamentos físicos que un equipo PET de uso en humanos; de manera similar consta de un anillo detector con cristales centelladores, que

pueden ser de Germanato de Bismuto (BGO) o de Oxy-ortosilicato de Lutecio (LSO), siendo estos últimos los más utilizados por su eficiencia en la producción de luz^[51].

El desarrollo del microPET para imágenes de animales pequeños junto con los radionúclidos emisores de positrones ha hecho posible evaluar la función biológica en animales vivos. Permitiendo evaluar la biodistribución y farmacocinética de los diferentes radiofármacos en modelos animales de diversas enfermedades, con el objetivo de ser usados posteriormente en humanos. A través del uso del microPET se han podido comprender múltiples vías patológicas. Los PET clínicos tienen una resolución de 5 a 6 mm, a diferencia del microPET que tiene del orden de 2mm.

Características del escáner microPET.

La adquisición de las imágenes se realizó en un equipo microPET (Figura 3.8) Focus 120 del tipo Concorde Microsystems LLC (SIEMENES Inc, Knoxville–ville, TN) proporcionado por la Unidad Ciclotrón PET/CT UNAM, dicho equipo cuenta con un anillo detector de 17.2 cm de diámetro, con un campo de visión (FOV, por sus siglas en inglés) transaxial de 112 mm y 18 mm en el eje axial. El equipo se encuentra conformado por un total de 13,384 cristales detectores de LSO (Oxy-ortosilicato de Lutecio) de 1.5 x 1.5 x 1.0 mm cada uno. La resolución intrínseca de los cristales en promedio es de 1.68 mm, con una resolución energética entre el 15 y 25% y un tiempo de resolución de 2.4 ns para fotones de 511 keV. La resolución espacial del equipo es 1.4 mm y opera en modo 3D.



Figura 3.8 Equipo microPET Focus 120 (Concorde, Siemens Inc, Knoxville, TN) de la Unidad PET/CT-Ciclotrón, UNAM.

3.5. Electrofisiología

Antecedentes

La electrofisiología y la rama de la física conocida como electricidad tienen un ancestro común. Surgieron a finales del siglo XVIII, como resultado de una controversia entre Galvani y Volta, sobre la naturaleza de las interacciones entre metales y músculos. Luigi Galvani (1737-1798) fue quien por primera vez investigó sistemáticamente los efectos de la electricidad sobre los músculos y postula la existencia de una “electricidad animal¹⁰”. Posteriormente, Leopold Nobili (1784-1835) con el uso de un galvanómetro demostró que los músculos generan corrientes eléctricas cuando se contraen.

El físico Carlo Matteucci (1811-1865), descubrió que si se coloca un electrodo sobre un extremo cortado del músculo y otro sobre la superficie intacta, se detecta una deflexión “galvanométrica”; esto es una corriente eléctrica. Esta sería conocida posteriormente como la corriente de lesión, generada por un potencial de lesión. Sus instrumentos fueron suficientemente sensitivos para detectar una disminución en la amplitud de esa corriente durante la contracción tetánica (término que él introdujo) producida por estricnina. Mauttecci fue el primero que usó la contracción de un músculo unido a su nervio motor para detectar la estimulación, o excitación, del nervio. Éste método es ampliamente usado para fines de investigación.

3.5.1. Técnica electrofisiológica

Como vimos en secciones anteriores, la función principal del músculo esquelético, la contracción que se manifiesta en la variación de la tensión o de la longitud de las fibras (o de ambas), se puede analizar a través de la caracterización de propiedades físicas importantes como la fuerza, elasticidad, el trabajo realizado y, de propiedades termodinámicas como el calor, que mantiene la

3.5.1. Técnica electrofisiológica

¹⁰ Electricidad animal. Luigi Galvani fue el primero que observó la actividad de la celda básica en 1791 cuando preparaba un experimento de anatomía. Para el experimento, Galvani había separado ancas de rana disecadas, en una solución salina y las había suspendido por medio de un alambre de cobre. Notó que cada vez que tocaba una de las ancas con un escabelo de hierro, los músculos del anca de rana se contraían. Galvani comprendió que se estaba produciendo electricidad, aunque creyó que provenía de los músculos del animal. En 1800, Alessandro Volta repitió el experimento y observó que los músculos de la rana no producían electricidad, sino que ésta se producía como resultado de una actividad química entre el alambre de cobre, el bisturí y la solución salina.

temperatura corporal normal y se produce por la contracción de las fibras. Es posible hablar de propiedades termodinámicas, los mecanismos homeostáticos que se producen en los seres vivos, mantienen la constancia de muchas propiedades, en especial la composición química, además los procesos fisiológicos ocurren a presión y temperatura constantes. Sin embargo, a pesar de mantener constantes algunas de sus propiedades, los seres vivos no son sistemas en equilibrio, pues si así fuese no podría ocurrir en ellos ningún proceso. Cuando ocurren transformaciones en un sistema, y éste mantiene sus propiedades, se dice que está en un estado estacionario. Los seres vivos son sistemas termodinámicos abiertos en estado **aproximadamente** estacionario^[52]. En este trabajo de tesis nos enfocamos en analizar la fuerza generada en la contracción isotónica tetánica de un músculo esquelético tipo II, denominado extensor digitorum longus (EDL) clasificado como músculo rápido. Por lo que, para obtener los registros electrofisiológicos empleamos la técnica que a continuación se describe.

Una vez disecado el músculo extensor digitorum longus de la rata, lo colocamos en una cámara de acrílico que contiene solución Krebs¹¹ y en cuyos extremos se encuentran dos electrodos de platino que están en contacto con la solución. El principio de funcionamiento físico se muestra de manera esquemática en la Figura 3.9, donde la parte inicial se desarrolla en un generador de pulsos (A) cuya señal se transmite hacia la cámara de estimulación (B) que se dirige a los electrodos de platino colocados en ambos lados del músculo, y que son los que entregan la descarga eléctrica en la solución donde encuentra inmerso el músculo. Dado que uno de los extremos en los que se encuentra sujeto el músculo es fijo, el movimiento y fuerza con que el músculo se contrae es registrado por la parte móvil que consta de un circuito que es sensible al movimiento y la señal mecánica es convertida a un impulso eléctrico el cual es capturado y digitalizado por un transductor (C) una vez que es amplificado. Y, la información es almacenada en un ordenador convencional (D) y visualizada a través del software “Lab Chart Pro 6” que despliega ésta información en gráficas de diferencia de potencial, amplitud, (en unidades de volts) en función del tiempo (en unidades de segundos). Además de la técnica experimental, se requiere de protocolo de estimulación que se verá en el capítulo 4, sección 12.

3.6. Modelos biomecánicos de la contracción

¹¹ Solución Krebs: es una solución buffer con un PH determinado y con los nutrientes característicos que emulan el interior de la célula muscular. Los reactivos que lo constituyen se describen en el Cuadro 2 de la Sección 4.4.

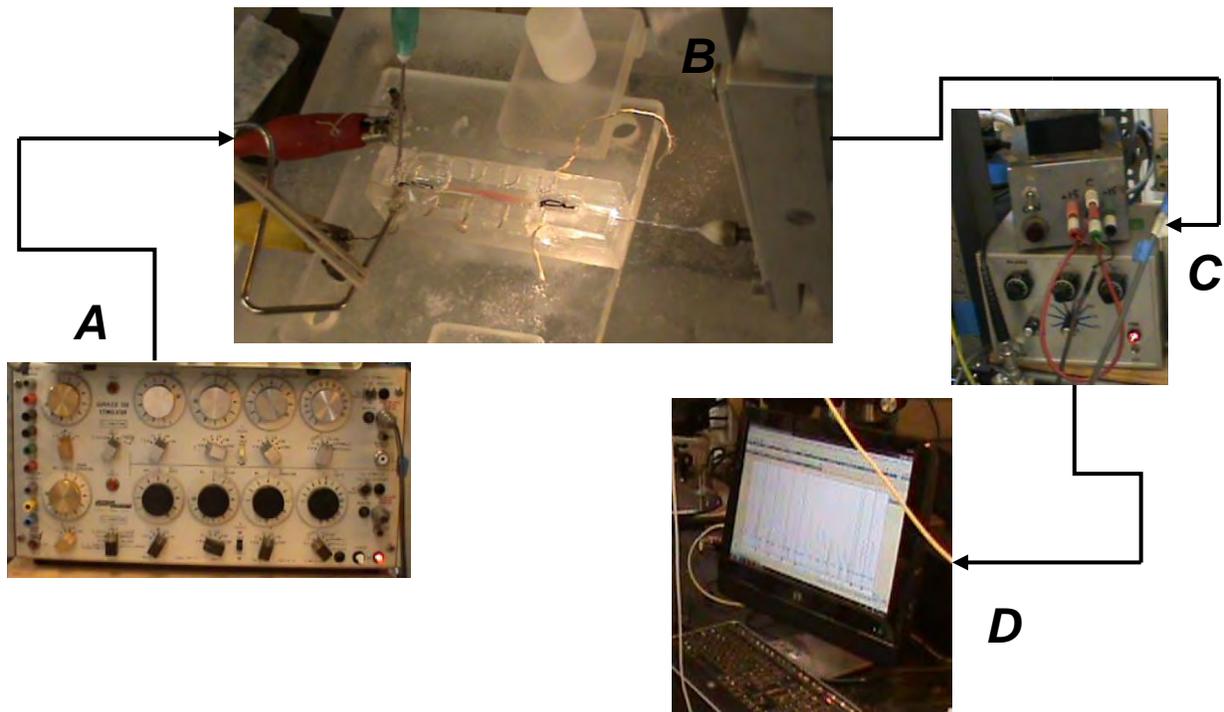


Figura 3.9 Diagrama esquemático de la técnica experimental que empleamos para obtener los registros electrofisiológicos. La explicación del proceso se describe en el texto.

3.6. Modelos biomecánicos de la contracción

Una explicación mecánica de la contracción del músculo esquelético fue dada por primera vez por el fisiólogo Andrew F. Huxley, en la que describe que el músculo estriado puede verse como la constitución de un componente contráctil en paralelo con un componente elástico y en serie con otro componente elástico. El componente contráctil lo representan las proteínas de la miofibrilla, actina y miosina. El componente elástico paralelo comprende el tejido conectivo que rodea las fibras musculares (el epimisio, perimisio y endomisio) y el sarcolema. Los componentes elásticos en serie están representados por los tendones^[53].

Posteriormente, se han creado modelos microscópicos y macroscópicos que describan el comportamiento de la contracción muscular que se observa en el laboratorio, los más conocidos son el modelo de Voigh, de Hill-Maxwell y de Hill (ver Figura 3.10). Se basan en evidencia histológica de elementos estructurales presentes en la constitución del músculo: elementos contráctiles que son generadores activos de fuerza (EC), elementos elásticos en serie (ES) y en paralelo (EP), elementos viscosos (EV) y elementos inerciales (masa muscular), cada uno de los cuales produce una respuesta

fisiológica que en conjunto generan fuerza y/o movimiento^[54]. La unidad contráctil funcional es el sarcómero de 1 a 3 μm de longitud, formado por miofilamentos y elementos estructurales de tejido conectivo. EC son los elementos que constituyen el mecanismo de generación de fuerza (teoría de los filamentos deslizantes). La naturaleza elástica de los componentes que conforman el músculo esquelético, desde proteínas como elastina, colágeno y titina hasta una estructura macroscópica como los tendones, es lo que permite considerar la presencia de elementos elásticos en la creación de cualquier modelo de la contracción muscular. La viscosidad surge del movimiento de las estructuras musculares en matrices de líquidos intra y extra celulares. La presencia de masa en esos componentes es lo que da origen a los elementos inerciales.

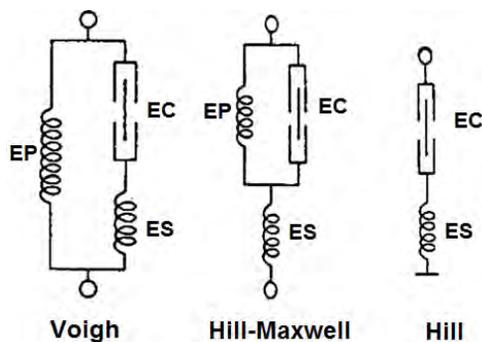


Figura 3.10 Modelos de la contracción del músculo estriado^[54]. EC: elemento contráctil; EP: elemento elástico en paralelo y, ES: elemento elástico en serie.

Sin embargo, estos modelos no presentan un buen acuerdo con algunos resultados experimentales. Antonio P. y colaboradores^[54] en el 2007, construyeron un modelo estructural y matemático de la generación de fuerza del músculo esquelético en condiciones isométricas y tetánicas con el objetivo de explicar lo obtenido en el laboratorio, las curvas: Fuerza - tiempo y Fuerza - longitud. Éste modelo consta de un conjunto formado por un elemento contráctil, uno elástico y otro viscoso organizados en paralelo, y un elemento elástico en serie. Partiendo de este principio, aplican las leyes de Newton para obtener la ecuación diferencial de movimiento del sistema y la solución a esta ecuación reproduce lo observado en el laboratorio,^[54]. Sin embargo, para el caso de la generación de fuerza del músculo esquelético en condiciones isotónicas y tetánicas, no se tienen modelos matemáticos descritos en la literatura.

3.7. Resultados recientes de algunos trabajos sobre epilepsia de lóbulo temporal.

Se cree que el metabolismo glucolítico cerebral refleja la intensidad global de la actividad sináptica. Un decremento en la actividad metabólica está relacionado con disfunción neuronal o pérdida

neuronal^[55]. Con modelos experimentales de epilepsia y técnicas *in vitro* se ha encontrado que la medición del metabolismo cerebral y el flujo sanguíneo durante las crisis es útil para identificar las estructuras responsables de la generación, propagación y control de actividad epiléptica. Algunos autores sugieren que la falta de correspondencia entre el consumo de glucosa local y el flujo sanguíneo cerebral durante el SE podría ser uno de los factores que intervienen en el daño neuronal, ^[56,57]. Fernandes y colaboradores^[92] en 1999 midieron el consumo de glucosa cerebral durante el SE usando el modelo litio-pilocarpina para inducir el *status*, sus resultados mostraron una correlación entre el hipermetabolismo y la muerte neuronal en las principales regiones implicadas en el circuito de convulsiones. Además, Ingvar^[93] en 1983; y el grupo de Pereira de Vasconcelos en el 2002, realizaron estudios de autoradiografías sobre la relación entre el flujo sanguíneo cerebral y el metabolismo de la glucosa en animales adultos sometidos a SE confirmando que la muerte neuronal puede ser el resultado de un desequilibrio entre estos parámetros. Vasconcelos y colaboradores en el 2002, mostraron en su estudio la existencia de una correlación entre el aumento en el consumo de glucosa y la cantidad de energía disponible (presentada por la circulación sanguínea cerebral) en zonas consideradas proclives a las convulsiones inducidas durante el SE, como son el hipocampo, la corteza piriforme, la corteza entorrinal y la amígdala.

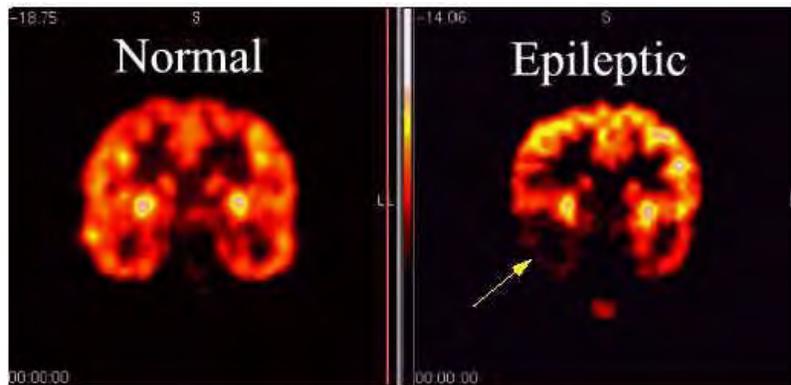


Figura 3.11 Vista coronal de una imagen PET del cerebro humano de un paciente sano (a la izquierda) y de uno con ELT (a la derecha) en la fase crónica usando *FDG*. La flecha indica captación casi nula de *FDG* lo que indica pérdida neuronal en esa área cortical y en general un patrón de poca captación del radiofármaco implicando con ello hipometabolismo, ello comparado con un cerebro normal. Lo que se observa en ambas

3.7. Resultados recientes de algunos trabajos sobre ELT

imágenes es la biodistribución del radiofármaco FDG (niveles de intensidad en función de la concentración) ver por ejemplo las referencias:^[58,59]. Imagen tomada de ^[60].

Estos hallazgos se han podido demostrar *in vivo* usando la técnica PET/FDG que permite el monitoreo de los patrones metabólicos cerebrales en pacientes con ELT y con microPET/FDG en animales a los que se les indujo el SE mediante modelos experimentales de epilepsia, ^[61,62]. Además, los estudios PET han mostrado correlación entre las zonas con menor actividad metabólica y la distribución de daño neuronal, lo que sugiere que una disminución del metabolismo que ocurre en las zonas dañadas refleje la pérdida neuronal ^[63].

Los resultados de estudios clínicos muestran patrones de hipometabolismo de la glucosa cerebral en ELT crónica (ver Figura 3.11), que con frecuencia son lo suficientemente específicos para identificar el foco epileptogénico en pacientes ^[64].

Respecto a la maquinaria contráctil del musculo esquelético de humanos epilépticos o de modelos animales con epilepsia inducida, la cual puede ser analizada a través de estudios en las propiedades mecánicas del músculo, no se tienen registros en la literatura.

3.8. Perspectivas

Este trabajo pretende brindar nuevo conocimiento con respecto a la especulación de la existencia de una mayor predisposición a la fatiga en el músculo esquelético de animales con epilepsia.

Por otro lado, se conoce que existe una mayor captación de FDG en los focos epileptógenos de animales y humanos con Epilepsia durante el SE (Figura 3.12); y menor captación durante la fase latente y crónica en determinadas regiones cerebrales. Por tanto se espera poder reproducir algunos de éstos resultados con los estudios de PET.

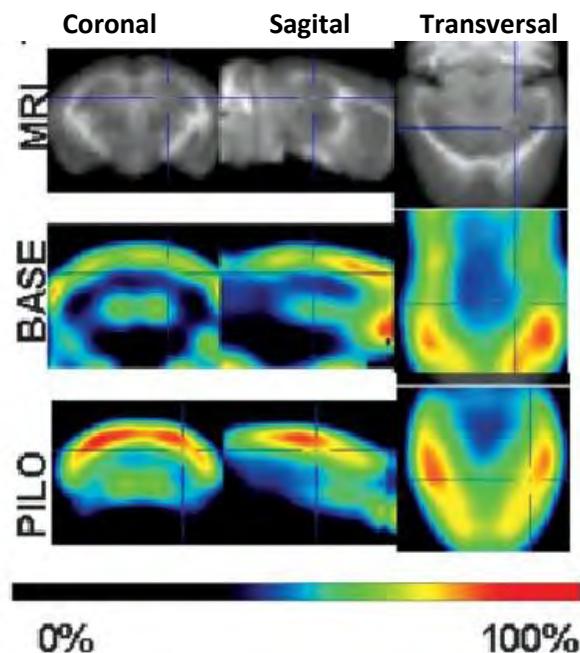


Figura 3.12 Cortes de imágenes PET coregradas con neuroimagen anatómica de Resonancia Magnética (MRI) que muestran un incremento en la captación de FDG observada en el hipocampo (33.2%) del grupo de animales (ratas macho Wistar) tratados con pilocarpina (PILO) en comparación con el grupo control (BASE), 60 minutos después de la inyección con pilocarpina lo cual es consistente con la existencia de actividad convulsionante^[65]. La captación de FDG son los niveles de intensidad en función de la concentración del radiofármaco por lo que se muestra en la parte inferior de la figura, la escala colorimétrica. El puntero indica la ubicación anatómica del hipocampo para los diferentes cortes.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial aproximado de 160-170 g teniendo de 45 a 55 días de edad, que fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron divididos en dos grupos, control y experimental. La metodología del uso de los animales también fue dividido en dos partes. La primera constó de aislar los músculos EDL del grupo experimental, a los que se les puso directamente concentraciones de pilocarpina disueltas en solución Krebs sobre el músculo aislado y colocado en una cámara de estimulación¹² (Figura 4.1.); mientras que para el grupo control a los músculos aislados se les mantuvo sólo con solución Krebs.



Figura 4.1 Rata macho de la cepa Wistar. Músculo EDL de la rata aislado y colocado en una cámara de estimulación. Imagen cortesía del M. en C. Joel Medina M.

¹² Cámara de estimulación: es un pequeño contenedor de acrílico diseñado con alambre delgado de platino colocado en las paredes del contenedor de forma sinusoidal que funcionan como electrodos.

En la segunda parte, a un nuevo grupo experimental de rata Wistar, se les administró una inyección intraperitoneal que contenía pilocarpina y al grupo control se les inyectó solución salina en lugar de la pilocarpina.

4.2. Protocolo del modelo experimental

Los animales de laboratorio fueron tratados según la Norma Oficial Mexicana sobre uso, cuidado y reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

El protocolo que seguimos para inducir la epilepsia en ratas es el descrito por Turski y colaboradores [80]. Éste modelo consiste en inyectar por vía intraperitoneal tres fármacos distintos a cada animal como se describe a continuación.

- Un antagonista colinérgico para minimizar los efectos colinérgicos periféricos, esto es, bloquear los receptores periféricos, Bromuro de Ipatropio (1.4 mg/kg), 30 minutos antes de la pilocarpina.
- Agonista colinérgico, Pilocarpina (360mg/kg).
- Un anticonvulsivante para controlar las crisis epilépticas, Diazepam/Valium (5 mg/kg), 40 minutos después de la inyección con pilocarpina. En caso de que no cedan las convulsiones, se puede inyectar una segunda hasta una tercera dosis de Diazepam de 15 a 30 minutos después de haber inyectado la primera dosis.

Se intensificaron los cuidados a las ratas sobrevivientes al *status epiléptico* (SE) durante los primeros días, y las que no consumían su alimento los días posteriores al SE, se les inyectó 1ml de solución fisiológica por vía intraperitoneal cada 12 horas para compensar los líquidos que habían perdido, hasta que se recuperarán.

4.3. Preparación del animal para el estudio PET

Para hacer el análisis del metabolismo cerebral del animal se usó el radiofármaco FDG. Las adquisiciones se realizaron a los 56 días después de la inyección intraperitoneal con pilocarpina,

es decir, cuando la rata presentaba un estadio crónico de epilepsia; más características de los animales empleados se describen en el Cuadro 4.1. Se usó como anestesia general antes y durante el estudio, gas isoflurano. Antes del estudio PET, los animales se encontraban en las mejores condiciones posibles para mantenerlos en estado basal 45 minutos antes y después de la administración del radiofármaco, para evitar la captación en otros órganos que no sean el cerebro.

Animales	Edad	Peso	FDG [Actividad Inicial]
CONTROL	101 días	364.5 ± 0.005 g	541 ± 0.05 μ Ci
EPILÉPTICA	101 días	389.99 ± 0.005 g	546 ± 0.05 μ Ci

Cuadro 4.1 Características de los animales empleados para el estudio PET y de la cantidad de FDG inyectado. N: número de animales. Control N=1, experimental N=1.

Los animales fueron anestesiados antes de la administración del FDG mediante inhalación del gas isoflurano colocándolos en una pequeña caja de acrílico por donde se les hizo pasar el gas, como se muestra en la Figura 4.2



Figura 4.2 Preparación de los animales para la inyección del radiofármaco. Caja de acrílico con un pequeño orificio por donde entra el gas isoflurano como anestesia.

Una vez anestesiados, se les preparó para la inyección del radiofármaco por vía intravenosa en la vena caudal localizada en el extremo de la cola, poseen dos venas, para mejorar esta técnica se sumergió parte del extremo de la cola en agua caliente de temperatura aproximada entre 45 y 50 °C para dilatar la vena y facilitar el procedimiento, ver Figura 4.3.

Figura 4.3 Inyección FDG por vía intravenosa en la vena caudal. La biodistribución del fármaco fue de 45 minutos.



Posteriormente, fueron colocados en posición supina y fijados con cinta adhesiva a la mesa del tomógrafo, y mediante una pequeña mascarilla pediátrica se les continuó administrando anestesia, como se muestra en la Figura 4.4.



Figura 4.4 Colocación final de la rata en el microPET para iniciar el estudio, 45 minutos después de la inyección FDG.

Finalmente, se toman las adquisiciones con un estudio estático y de transmisión de cabeza (ver Figura 4.5). El estudio estático es cuando se permite que haya una biodistribución del radiofármaco por determinado tiempo antes de adquirir con el PET. En particular, el estudio estático realizado fue de 45 minutos de biodistribución, además no hubo movimiento de camilla, por lo que el órgano de estudio estaba fijo. Durante la adquisición, se van almacenando y registrando los eventos detectados en coincidencia (LOR), éstos son las proyecciones obtenidas (sinogramas) de los detectores del equipo; después del estudio se analiza la información mediante el software del equipo que usa algoritmos

matemáticos para finalmente obtener las imágenes de emisión, PET. Del estudio de transmisión se obtiene imágenes semejantes a las de CT (Tomografía Computarizada)¹³ pero con baja resolución. La técnica que usamos para realizar el estudio de transmisión consistió en colocar una pequeña fuente radiactiva de ^{57}Co en el interior del tomógrafo, que gira entre los detectores y la rata, durante el estudio. La fuente radiactiva, es un emisor gamma (122 KeV), la imagen de transmisión se genera a partir de LOR de la misma manera que ocurre con la imagen de emisión con la diferencia que esta vez todas las LOR están bien determinadas por que se conoce la posición de la fuente y la detección del rayo γ . Durante los estudios, estuvimos monitoreando la frecuencia respiratoria de la rata, para evitar problemas con la anestesia suministrada.



Figura 4.5 Adquisición de las imágenes mediante un estudio de cabeza estático de 30 minutos y un estudio de transmisión de 15 minutos.

4.4. Preparación del animal para Electrofisiología

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos y poder determinar la fuerza de contracción, los animales fueron sacrificados por dos métodos diferentes dependiendo de su peso corporal, menor de 200 g mediante la dislocación de las vértebras cervicales. Si su peso corporal fuese mayor de 250 g, el método consistía en la inhalación de gas CO_2 de 5 a 8 minutos. La razón de hacerlo de ésta forma es para que los animales sufrieran el menor daño posible, ya que, entre más pesados son, se requiere mucha fuerza para hacer correctamente la dislocación cervical.

Una vez sacrificados, usando material quirúrgico (escalpelo, pinzas, hilo de sutura, etc.), se disecó el músculo Extensor Digitorum Longus (EDL) que es un tipo de músculo rápido responsable del

4.4. Preparación del animal para Electrofisiología

¹³ CT: técnica imagenológica de diagnóstico médico que proporciona información anatómica.

movimiento extensor de los dedos del pie. El EDL se encuentra en la parte anterior externa de la pierna en humanos, en la región superior está inserto en la cara frontal de la rótula, el tendón de la parte baja presenta cuatro ramificaciones y cada una se inserta en la falange de cada dedo de manera independiente a las otras. En la Figura 4.6, se muestra la localización de éste músculo tanto en humano como en la rata.

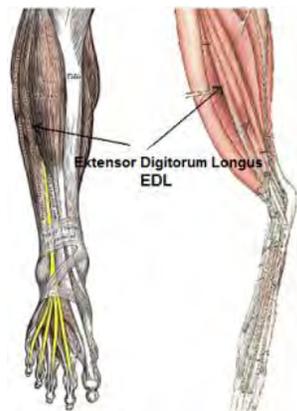


Figura 4.6 Localización del músculo *Extensor Digitorum Longus* en el humano y en la rata. El EDL en ambos casos desempeña la misma función y tiene la misma estructura sólo difieren en la profundidad de su ubicación, en la rata se encuentra más interno.

Una vez extraído en su totalidad el músculo se colocó en una caja de Petri con solución krebs y en presencia de burbujeo de gas para mantener un PH adecuado como se describe a continuación. Los reactivos y las cantidades que constituyen la solución Krebs se muestran en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Reactivos y concentraciones de la solución krebs.

Los reactivos de la solución de Krebs dan un pH de 8.06, el cual se modifica por el burbujeo con un gas cuya composición es O₂ al 95% y CO₂ al 5%, que reduce el

Sustancia	Molaridad	PM	Gramos/Litro
NaCl	0.135	58.44	7.89
KCl	0.005	74.55	0.373
MgCl	0.001	203.3	0.203
NaHCO ₃	0.015	84.01	1.26
Na ₂ HPO ₄	0.001	142	0.142
C ₆ H ₁₂ O ₆	0.011	180.2	1.98
CaCl ₂	0.0025	147	0.0367

pH a 7.0 lo cual es fisiológicamente compatible con el interior de la célula muscular.

La caja de Petri tiene en el fondo un gel que permite colocar fijadores en el músculo para inmovilizarlo y poder atar con hilo quirúrgico los extremos del músculo en la cámara de estimulación. Los nudos que se hacen en cada extremo del músculo están sujetando firmemente los tendones, se deja una pequeña asa para inmovilizar uno de los extremos al sujetador fijo que está en la cámara y el otro a la parte móvil del transductor.

4.5. Arreglo experimental

4.5. Arreglo experimental

El EDL aislado y colocado en la cámara de estimulación estuvo inmerso en solución Krebs en presencia de burbujeo de gas todo el tiempo para mantener el PH durante todo el protocolo de estimulación. En el caso de la pilocarpina, ésta se disolvió previamente en Krebs para distintas concentraciones y se mantuvo durante todo el protocolo. El músculo se fijó a una pinza en su extremo tendinoso distal mediante una de las asas, y del otro extremo con la otra asa, el tendón proximal se sujetó a un transductor de fuerza y se tensó a la longitud de reposo (que es a la que se mantiene cuando está inserto en el esqueleto), que es equivalente a 1.3 veces su longitud cuando está aislado (separado del hueso). El equipo utilizado para llevar a cabo la estimulación consta de un estimulador, un transductor de fuerza y un amplificador (fuente de poder), como se muestra en la Figura 4.7. En la Sección 3.5.1., se explica mediante un diagrama el proceso de funcionamiento del arreglo experimental mostrado.

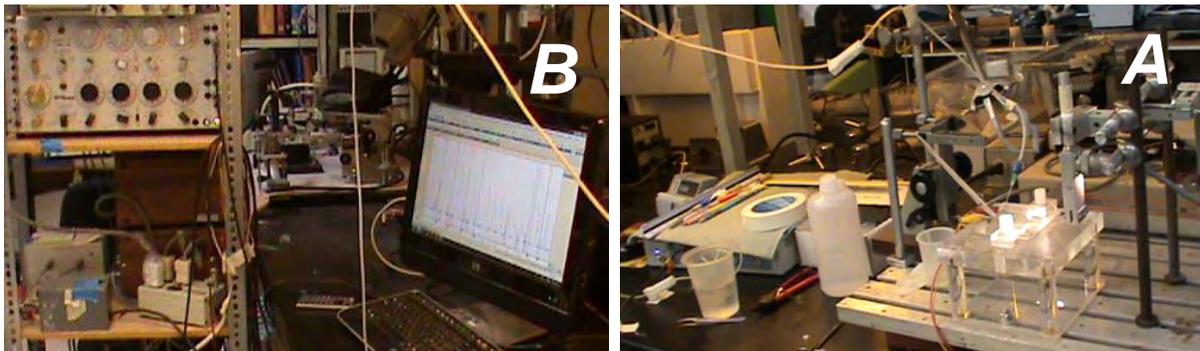


Figura 4.7 Arreglo experimental empleado para llevar a cabo los registros electrofisiológicos. **A)** Cámara de estimulación, en su interior se encuentra el músculo EDL inmerso en solución Krebs en presencia de burbujeo de gas. **B)** Estimulador y amplificador. Dado que al músculo se le está estimulando, en el ordenador se está obteniendo un registro.

4.6. Estudios mecánicos del músculo

Como se ha descrito en secciones anteriores, el músculo EDL puede verse de manera macroscópica como un conjunto de resortes conformando un circuito, que al enviar determinados estímulos eléctricos mediante nuestro arreglo experimental, el músculo se contrae isotónica y tetánicamente, donde cada uno de los elementos contráctiles y elásticos aporta una fuerza que se va

sumando como un todo (fuerza total), y se registra mediante el transductor de fuerza. Por otro lado, la magnitud de la fuerza está directamente relacionada con las dimensiones del músculo, como veremos en las siguientes secciones.

Para analizar la fuerza generada fue necesario determinar primero el protocolo de estimulación que a continuación se describe.

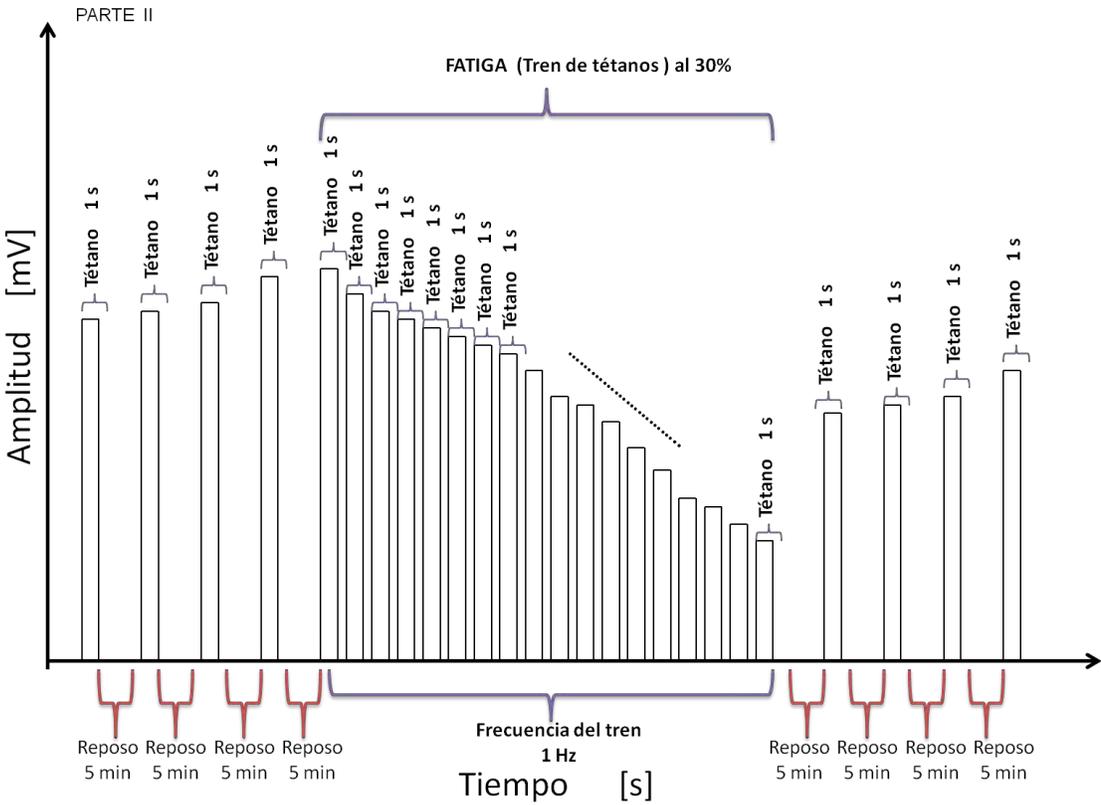
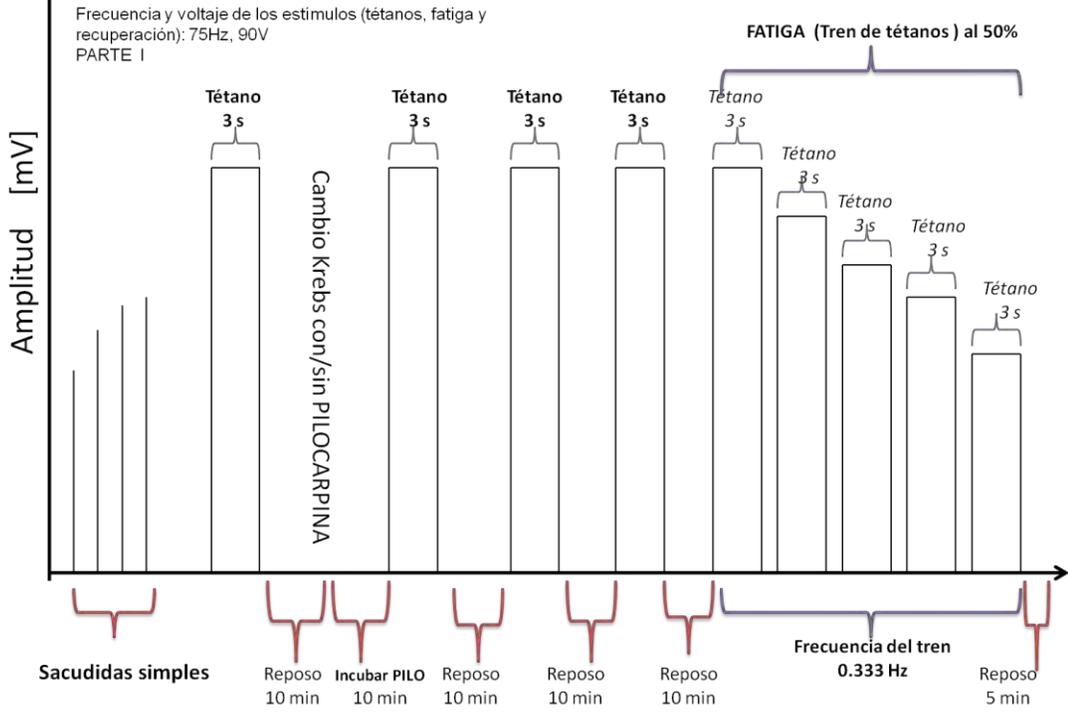
4.7. Protocolo de estimulación.

Los protocolos seleccionados están conformados por las siguientes cuatro variaciones en la estimulación:

- 1) **Sacudida simple:** asegura la contracción y corrobora la integridad del músculo de posibles daños hechos durante la extracción, constan de un solo impulso eléctrico. Ver pág. 28.
- 2) **Tétanos:** mide la fuerza que el músculo es capaz de desarrollar mediante una sucesión rápida de estimulaciones tetánicas, descargas eléctricas. Ver pág. 28.
- 3) **Fatiga:** estimulaciones tetánicas repetidas sin periodos adecuados de reposo (tren de tétanos), disminuyendo así la fuerza de contracción.
- 4) **Recuperación:** son tétanos con períodos adecuados de reposo. El músculo que se somete a fatiga tiene la propiedad de recuperarse, es decir, la fatiga es un proceso reversible en el músculo sano, consiste en que el músculo obtenga nuevamente una fuerza de contracción mayor a la desarrollada durante el último tétanos de la fatiga y tendencia de volver a la amplitud inicial respecto del primer tétano dado en la fatiga. Si esto ocurre entonces existe la recuperación.

Se determinaron dos protocolos de acuerdo a la edad de la rata. El protocolo 1, llamado *PILOCARPINA*, fue aplicado en los músculos EDL aislados de ratas jóvenes que conformaban el grupo control y experimental. El grupo control consistía de los músculos en Solución Krebs durante todo el protocolo. Mientras que, en el grupo experimental los músculos utilizados se mantuvieron con Solución Krebs más la pilocarpina disuelta a diferentes concentraciones incubada durante todo el protocolo (excepto para el primer tétanos). En la siguiente grafica se ejemplifica éste protocolo, el cual se obtiene en términos de la amplitud de los estímulos en función del tiempo.

Protocolo de estimulación PILOCARPINA



4.7. Protocolo de estimulación

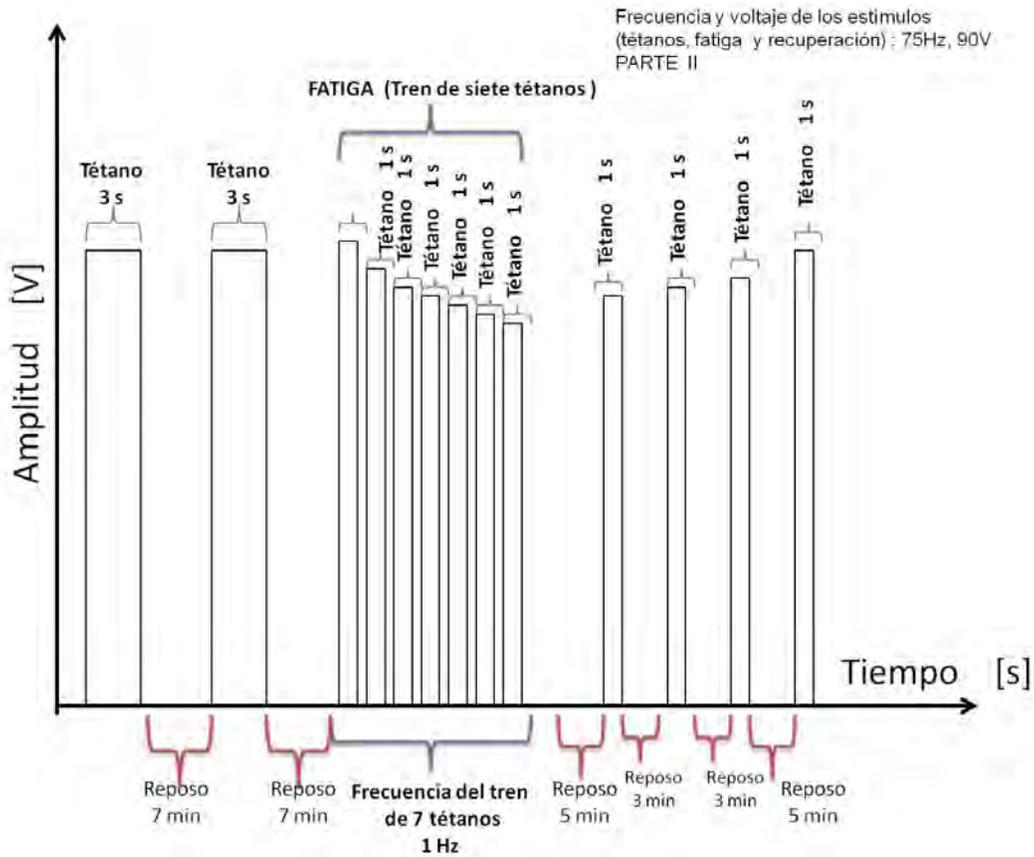
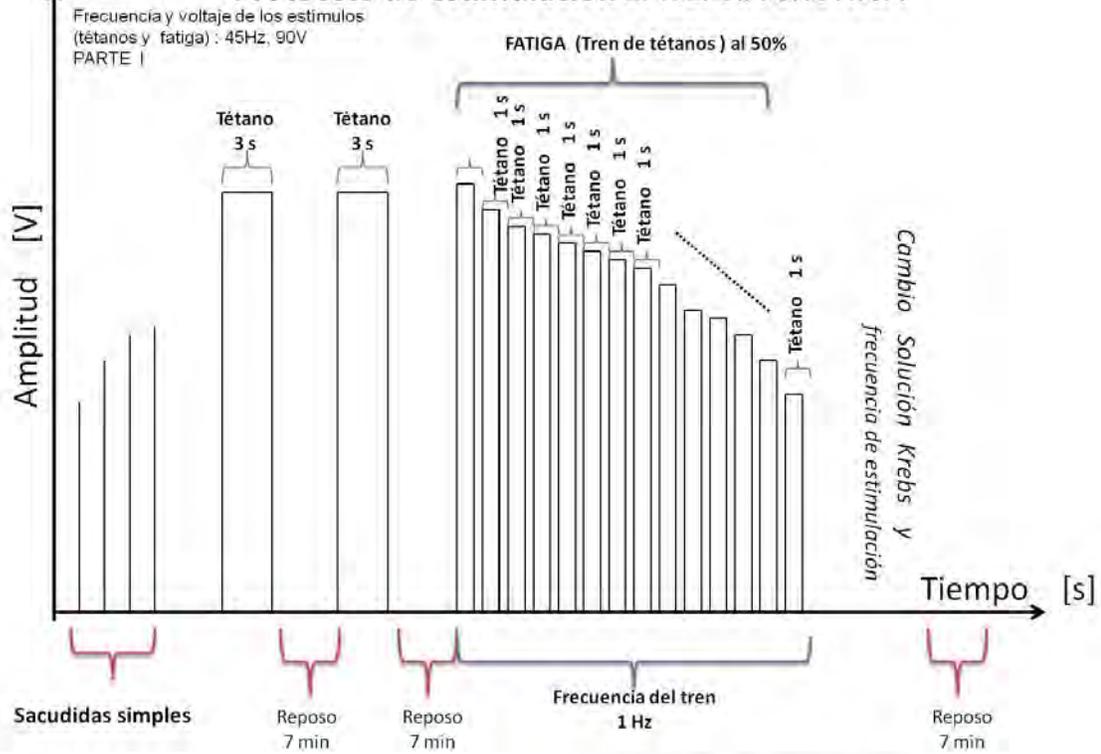
Este protocolo también fue aplicado en los músculos de la rata con epilepsia latente, en el que los músculos fueron incubados únicamente con solución Krebs.

Como se muestra en la gráfica del Protocolo *PILOCARPINA*, este inicia con sacudidas simples, cuatro estimulaciones tetánicas o tétanos con periodos adecuados de reposo de 10 min entre cada uno de ellos, donde la contracción de cada tétano se mantuvo por 3s. Se continuó con un tren de tétanos. Período y frecuencia del tren: 3s y 0.333 Hz, respectivamente. Dejando de estimular cuando el último tétano del tren llegaba a un 50% de la fuerza lograda respecto al primer tétano de la fatiga, los estímulos se realizaron a 90 V y 75 Hz, ésta última frecuencia es independiente del tren de tétanos. Después del tren se dejó descansar al músculo por 5 minutos para continuar estimulando con cuatro tétanos de 1s de duración y descanso entre ellos de 5 minutos. Y, así sucesivamente hasta finalizar el protocolo (ver grafica del protocolo de estimulación *Pilocarpina* en la página anterior).

El protocolo 2, llamado *EPILEPSIA CRÓNICA*, fue aplicado en los músculos EDL aislados de rata adulta que cursaban ELT en un estadio crónico, esto es, con 99 días de evolución. Este protocolo fue más corto que el anterior debido a que los músculos en general, tendían a fatigarse más rápido porque provenían de ratas adultas. Se combinaron dos frecuencias 45 y 75 Hz, a diferencia del protocolo anterior en la que sólo se uso una.

En la siguiente gráfica se muestra el protocolo de estimulación *EPILEPSIA CRÓNICA*, el cual inicia con sacudidas simples, dos tétanos de 3s de duración a baja frecuencia (45 Hz), permitiendo la recuperación del músculo con 7 min de descanso entre cada tétano. Continuando con un tren de tétanos al 50%. Período y frecuencia del tren: 1s, 1 Hz. Se hizo recambio de la solución Krebs, y también de la frecuencia de estimulación (75 Hz). Volviendo a estimular, 7 min más tarde, con dos tétanos de 3s de duración y 7 min de descanso entre ellos. Luego, tren de siete tétanos. Período y frecuencia del tren: 1s, 1Hz. Finalmente, cuatro tétanos de 1s de duración y periodos de descanso adecuados entre ellos. El voltaje del generador fue siempre constante a lo largo del protocolo, 90 V. Ver en la siguiente página, la grafica del protocolo de estimulación *EPILEPSIA CRÓNICA* que representa físicamente la descripción mencionada.

Protocolo de estimulación *EPILEPSIA CRÓNICA*



Capítulo 5

Resultados

5.1. Efecto de la pilocarpina sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético

En esta sección se muestran los resultados obtenidos del protocolo de estimulación descrito en el capítulo anterior (tétanos, fatiga y recuperación) para músculos EDL de rata Wistar de 45 a 55 días de edad y peso corporal de 160 a 170 g. Los músculos fueron incubados usando tres diferentes concentraciones de pilocarpina (0.05, 0.1 y 1 mM) durante todo el protocolo.

Se obtuvo una curva de calibración del equipo (transductor de fuerza) con el objetivo de relacionar la magnitud de medida del equipo con la magnitud que reportamos. La respuesta del equipo es lineal y el factor de calibración (valor de la pendiente) se aproxima a 1, con una desviación estándar pequeña lo que implica mayor precisión. La ecuación 4.1 es la curva de calibración obtenida:

$$Y[mV] = 0.79259 X[mN] - 1.45066 \quad (4.1)$$

Donde 0.79259 y -1.45066 son constantes, siendo 0.79259 el factor de calibración con desviación estándar de 0.002.

5.1.1. Efecto de la pilocarpina en la estimulación tetánica

En la Figura 5.1, se muestra la fuerza de contracción generada en un músculo EDL control y la fuerza normalizada respecto al primer tétanos control, sin pilocarpina. Los resultados se muestran como el promedio de los experimentos \pm la desviación estándar (promedio \pm SD). Se usaron diferentes concentraciones de pilocarpina. Las dosis empleadas se calcularon tomando en cuenta la relación entre el peso molecular del fármaco y el peso de un músculo EDL. De la fuerza normalizada respecto al control, a diferentes concentraciones de pilocarpina, no se observan cambios importantes para la estimulación tetánica, esto se aprecia en la Figura 5.1.B, es esta Figura se está graficando la fuerza tetánica normalizada respecto al control en función de los cuatro tétanos representados en la Figura 5.1.A, que son registros que obtuvimos y definimos en este capítulo como *experimentos representativos* porque muestran la tendencia de los trazos de todos los experimentos realizados bajo determinadas condiciones de estimulación.

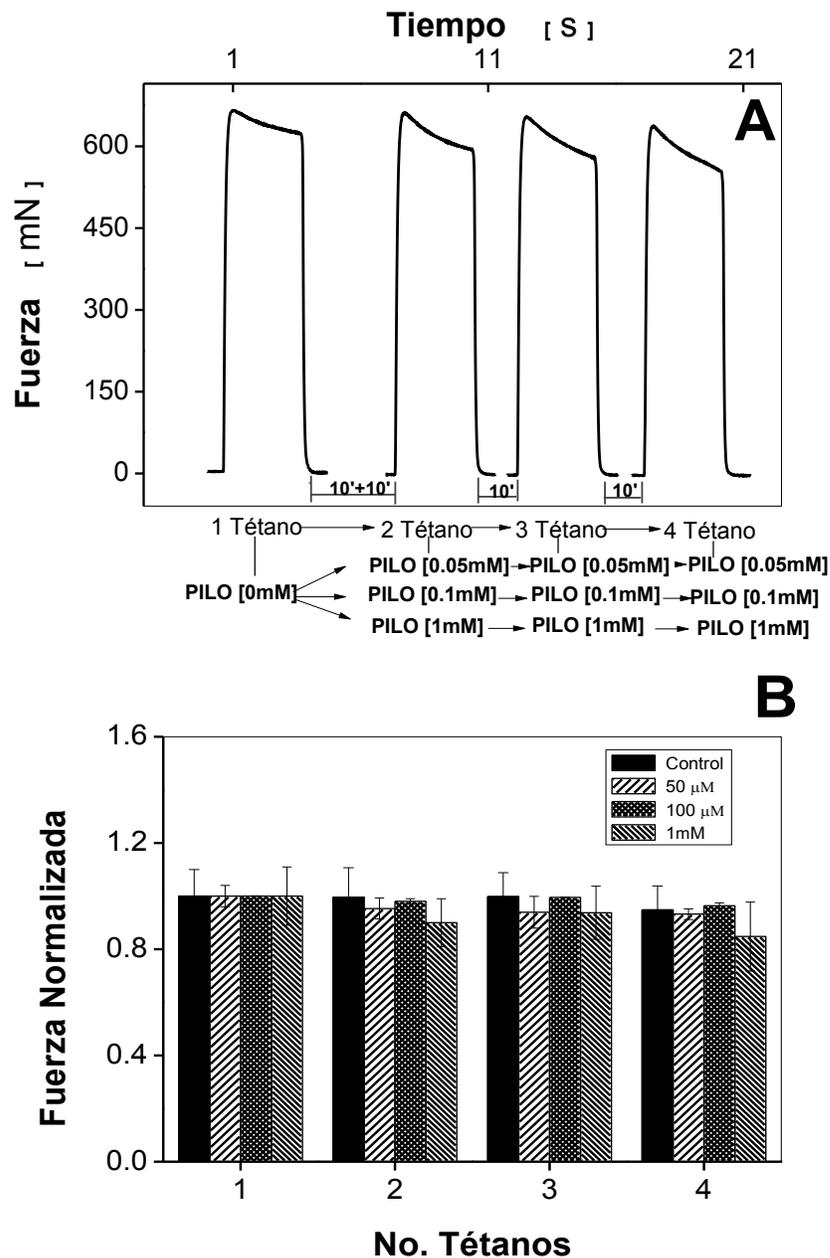


Figura 5.1. Efecto de la pilocarpina sobre la fuerza de contracción tetánica del ME. **A)** Experimento representativo¹⁴ del efecto de la pilocarpina sobre estimulación tetánica de un musculo EDL control (3s, 90V y 75Hz). Donde la notación PILO=Pilocarpina. **B)** Fuerza promedio normalizada respecto al control de la

¹⁴ Experimento representativo: es un registro electrofisiológico obtenido de los experimentos que realizamos bajo las mismas condiciones de estimulación, y, seleccionamos como un esquema modelo porque representa estadísticamente la tendencia de los trazos, así como la magnitud promedio de la fuerza generada, que registraron las propiedades mecánicas analizadas.

estimulación tetánica del ME incubado con pilocarpina (0.05, 0.1 y 1 mM), se muestra el promedio \pm desviación estándar (SD); n=4, donde n= número de músculos EDL para cada concentración, y las barras de error representan la desviación estándar.

5.1.2. Efecto de la pilocarpina en la fatiga

Mediante el protocolo de estimulación presentado en la Sección 4.7, analizamos la propiedad mecánica de fatiga en el músculo aislado, a las distintas concentraciones de pilocarpina ya mencionadas. Estimulando al músculo constantemente mediante un tren de tétanos con frecuencia de 0.333 Hz, en el que la contracción de cada tétano se mantenía por 3 segundos. Dejando de estimular cuando el último tétano del tren alcanzaba el 50% de la fuerza generada respecto al primer tétano de la fatiga.

En la Figura 5.2A, se muestra uno de los registros obtenidos, para un músculo control que se fatiga al 50% con un tren de seis tétanos. En 5.2B, se obtiene una recuperación satisfactoria, ganando el 64% de la amplitud en el primer tétano y hasta 80% para el cuarto tétano. Esto implica que el músculo se encuentra en buenas condiciones.

En 5.2C, se grafica el tren seis tétanos (fatiga) que se observa en 5.2A, con una n de 4 músculos controles, la fuerza generada por cada tétano que constituye el tren es normalizada respecto al primer tétano control de la fatiga. En 5.2D, se normaliza la fuerza de fatiga respecto del control para las diferentes concentraciones de pilocarpina, de esta grafica vemos que no existen diferencias importantes tampoco para la fatiga.

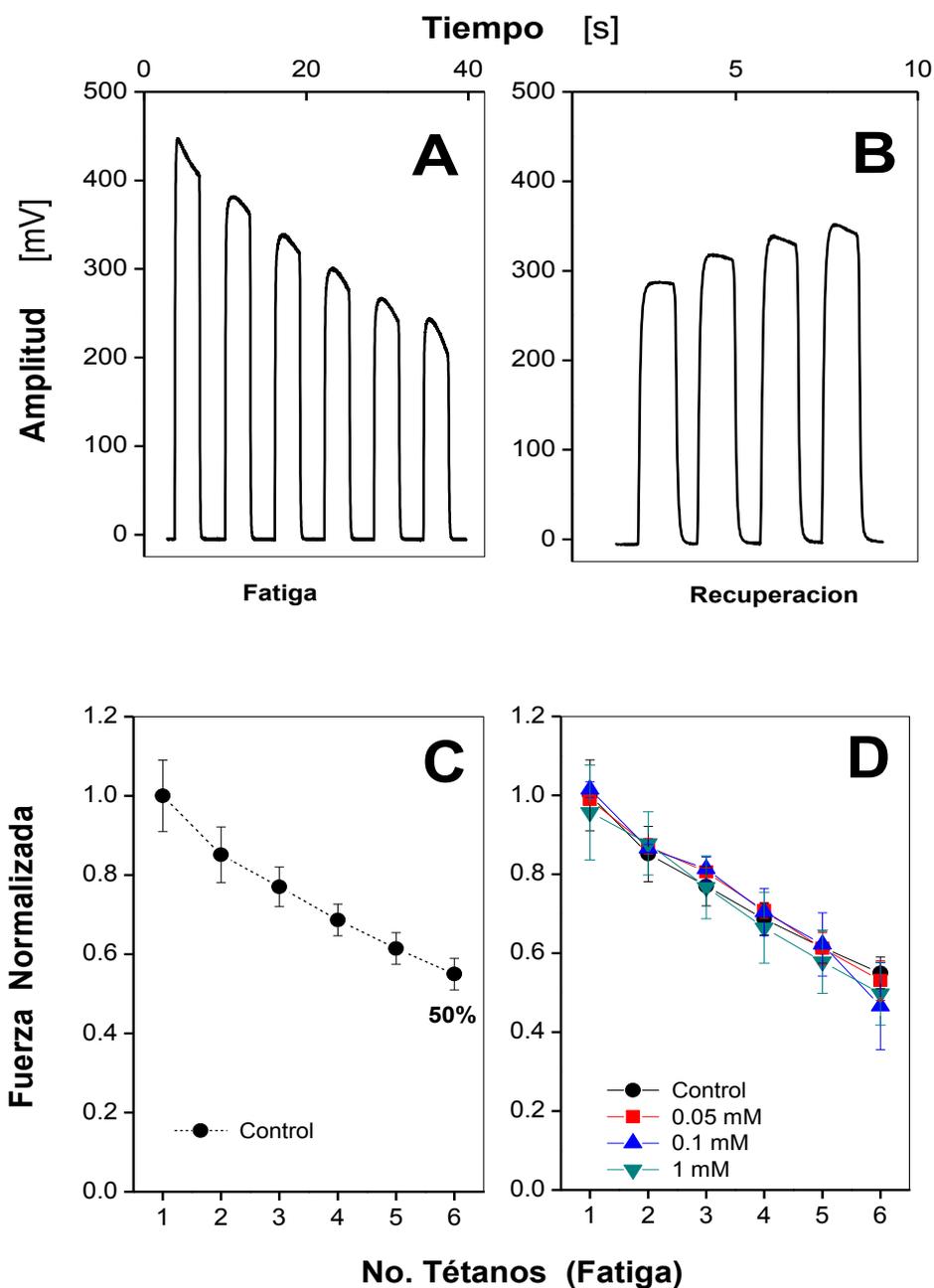


Figura 5.2. Efecto de la pilocarpina sobre la fatiga del ME. **A)** Experimento representativo de la estimulación del tren tetánico (3s, 0.333Hz, 90V), hasta el 50% de pérdida de fuerza. **B)** Experimento representativo de la recuperación en la fuerza (1s, 75Hz, 90V), para un músculo EDL control. **C)** Fuerza promedio normalizada respecto del primer tétano control de la fatiga del ME en ausencia de pilocarpina (control) \pm la desviación estándar (SD) representada por las barras de error; $n=4$ músculos. **D)** Fuerza promedio normalizada respecto del control de la fatiga del ME en presencia de pilocarpina (0.05, 0.1 y 1 mM) y en ausencia de ésta (control) \pm la desviación estándar (SD) representada por las barras de error; $n=4$ músculos para cada concentración.

5.1.3. Efecto de la pilocarpina en la recuperación

En la Figura 5.3, se muestra la recuperación después de fatiga al 50% para todas las concentraciones de pilocarpina usadas mediante la normalización respecto del control de la fuerza promedio obtenida en cada registro. De esta gráfica se observa al igual que en los casos anteriores, que no hay diferencias importantes entre los experimentos realizados.

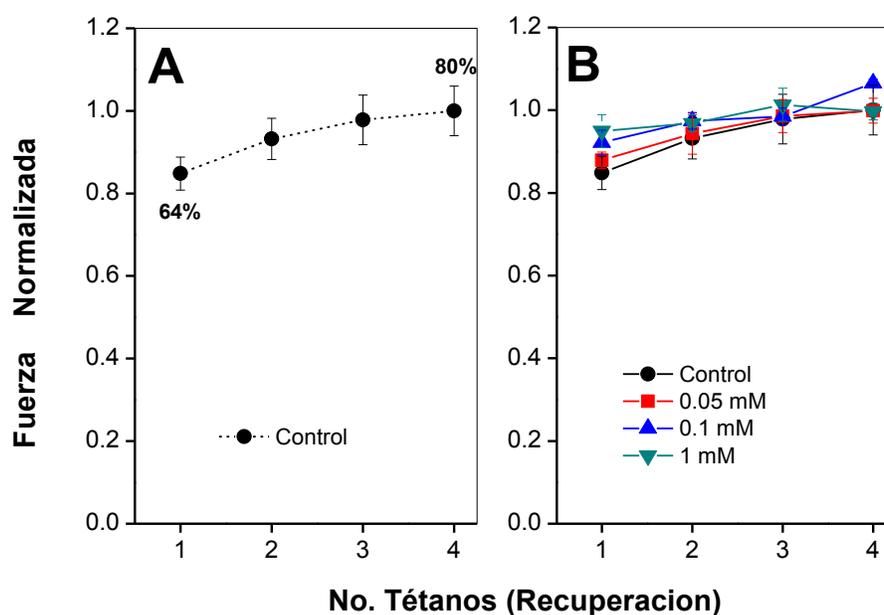


Figura 5.3. Efecto de la pilocarpina sobre la recuperación después de la fatiga del ME. Se muestra la Fuerza promedio normalizada de la recuperación después de fatiga del ME \pm la desviación estándar (SD) representada por las barras de error, **A)** control y **B)** incubado con pilocarpina (0.05, 0.1 y 1 mM). Para $n=4$ músculos por cada concentración de pilocarpina.

En resumen, podemos ver que la pilocarpina a distintas concentraciones sobre el músculo durante todo el protocolo de estimulación (tétanos, fatiga y recuperación) no ocasiono diferencias importantes en cuanto a la fuerza de contracción, es decir, la pilocarpina no modifica las propiedades mecánicas del músculo esquelético aislado.

5.2. Descripción conductual en el modelo de epilepsia inducido por pilocarpina en la rata.

Trastornos emocionales en la epilepsia: miedo, obsesividad, pérdida de contacto con la realidad, agresividad, y especialmente depresión por lapsos breves o prolongados, son algunos de los síntomas de enfermos epilépticos. La incidencia de problemas emocionales y psicopatológicos es más alta en los epilépticos que en la población general y que en pacientes con otros desórdenes neurológicos ^[65].

Minutos después de la inyección intraperitoneal con pilocarpina, los animales tratados presentaron comportamientos y síntomas característicos de pacientes epilépticos que varían en los diferentes periodos.

Durante los primeros 10 a 20 minutos después de la inyección con pilocarpina se observaron síntomas tales como espasmos y contracciones musculares yendo de moderados a fuertes, dilatación y contracción de globo ocular, erizamiento de pelo, tensión en la cola, masticación, espumarajos y movimientos anormales de la cabeza como movimientos rotatorios y de arriba hacia abajo.



Figura 5.4. Fase aguda del modelo experimental. Instantáneas tomadas los primeros 15 minutos después de la inyección con pilocarpina; se aprecian tensión en la cola, espumarajos y el inicio de una convulsión tónico clónica.

Posteriormente, las contracciones y espasmos se intensificaron llegando a alterar por completo la coordinación motriz del animal para desencadenar en fuertes convulsiones que los hacían caer y no cedían, siendo necesario inyectar diazepam. En la mayoría de los casos las convulsiones no cedieron a la primera dosis de diazepam, por lo que fue necesario inyectar una segunda dosis después de 15 a 30 minutos. Para algunos casos se necesitaron hasta 3 o 4 dosis de diazepam. Dado que el daño es severo, alrededor del 30% de éstos animales sobreviven a la fase aguda. Algunos de estos síntomas se pudieron capturar mediante instantáneas como se aprecia en las siguientes Figuras.



Figura 5.5. Instantánea de la fase aguda del modelo experimental. Se observan primeros síntomas: espumarajos y pérdida de control motriz.

Los animales que sobrevivieron al status epiléptico inducido, quedaron muy débiles por lo que, los cuidados se intensificaron durante los primeros 3 días, inyectando solución fisiológica 1ml/100gr de peso cada 12 horas por vía intraperitoneal, para recuperar volumen, ya que en estas condiciones, los animales se rehusaban a comer y beber. Para el segundo día fue necesario suministrarles por vía oral alimento preparado con una consistencia más suave dado que no podían masticar el alimento estándar.

Respecto a su comportamiento en comparación a las ratas control, tenían aumentado el reflejo de huida, estaban hiperactivas a los sonidos y al tacto, además de que evitaban el contacto resguardándose en las esquinas de su contenedor.

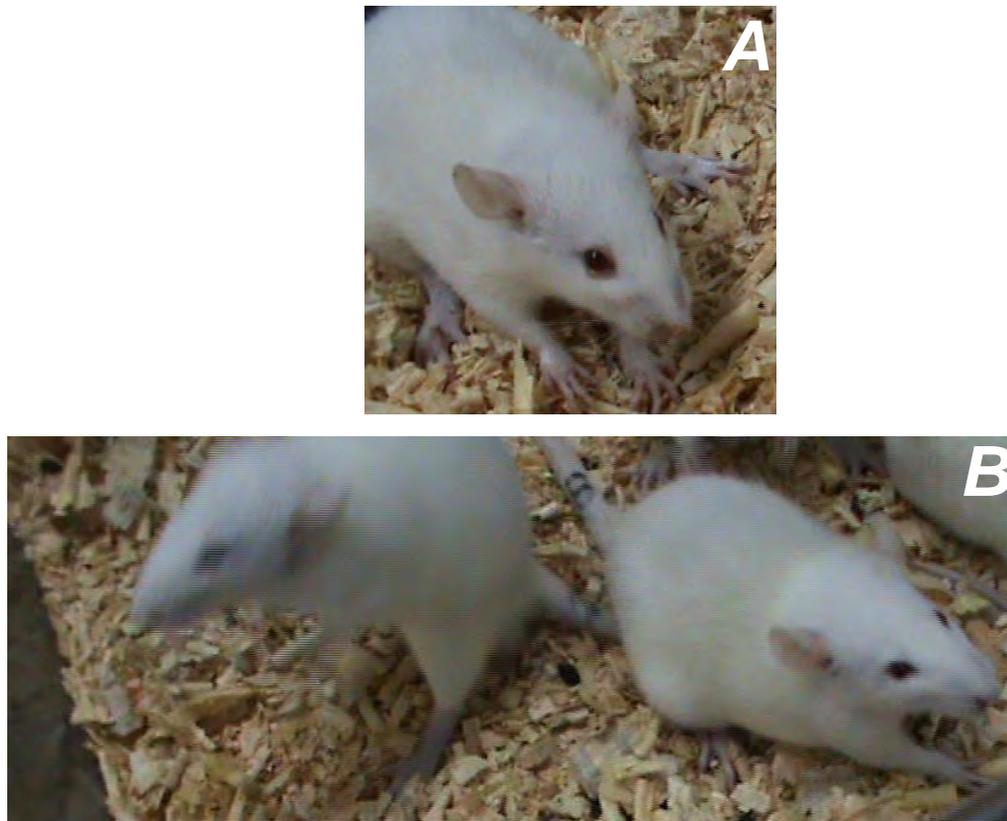


Figura 5.6. Instantánea de la fase aguda del modelo experimental. En **A)** se observa el efecto de edema orbital y **B)** del movimiento anormal de cabeza.

Para el tercer día se encontraban aparentemente recuperadas, capaces de tomar agua ad libitum e ingerir su alimento por sí solas con tendencia a consumirlo con mayor avidez. Sin embargo, en éste período aumentó su agresividad mostrada al enfrentar al experimentador durante la limpieza de su contenedor. Su reflejo de huida se intensificó. Seguían presentando convulsiones débiles, espontáneas, esporádicas y de corta duración. Los animales aparentemente recuperados recaían constantemente, en algunos casos, en relación a su apetito, pasaban de ingerir su alimento impulsivamente a perder el interés en consumirlo, sin embargo, el reflejo de huida se mantuvo. En otros casos el reflejo de huida empezó a disminuir al igual que la impulsividad por ingerir alimento, siendo temerosas la mayor parte del tiempo y en algunas ocasiones agresivas, éste comportamiento continuo hasta por 100 días.

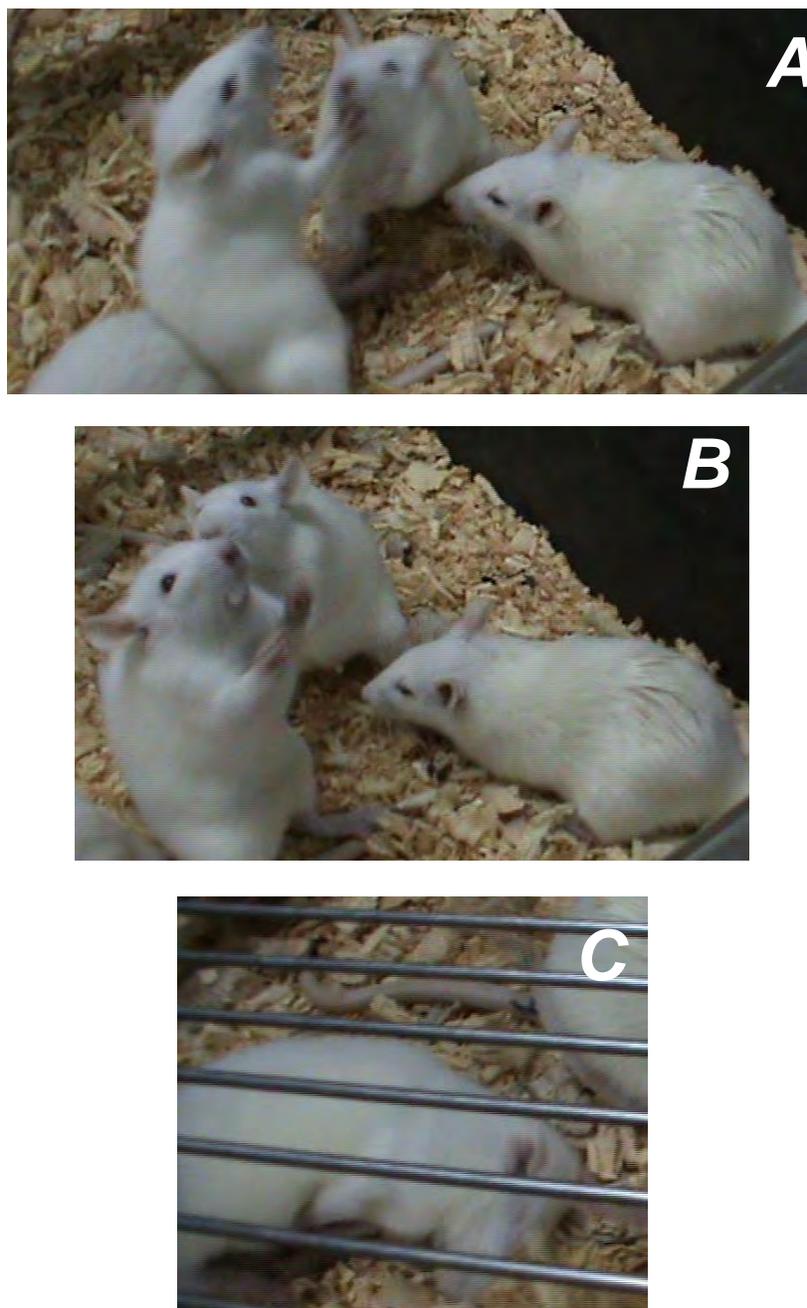


Figura 5.7. Instantáneas durante la fase aguda del modelo experimental. En **A)** y **B)** se inicia el “aura” (inmovilidad, ver página 9 y 11) en una de las tres ratas, 10 minutos antes de los primeros síntomas; así como la pérdida de control motriz en las dos restantes, 10 minutos después de los primeros síntomas. En **C)** el final de una intensa convulsión tónico clónica generalizada.

5.3. Análisis mediante técnica PET del daño en el sistema nervioso de la rata con epilepsia crónica

El análisis que a continuación se describe se basa en dos estudios microPET que realizamos como prueba de un estudio piloto. Como se menciona en secciones anteriores, el metabolismo energético es uno de los mecanismos biológicos involucrados en la epilepsia. Los trastornos epilépticos producen importantes alteraciones en el cerebro; la PET interictal se ha utilizado en diversos trastornos convulsivos con fines diagnósticos y de investigación; siendo la epilepsia del lóbulo temporal y del lóbulo frontal los trastornos más comúnmente estudiados^[66].

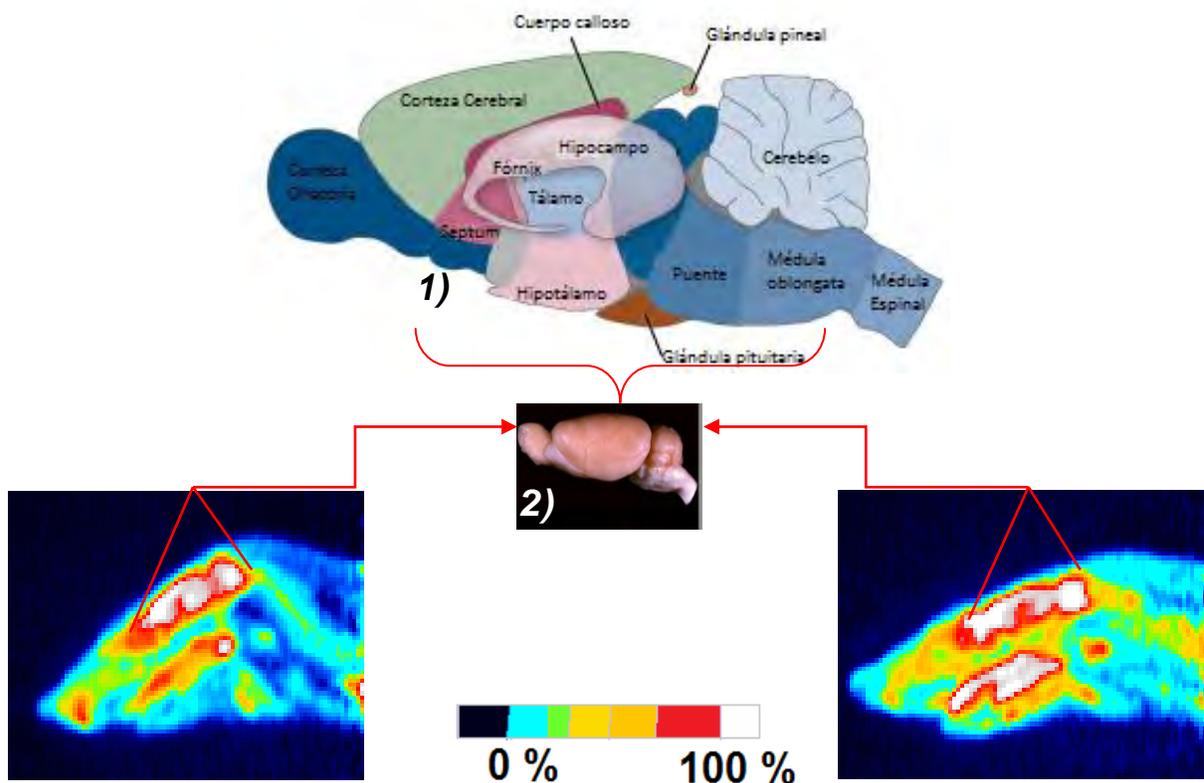


Figura 5.8. Vista sagital del cerebro de rata con epilepsia crónica. La imagen PET a la derecha pertenece a la rata epiléptica y la imagen PET a la izquierda pertenece a la rata control. Las zonas más brillantes (blancas) indican mayor captación de FDG. 1) Adaptada de ^[67]. 2) Adaptada de ^[68].

La mayoría de los estudios relacionados que se reportan en la literatura usando microPET y FDG son poco claros en cuanto a su metodología y, algunos de sus resultados parecen contradecirse respecto a los valores de captación en las mismas regiones anatómicas observadas, como

describiremos más adelante, en el capítulo 6 sección 3.

El primer estudio que realizamos fue hecho a una rata del grupo control de 101 días de edad y el segundo estudio fue hecho a una rata del grupo experimental, esto es, una rata con 56 días de epilepsia después de inducirle el SE, de la misma edad y peso semejante que la rata control. Los estudios se realizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. En la Figura 5.8, se observan imágenes PET que obtuvimos, la vista es un corte sagital del cerebro de la rata tratada (derecha) y de la rata control (izquierda). De éstas imágenes observamos que la captación es mayor en regiones como bulbo olfatorio, cerebro y cerebelo para ambos casos (control y epiléptica); y en glándulas salivales para el caso epiléptico.

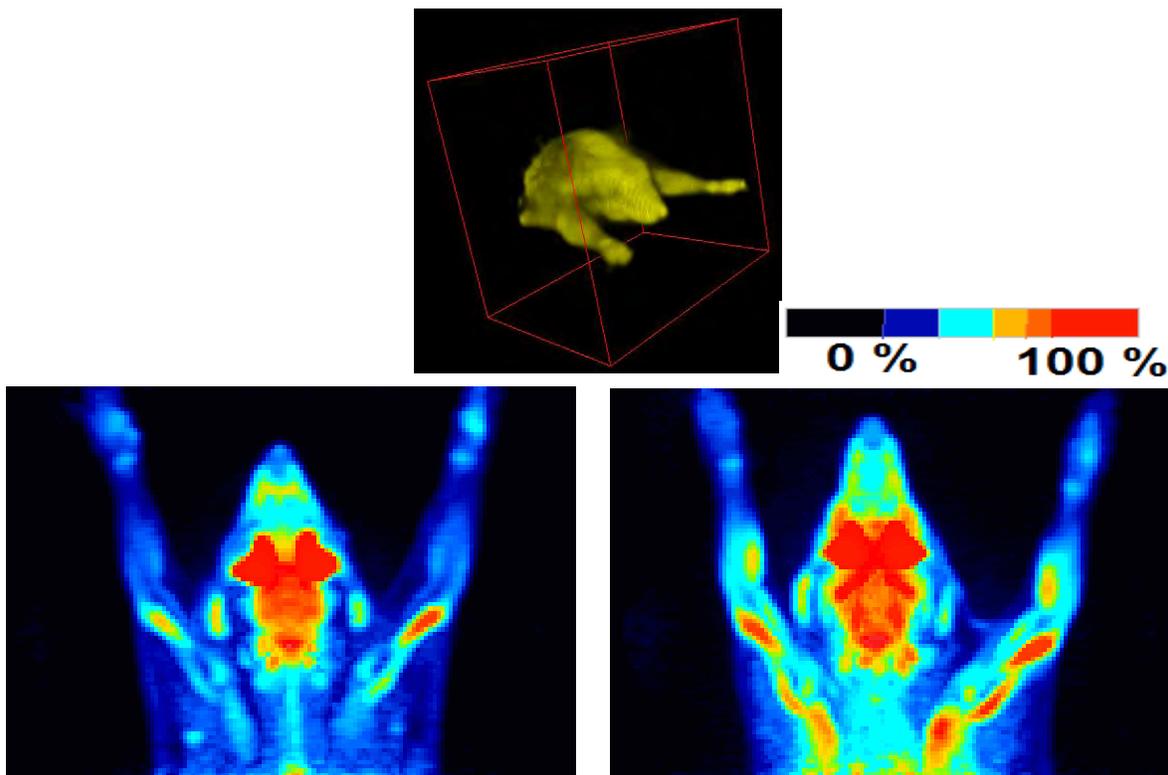


Figura 5.9. Vista coronal del metabolismo glucolítico global de la rata. Rata tratada (a la derecha) y rata control (a la izquierda). Imagen en 3D de la región corporal que fue escaneada (arriba centrada). La escala colorimétrica representa la intensidad de captación del radiofármaco, pues los niveles de intensidad son proporcionales a la concentración de FDG.

En la Figura 5.9, mostramos una vista coronal de la rata epiléptica (a la derecha) y de la rata control (a la izquierda), en éstas imágenes se aprecia el metabolismo glucolítico de la rata epiléptica y control. Se observa que la captación en general, es mayor en la retina, músculos sub orbitales y el encéfalo. La imagen céntrica es una vista 3D de superficie de la posición de la rata dentro del escáner.

Nos interesa enfocarnos en estructuras límbicas específicas del cerebro que están involucradas con el proceso de epileptogénesis y han sido reportadas en la literatura, tales como el hipocampo, el tálamo y la corteza entorrinal, principalmente. Sin embargo, con el pequeño tamaño del cerebro de una rata adulta cuyo diámetro axial es de alrededor de 15 mm, con estructuras de interés tales como el hipocampo, que tiene diámetros menores a 2 mm, y que además es una de la estructuras más grandes del cerebro^[69]; pero con la resolución espacial del microPET que es de 1.4 mm no es posible observar regiones más pequeñas que ésta resolución, convirtiéndose éste último en el principal factor limitante. Por lo que, la estrategia fue analizar zonas lo suficientemente grandes para observar con la resolución espacial que se tiene del escáner pero lo suficientemente pequeñas para que abarquen únicamente estructuras límbicas de interés, como lo son los cuerpos estriados.

En la Figura 5.10, se muestra la localización de los cuerpos estriados en los diferentes cortes (transversal, coronal y sagital) para la rata control y epiléptica. Para esta región no se observan cambios notorios en el metabolismo glucolítico de los cuerpos estriados de la rata epiléptica comparada a los del control. Por lo que, se calcularon perfiles de intensidad de las imágenes PET mediante el programa Image J, para los cortes transversal y coronal de los cuerpos estriados para intentar corroborar lo que se observa en las imágenes PET al cuantificar la intensidad de pixel/cm^2 como se muestra en la Figura 5.11, donde la línea roja representa el perfil de los cuerpos estriados de la rata epiléptica y la línea negra representa el perfil de intensidad en píxeles de los cuerpos estriados de la rata control.

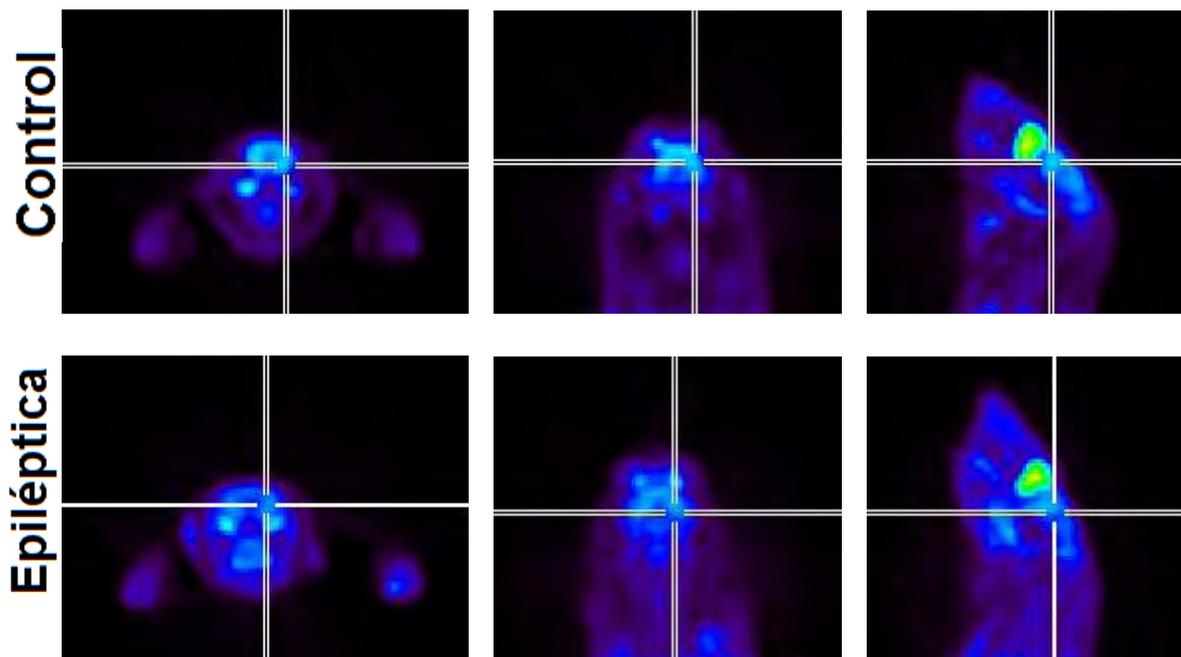


Figura 5.10. Cortes del cerebro de la rata control y tratada. Corte transversal (izquierda), corte coronal (centro) y corte sagital (derecha) del cerebro de la rata. El puntero indica la ubicación de los cuerpos estriados.

De la Figura 5.11, se observa que no hay diferencias evidentes en la intensidad de píxeles de los cuerpos estriados que se observan en las imágenes PET de la rata epiléptica y la rata control, para ninguno de los cortes realizados pues la tendencia de las curvas en ambos casos, es similar.

Por otro lado, es posible medir de forma directa los valores de captación FDG de las imágenes calculando regiones de interés por cm^2 (ROIs). En el Cuadro 5.1, se muestran éstos valores. Para compensar por la actividad metabólica global cerebral, los valores de la tasa glucolítica regional de cada ROI fueron normalizados ($\eta_{Control}, \eta_{Cronica}$) por la tasa metabólica glucolítica del cerebelo. Los valores $\eta_{Control}$ y $\eta_{Cronica}$ son expresados como un porcentaje (%) [Captación FDG = (ROI estudio/ ROI cerebelo) x 100]. Se eligió el cerebelo para normalización porque se conoce de estudios preliminares por autoradiografías y PET que su tasa metabólica glucolítica no es afectada en cualquiera de las tres fases que presenta el modelo experimental o durante el proceso de epileptogénesis, ver por ejemplo, las referencias: ^[83,89].

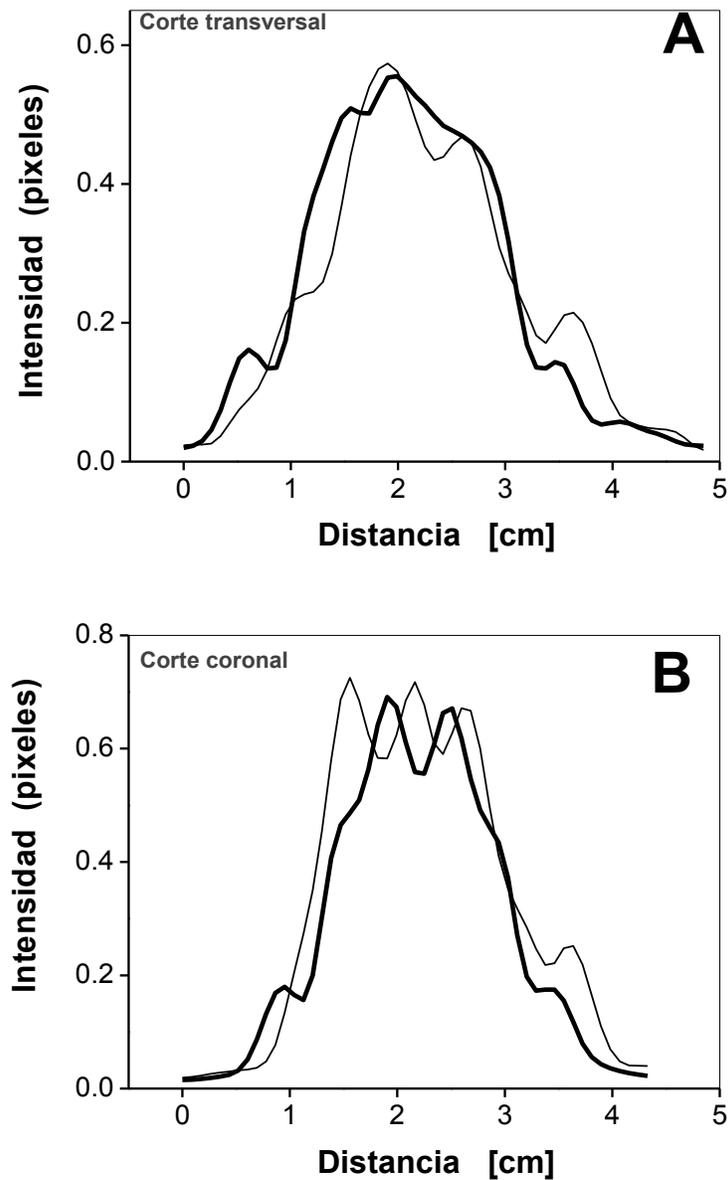


Figura 5.11. Perfiles de intensidad en píxeles de las imágenes PET enfocados principalmente en los cuerpos estriados del cerebro de la rata. **A)** perfil de un corte transversal sobre los cuerpos estriados. **B)** perfil de un corte coronal sobre los cuerpos estriados. La línea continua gruesa corresponde a la rata epiléptica y la línea continua delgada a la rata control.

Por técnicas de autoradiografía, Dubé y colaboradores^[89] en el 2001, reportaron un metabolismo de glucosa normal en la fase crónica de la epilepsia inducida, no sólo en el **cerebelo** y puente sino también en áreas cerebrales como la corteza entorrinal, sensorimotora, visual y en los **cuerpos estriados**.

Estructura cerebral	CONTROL	CRONICA	$\eta_{Control}$	$\eta_{Cronica}$
	$ROI [nCi/cm^3]$			
Cuerpo estriado izquierdo	2509.82 ± 528.54	2324.52 ± 315.31	104.85	105.95
Cuerpo estriado derecho	2509.78 ± 341.76	2339.07 ± 259	104.85	106.61
Cerebelo	2393.74 ± 351.74	2194.01 ± 311.96	100	100

Cuadro 5.1. Valores de captación de FDG en las imágenes PET para la rata control y la rata tratada. Los resultados fueron normalizados y representados por $\eta_{Control}$ y $\eta_{Cronica}$ [Captación FDG = (ROI estudio/ ROI cerebelo) x 100].

Mientras que, K. Goffin y colaboradores^[90] en el 2009 por microPET, encuentran diferencias en los valores de captación estándar que son mayores durante la fase crónica respecto al control en el **cerebelo**. Para los **cuerpos estriados** ésta diferencia es más pequeña (+12%) pero aún mayor que los valores obtenidos para el control.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que no hay diferencias evidentes en los valores de captación del metabolismo glucolítico de la fase crónica epiléptica respecto al control para los cuerpos estriados y el cerebelo. Aunque no es posible concluir en base a éste resultado por una exclusión estadística, es importante enfatizar el hecho de que los resultados fueron analizados bajo diferentes técnicas y en todas ellas se corroboraba lo mismo, que la captación FDG en los cuerpos estriados y el cerebelo, es normal respecto al control durante la fase crónica de la epilepsia, dicha observación ésta en acuerdo con lo reportado por Dubé y colaboradores^[89] en el 2001.

Respecto a otras áreas corticales involucradas con el proceso epileptogénico, observamos su metabolismo y comparamos con imágenes PET obtenidas por Guo y colaboradores^[83] en el 2009.

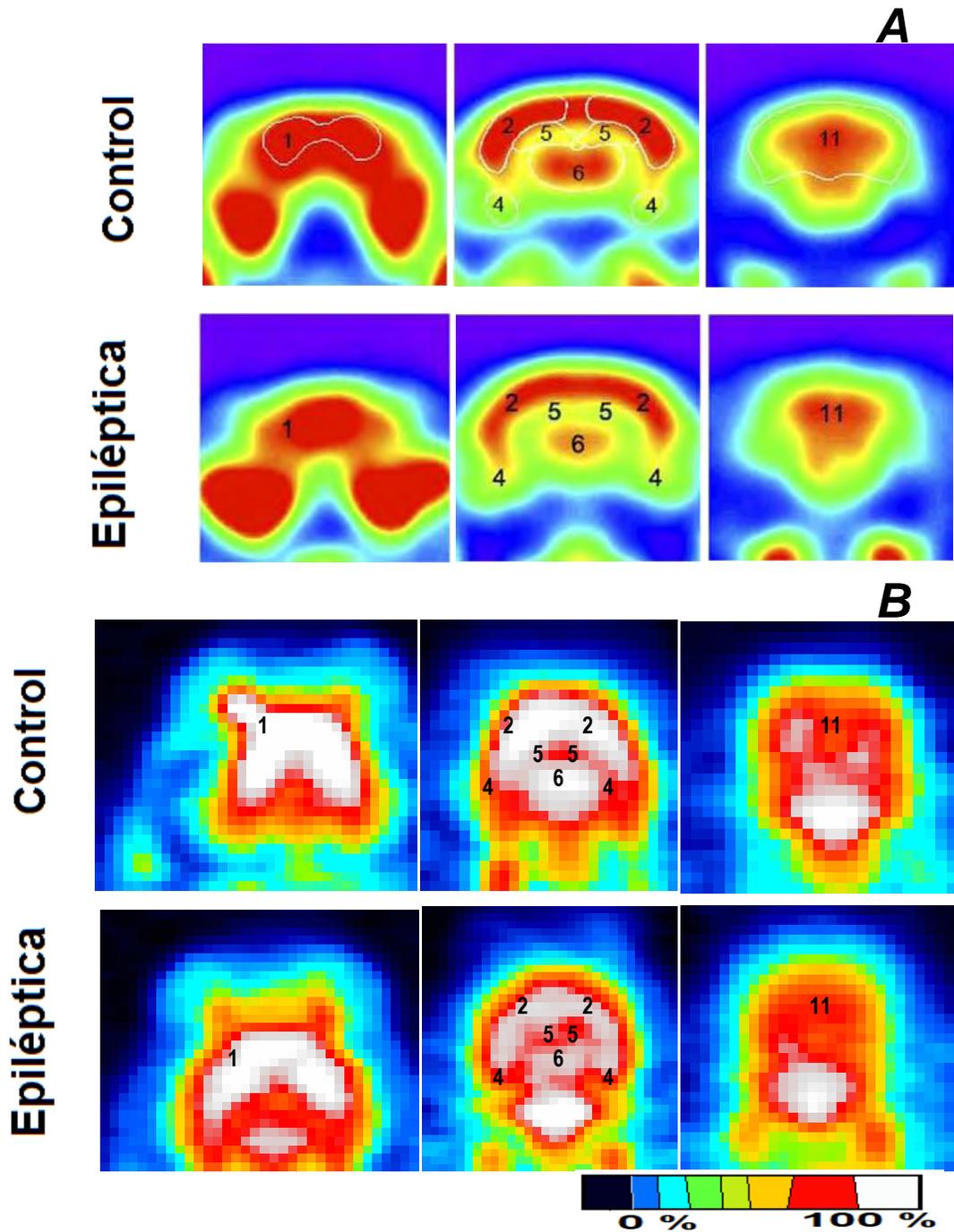


Figura 5.12. Rebanadas de vistas coronales del cerebro de rata. **A)** Resultados obtenidos por Guo y colaboradores^[83] para la fase crónica de la rata tratada. **B)** Resultados que obtuvimos para la fase crónica de la rata tratada donde los colores más brillantes (blanco) indican mayor captación del radiofármaco. Los números, (1) corresponde a la región prefrontal, (2) la corteza sensorimotora, (4) la corteza piriforme, (5) el hipocampo, (6) el tálamo y (11) el cerebelo. La escala colorimétrica es proporcional a los niveles de intensidad en función de la concentración del radiofármaco, captación FDG.

En la Figura 5.12, se muestran rebanadas de vistas coronales del cerebro de la rata tratada y control. Las imágenes de la Figura 5.12A fueron obtenidas por el equipo de trabajo de Y. Guo, quienes obtuvieron no sólo para la fase crónica, que son los cortes que se muestran, sino también para la fase aguda y latente. Sin embargo, tomamos las que son de nuestro interés para fines comparativos, ya que, en nuestro trabajo sólo hicimos escaneos en la fase crónica de la epilepsia. Los cortes de la Figura 5.12B son los resultados que obtuvimos y las regiones que se observan corresponden a las marcadas en la Figura 5.12A; con ésta Figura intentamos comparar nuestros resultados con los reportados por Y. Guo. En las imágenes: (1) indica la región prefrontal, (2) la corteza sensorimotora, (4) la corteza piriforme, (5) el hipocampo, (6) el tálamo y (11) el cerebelo.

En su mayoría, las estructuras cerebrales antes mencionadas son demasiado pequeñas para la limitante de la resolución espacial del microPET y por efectos de volumen parcial se podrían confundir los resultados al tomar ROIs, dicha limitante se reduce al fusionar las imágenes PET con imágenes de resonancia magnética (MRI) o CT. Como lo hicieron Guo y colaboradores, al combinar sus imágenes MRI/PET. Para nuestro estudio, no fue posible contar con un resonador magnético o CT.

Sin embargo, de los cortes coronales del cerebro que presentamos con nuestro estudio, no se observan diferencias marcadas en cuanto a un patrón hipo o hiper metabólico glucolítico de la rata con epilepsia crónica (56 días después del SE) respecto al patrón metabólico glucolítico de la rata control, excepto para la corteza sensorimotora, hipocampo y tálamo, que se aprecian ligeramente hipometabólicas respecto al control. Guo y colaboradores, reportaron que para la fase crónica (42 días después del SE), los niveles en los valores de captación FDG en las regiones presentadas, son similares a los niveles obtenidos para el control, excepto para el hipocampo y tálamo que son hipometabólicos. Para ésta fase, los valores de captación que midieron, se recuperaron casi hasta llegar a los valores iniciales antes de inducirles el SE a los animales, excepto hipocampo y tálamo que persistieron en un hipometabolismo durante todo el proceso de epileptogénesis pero que mejoró bastante comparado con los valores que obtienen en la fase aguda y latente donde encuentran un hipometabolismo muy marcado en éstas y otras regiones corticales.

5.4. Efecto de la epilepsia sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético

Estudiamos las propiedades mecánicas del ME de animales con ELT inducida para dos estadios o periodos (latente y crónico) mediante el protocolo de estimulación mencionado, con el objetivo de analizar los posibles cambios en índice de fatiga, tren de tétanos y recuperación de músculos afectados por esta alteración neurológica. Debe aclararse que los diferentes estadios involucran diferentes proporciones (peso y longitud) del ME dependientes de la edad de los animales tratados como se verá más adelante, Cuadro 5.2 y 5.3.

El protocolo empleado para el estudio de las propiedades mecánicas de los músculos con epilepsia latente, es el de pilocarpina. Mientras que, para los músculos con ELT en un estadio crónico usamos el protocolo *epilepsia crónica*.

5.4.1. Efecto de la epilepsia en el estadio latente sobre en el índice de fatiga del músculo esquelético

La rata con epilepsia latente presentaba un alto grado de desnutrición como resultado de las intensas crisis convulsivas y de los cambios conductuales ocasionados por las mismas, hecho circunstancial que agrego una variante al experimento. Por lo que, para discernir entre los cambios observados por epilepsia y/o desnutrición, realizamos experimentos con músculos de ratas desnutridas cuyas características describiremos en los siguientes párrafos, cabe mencionar que esto último no formaba parte de los objetivos porque la desnutrición del animal ocasionada por la inducción del status epiléptico fue una variante inesperada e importante de considerar.

El índice de fatiga (B/A), es el cociente de la fuerza registrada al inicio de la relajación entre la fuerza registrada al final de la contracción. La Figura 5.13A muestra cuatro tétanos consecutivos en donde se marca el final de la contracción con la letra A y el principio de la relajación con la letra B. Los músculos pertenecen a ratas control, epiléptica y desnutrida, en donde se pueden apreciar diferencias importantes en sus propiedades mecánicas.

En el caso del músculo de la rata con epilepsia latente (trazo continuo delgado), la rata pesó 160 g (45 días de edad) al momento de inyectar la pilocarpina. En éste caso en particular, la rata perdió el 40%

de su peso al séptimo día cuando cursaba la fase latente. Para el músculo control (trazo continuo grueso), la rata pesó 160 g (45 días de edad), su músculo EDL es 3.1 cm y 71 mg. El grado de desnutrición de la rata con epilepsia latente se observa en un músculo de 2.7 cm y 43 mg de peso. Estos músculos fueron comparados con músculos pertenecientes a ratas desnutridas de 60 y 70 días de edad, con 195 y 205 g respectivamente. La desnutrición de estos últimos animales fue por 21 días, inicialmente tenían un peso corporal promedio de 250 g, lo que implica una pérdida de peso del 21% aproximadamente, (detalles adicionales de éste modelo se describen en la sección 5.4.2).

En la Figura 5.13A también se aprecia la tendencia de pérdida de fuerza después de alcanzar un máximo, la pendiente de la curva para el caso epiléptico y desnutrido es mayor que en el control. Lo que implica una mayor pérdida de fuerza respecto al tiempo.

En la Figura 5.13B se grafica lo que se muestra esquemáticamente en 5.13A, el índice de fatiga para los cuatro tétanos mostrados. Los resultados se presentan el promedio \pm desviación estándar, con $n=4$ para músculos controles así como desnutridos y $n=2$ para músculos con epilepsia latente. El índice de fatiga es menor a 1 en todos los casos y presentan la misma tendencia controles y desnutridos, sin embargo, en el músculo de la rata epiléptica, es la mitad de lo que se obtiene en el control y desnutrido, indicando una mayor fatiga del epiléptico en comparación con el control y desnutrido además de que el epiléptico disminuye a la mitad su fuerza de contracción.

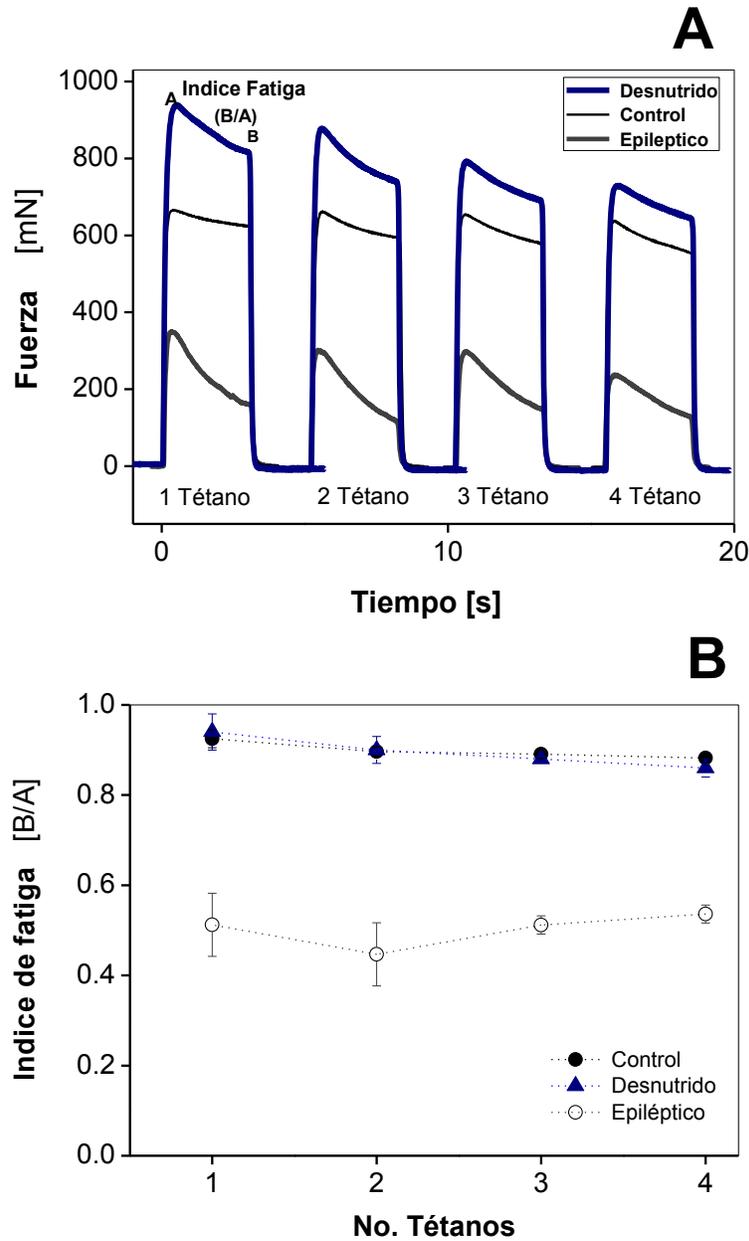


Figura 5.13. Efecto de la Epilepsia latente (con 7 días de evolución) y desnutrición sobre la fuerza de contracción y pérdida de fuerza del ME en rata. **A)** Experimento representativo del efecto de la epilepsia y de la desnutrición sobre la estimulación tetánica (3s, 90V, 75Hz). Control en línea negra delgada. **B)** Índice de fatiga promedio del ME de ratas control \pm la desviación estándar (SD) representada por las barras de error. Para $n=4$ músculos de rata desnutrida y, $n=2$ músculos de rata epiléptica.

5.4.2. Efecto de la epilepsia latente en la fatiga y recuperación del músculo esquelético

Para estudiar el efecto de la epilepsia sobre ME en una fase temprana se usaron músculos EDL de rata de 52 días que después de sobrevivir al status epiléptico, mostró una excesiva pérdida de peso corporal (40%), las crisis epilépticas que presento después del status fueron de intensidad moderada y espontáneas con una duración de 1 minuto en promedio. La rata en cuestión mostró mejorías en cuanto a su recuperación después de la fase aguda pero empezó a recaer y perder bastante peso, por lo que fue necesario sacrificarla y hacer los registros.

Posteriormente, para descartar que lo observado en los registros electrofisiológicos (Figura 5.14. **C y D**) del ME de la rata epiléptica, fuese debido al alto grado de desnutrición, se consiguieron animales de características similares a los del grupo control, y que presentaban un 62% de desnutrición global y 22% de disminución en peso corporal. Éstos animales fueron donados por el médico Ricardo Tonatiuh Ramírez Oseguera mediante su proyecto doctoral. Sin embargo, no fue posible que fueran exactamente de la misma edad que los del grupo control, tenían en promedio 20 días más y 30 g de peso corporal mayor. El modelo de desnutrición que siguió Ricardo T., para aplicar a estas ratas fue crónico durante 21 días y con una dieta hipocalórica e hipo proteica, ya que les proporcionó el alimento estándar (Lab Chow) en menor cantidad, 50% menos del alimento que debe consumir una rata adulta normal.

Uno de los registros obtenidos de rata desnutrida se muestran en la Figura 5.14.**E y F**, cuya fuerza de contracción resultó mayor, lo cual se espera, pues son animales más grandes implicando dimensiones mayores en sus músculos EDL (Cuadro 5.2). Por otro lado, existen semejanzas importantes del grupo experimental (ratas desnutridas) comparadas con el grupo control, tales como el índice de fatiga analizado en la sección 5.4.1 (Figura 5.13.**B**) y las que a continuación describimos, fatiga y recuperación. En la Figura 5.14, se muestran experimentos representativos de músculos control (trazo en negro), epiléptico (trazo en rojo) y desnutrido (trazo en azul) para una estimulación mediante un tren tetánico y tétanos después del tren con períodos de 5 minutos de descanso entre ellos. En el caso de la fatiga, los músculos desnutridos se fatigan igual que el control, esto es, que al sexto tétano llegan al

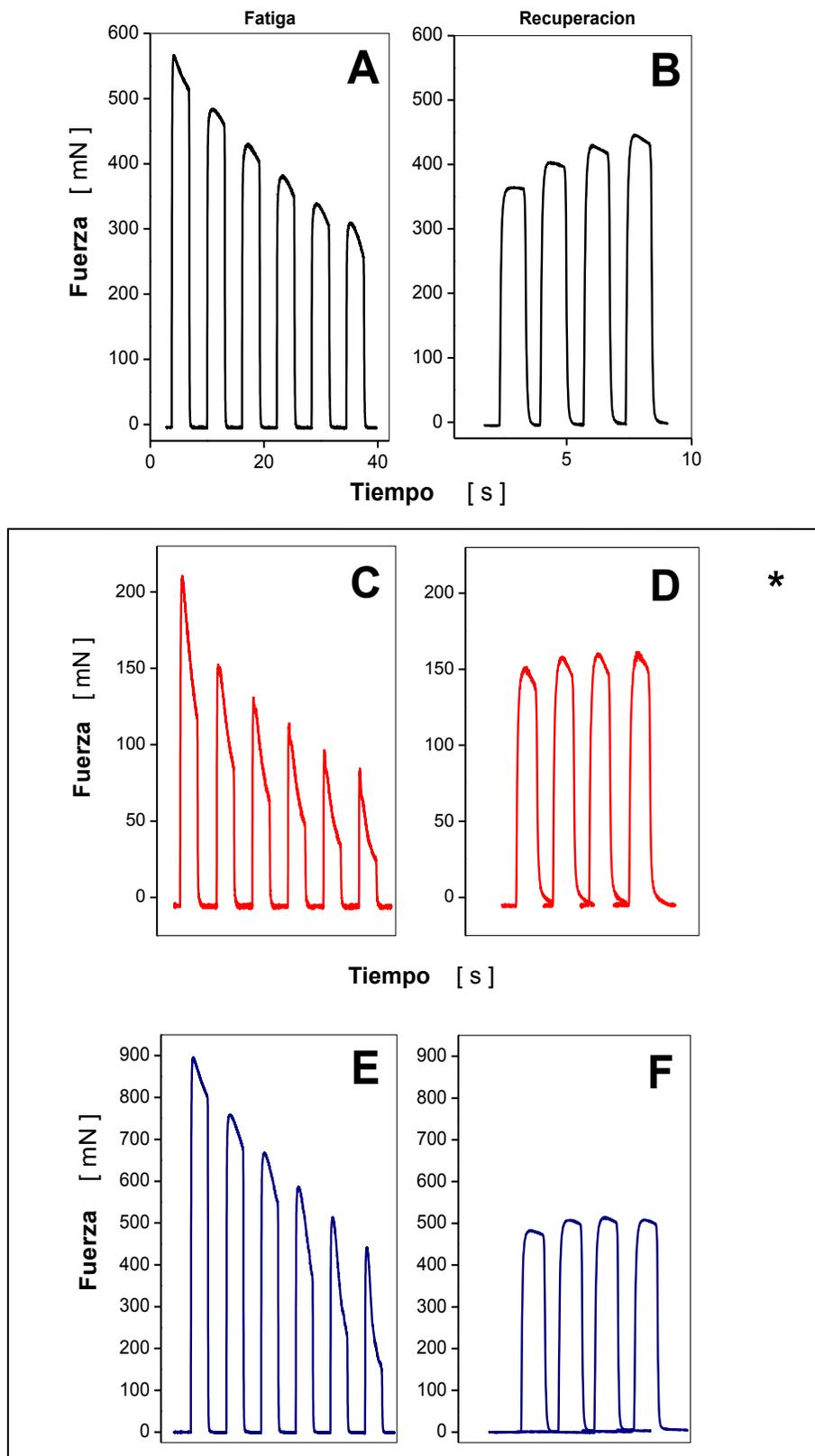


Figura 5.14. Experimentos representativos del efecto de la epilepsia latente y desnutrición sobre la estimulación tetánica repetida (tétanos de 3s, 0.333 Hz) y recuperación (tétanos de 1s) del ME de rata joven. **A)** y **B)**, fatiga y recuperación de músculo control. **C)** y **D)**, fatiga y recuperación de músculo de rata con epilepsia de 7 días. **E)** y **F)**, fatiga y recuperación de músculo de rata desnutrida. *Desnutrición de la rata epiléptica, variante circunstancial.

5.4.2. Efecto de la epilepsia latente en la fatiga y recuperación del ME

<i>n</i> = número de músculos EDL	Músculos EDL	Longitud Promedio [cm]	Peso Promedio [mg]	Índice Promedio de Fatiga	Ganancia de fuerza promedio tetánica en Rec. [%]
n=4	Control (Ratas de 45 días de edad)	2.8 ± 0.05	70 ± 0.05	0.897 ± 0.013	77
n=2	*Epilepsia latente (Ratas de 45 días de edad)	2.8 ± 0.05	$44 \pm 0.05 \downarrow$	0.502 ± 0.045 \downarrow	84 \uparrow
n=4	Desnutrido (Ratas de 65 días de edad)	3.2 ± 0.05	85 ± 0.05	0.895 ± 0.023	57 \downarrow

CUADRO 5.2 Características y Resultados notables de los experimentos realizados con músculos control, desnutridos y con epilepsia latente* (más un alto grado de desnutrición).

52% de la fuerza generada respecto a su primer tétano del tren. Mientras que, el epiléptico se fatiga un 8% más rápido para este mismo punto.

En el Cuadro 5.2, se resumen las características físicas de los animales tratados, así como parte de los resultados obtenidos hasta esta sección. Nótese que hay cambios significativos en el músculo con epilepsia latente. Sin embargo, tales cambios se deben principalmente al grado de desnutrición del animal, pues el peso del músculo EDL disminuyó a la mitad así como su fuerza de contracción. Por otro lado, en los experimentos con músculos desnutridos se observa una tendencia menor de recuperación (57%) después de un tren de tétanos, lo cual también se esperaría obtener en los músculos epilépticos. Sin embargo, esto no ocurre así, existe una mejor recuperación en músculos epilépticos (84%). Por lo tanto, esta tendencia en la recuperación es producida por el efecto de epilepsia y no por desnutrición.

En la Figura 5.15, graficamos el promedio de los experimentos mostrados la Figura 5.14., obtuvimos que en la estimulación tetánica repetida, la fuerza promedio contráctil para el primer tétano es mayor en el grupo control (F=666 mN) que en el grupo experimental (F=204 mN), esto se explica

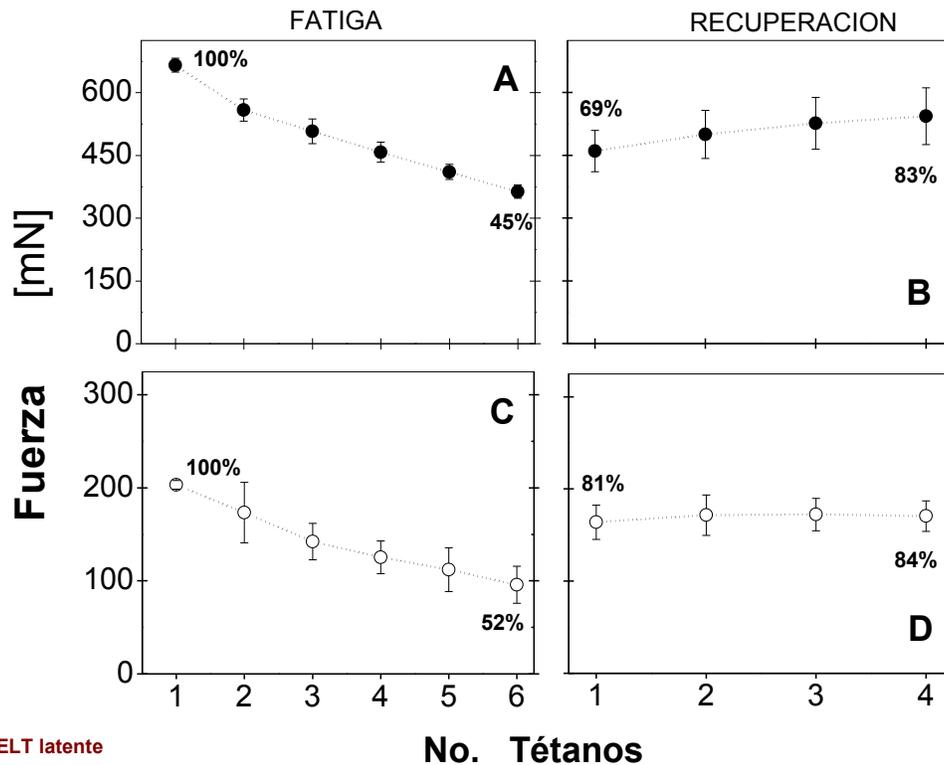


Figura 5.15. Fuerza promedio en la estimulación tetánica (fatiga y recuperación) \pm la desviación estándar (SD) del ME con epilepsia latente. **A)** y **B)** fatiga (3s, 90V, 75Hz) y recuperación (1s, 90V, 75Hz) de músculos controles; fuerza promedio \pm SD, n=4. **C)** y **D)** fatiga (3s, 90V, 75Hz) y recuperación (1s, 90V, 75Hz) de músculos con epilepsia de 7 días; fuerza promedio \pm SD, n=2.

cómo ya lo mencionamos, por la desnutrición del animal cuyo peso del músculo también disminuyó a la mitad. Sin embargo, se recupera en promedio 12% más rápido el músculo epiléptico, este cambio se explica por el proceso de epilepsia.

En la Figura 5.16, se muestra la fuerza normalizada respecto al control, para la fatiga y recuperación. Se observa que el epiléptico se fatiga más rápido al llegar al sexto tétanos del tren y como se normaliza respecto al control, en la recuperación, no es evidente la tendencia de recuperación más satisfactoria que el control, debido a que la magnitud de la fuerza generada en músculos epilépticos es la mitad de la fuerza músculos controles.

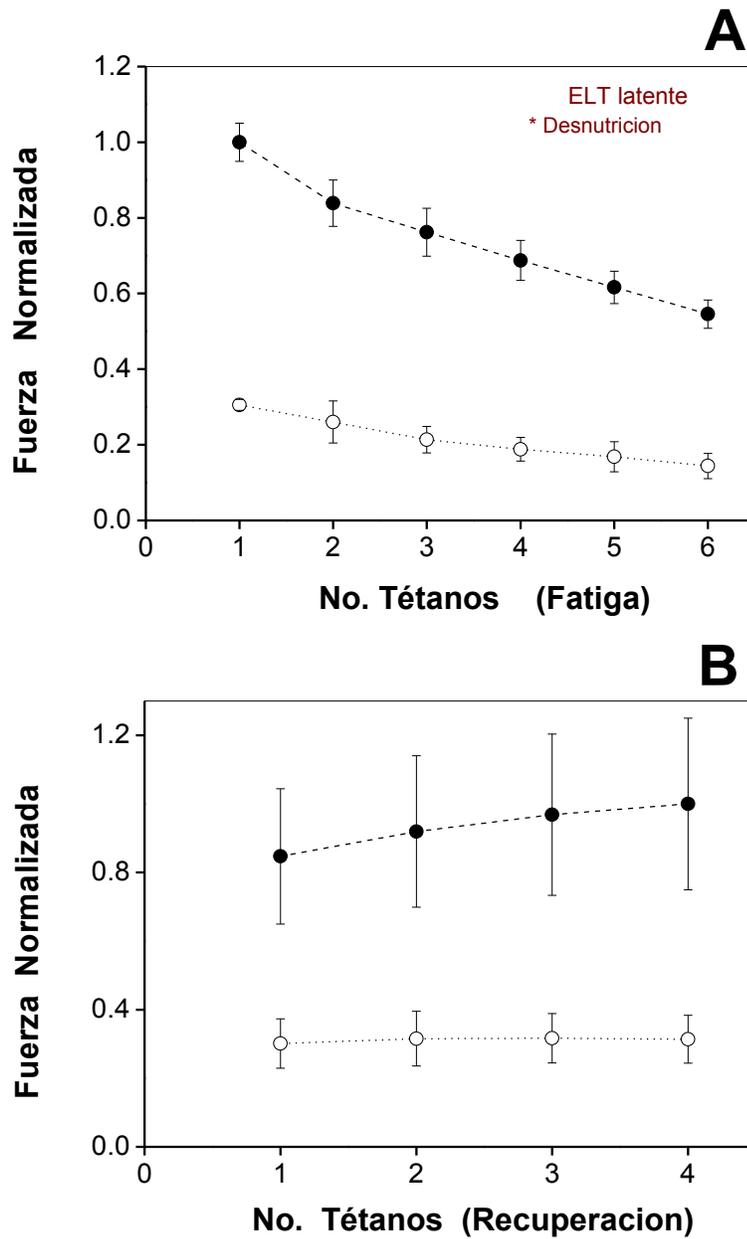


Figura 5.16. Fuerza normalizada respecto al control de la fatiga y recuperación del ME en rata joven con epilepsia latente. **A)** Comparación de la pérdida de fuerza en grupo experimental (○) Vs. grupo control (●). **B)** Comparación de la fuerza recuperada en grupo experimental (○) Vs. grupo control (●); (Promedio \pm SD, $n=2,4$).

5.4.3. Efecto de la epilepsia de estadio crónico en el índice de fatiga del músculo esquelético.

En la Figura 5.17.A y B, se muestran experimentos representativos que obtuvimos para un musculo control (línea continua gruesa) y, con epilepsia crónica (línea continua delgada), en los que se aprecia la tendencia en la pérdida de fuerza en un tétano después de alcanzar su máximo. En los tétanos mostrados se combinó la frecuencia de estimulación, los primeros dos tétanos fueron a 45 Hz y los dos restantes a 75 Hz (esto se explicó a detalle en el protocolo de estimulación, Sección 4.7). Para ambas frecuencias, la fuerza máxima alcanzada es mayor en el epiléptico, siendo más evidente a 75 Hz. En la Figura de abajo (5.17.C y D), se grafica el promedio de los experimentos representados en A) y B), el índice de fatiga de músculos controles y de músculos de rata con ELT con 99 días de evolución. Los músculos del grupo control pertenecían a rata de 144 días de edad cuyo peso corporal fue de 428 g. La rata epiléptica tenía 144 días de edad y 410 g de peso.

El índice promedio de fatiga resultó menor en músculos epilépticos para ambas frecuencias de estimulación, siendo más evidente a 45 Hz. Esto nos habla de una tendencia a fatigarse más rápido resultado del proceso de epilepsia crónica dado que las dimensiones del músculo en promedio son las mismas, Cuadro 5.3.

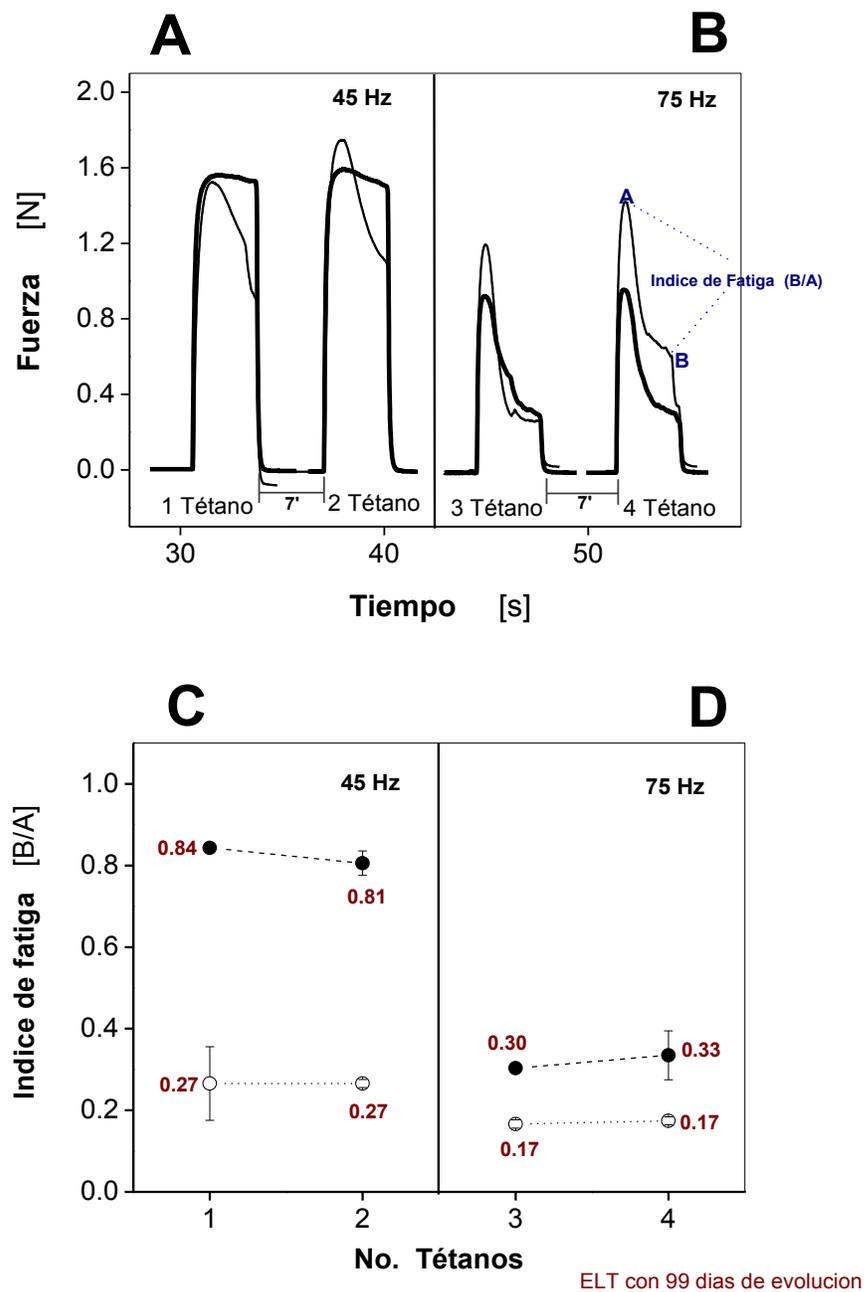


Figura 5.17. Efecto de la Epilepsia crónica sobre la fuerza de contracción y pérdida de fuerza del ME en rata. Experimento representativo del efecto de la epilepsia sobre la estimulación tetánica del ME (3s, 90V), **A)** 45 Hz y **B)** 75Hz. El experimento en línea continua delgada representa un músculo EDL de rata con 99 días después de inducir el status epiléptico. El control se muestra en línea continua gruesa. Índice de fatiga promedio del ME de ratas del grupo Control (●) y con epilepsia de 99 días (○), **C)** 45 Hz y **D)** 75 Hz; (Promedio \pm SD, n=3,4).

5.4.4. Efecto de la epilepsia crónica en la fatiga y recuperación del músculo esquelético

Para estudiar el efecto de la epilepsia en un estadio avanzado sobre las propiedades mecánicas de la fatiga y recuperación en el ME, se usaron para el grupo control, músculos EDL de rata adulta de 144 días con peso corporal promedio de 428 g y para el grupo experimental se usaron músculos EDL de rata adulta de 144 días con peso corporal promedio de 410 g que presentaban 99 días de evolución de epilepsia.

En la Figura 5.18, se muestra un experimento representativo de un músculo con epilepsia crónica para una estimulación tetánica repetida y después de ésta. En la Figura 5.19, se grafica lo observado en la Figura anterior, la fuerza promedio para los dos casos, control y epiléptico.

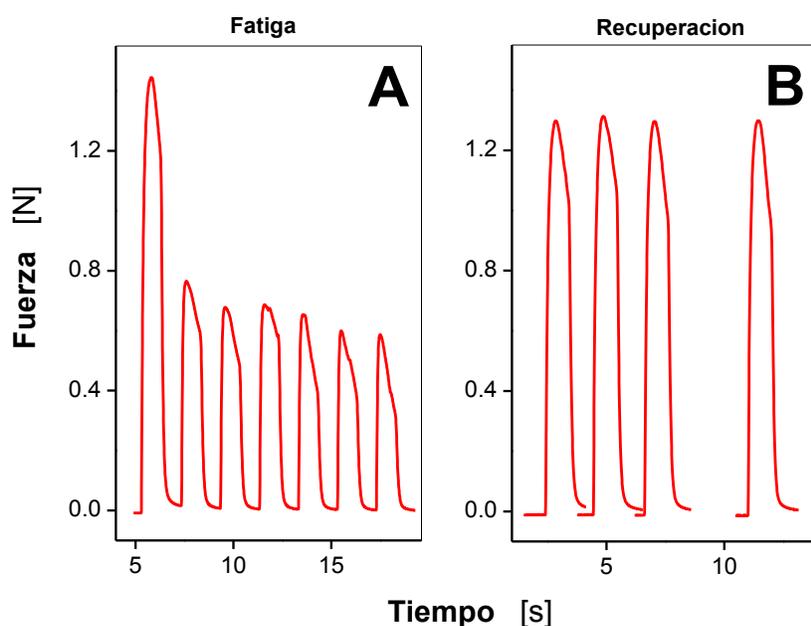


Figura 5.18. Experimentos representativos del efecto de la epilepsia crónica sobre la estimulación tetánica repetida (1s, 90V, 75Hz) y recuperación (1s, 90V, 75Hz) del ME de rata adulta. **A)** y **B)**, fatiga y recuperación de músculo de rata con epilepsia.

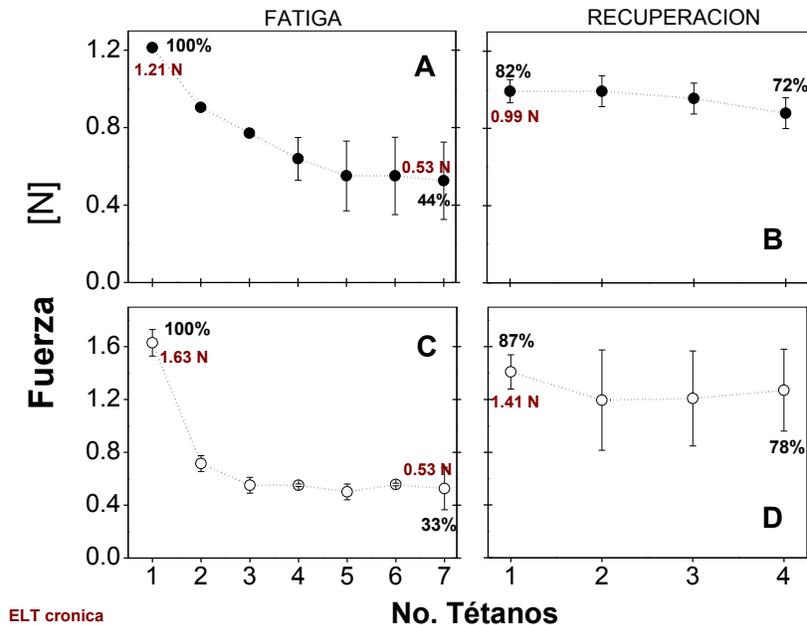


Figura 5.19. Fuerza promedio en la estimulación tetánica (fatiga y recuperación) del ME con 99 días de epilepsia desarrollada. **A)** y **B)** fatiga (1s, 90V, 75Hz) y recuperación (1s, 90V, 75Hz) de músculos controles; promedio \pm SD, $n=3$. **C)** y **D)** fatiga (1s, 90V, 75Hz) y recuperación (1s, 90V, 75Hz) de músculos con epilepsia de 99 días; promedio \pm SD, $n=4$.

De la Figura 5.19, el aumento en la fuerza promedio de los músculos epilépticos es evidente en el primer tétano de fatiga y de recuperación. Nótese que en el séptimo tétano de la fatiga, la magnitud de la fuerza de músculos epilépticos es igual al control. Sin embargo, en este punto se fatiga más rápido el epiléptico en un 11%. Por otro lado, en la recuperación, aunque ambos grupos comienzan a partir de la misma magnitud de fuerza obtenida en el último tétano del tren, el grupo de músculos epilépticos alcanza mayor fuerza de contracción con una clara tendencia a recuperar más satisfactoriamente la fuerza inicial antes de la fatiga. En resumen, en esta Figura, los músculos del grupo control se fatigan al 44% en el séptimo tétano respecto del tétano inicial, es decir, la fuerza residual es del 56% y la recuperación después de la fatiga en el primer tétano es 82%. Mientras que, para el cuarto tétanos recupera el 72% de la fuerza de contracción; ver Figura 5.19.A y B. Los músculos del grupo experimental se fatigan al 33% en el séptimo tétano respecto del tétano inicial y, la recuperación después de la fatiga, en el primer tétano en el grupo experimental es 87% respecto del tétano inicial de

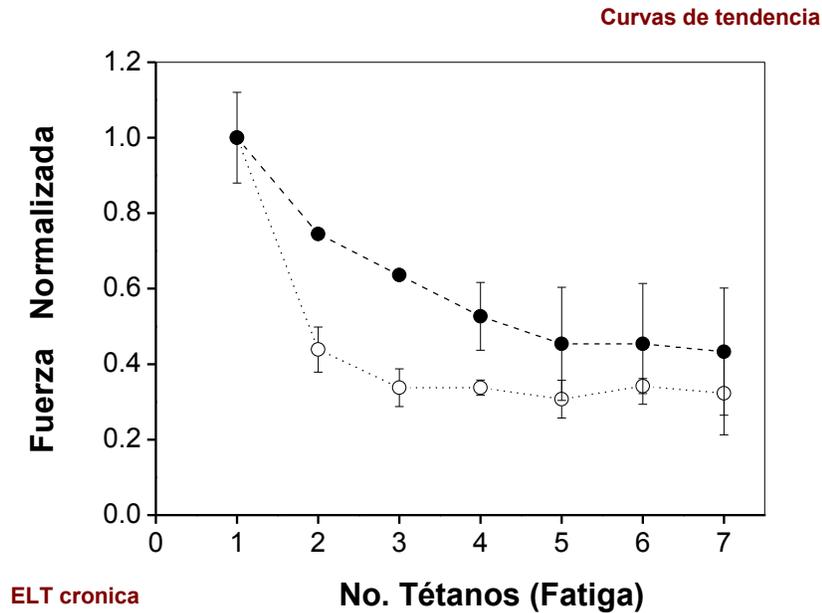


Figura 5.20. Fuerza normalizada respecto a su tétano inicial de la fatiga del ME en rata adulta con epilepsia de 99 días de evolución. Curvas de tendencia en la pérdida de fuerza (fatiga) en grupo experimental, promedio \pm SD, $n=4$, (○) Vs. grupo control, promedio \pm SD, $n=3$, (●).

la estimulación tetánica repetida. Para el cuarto tétanos después de la fatiga es 78%; ver Figura 5.19.C y D.

En la Figura 5.20, se muestra la fuerza promedio normalizada respecto a su primer tétano de fatiga, por lo que, al normalizarlo de esta forma, lo que nos interesa mostrar es la tendencia del caso epiléptico en un tren de tétanos, presentando una tendencia a fatigarse más rápido que el control, es decir, la pérdida de fuerza en un tren tiende a ser más rápido en músculos epilépticos. Sin embargo, como ya hemos visto en gráficas anteriores, la recuperación de fuerza en tétanos individuales con períodos suficiente de descanso entre ellos es más satisfactoria y mayor en magnitud. Esto último se vuelve a evidenciar en la Figura 5.21, donde ahora las curvas están normalizadas respecto al control. Hay un aumento en la fuerza de contracción, alrededor del 34% en los músculos epilépticos para los primeros tétanos de fatiga y recuperación.

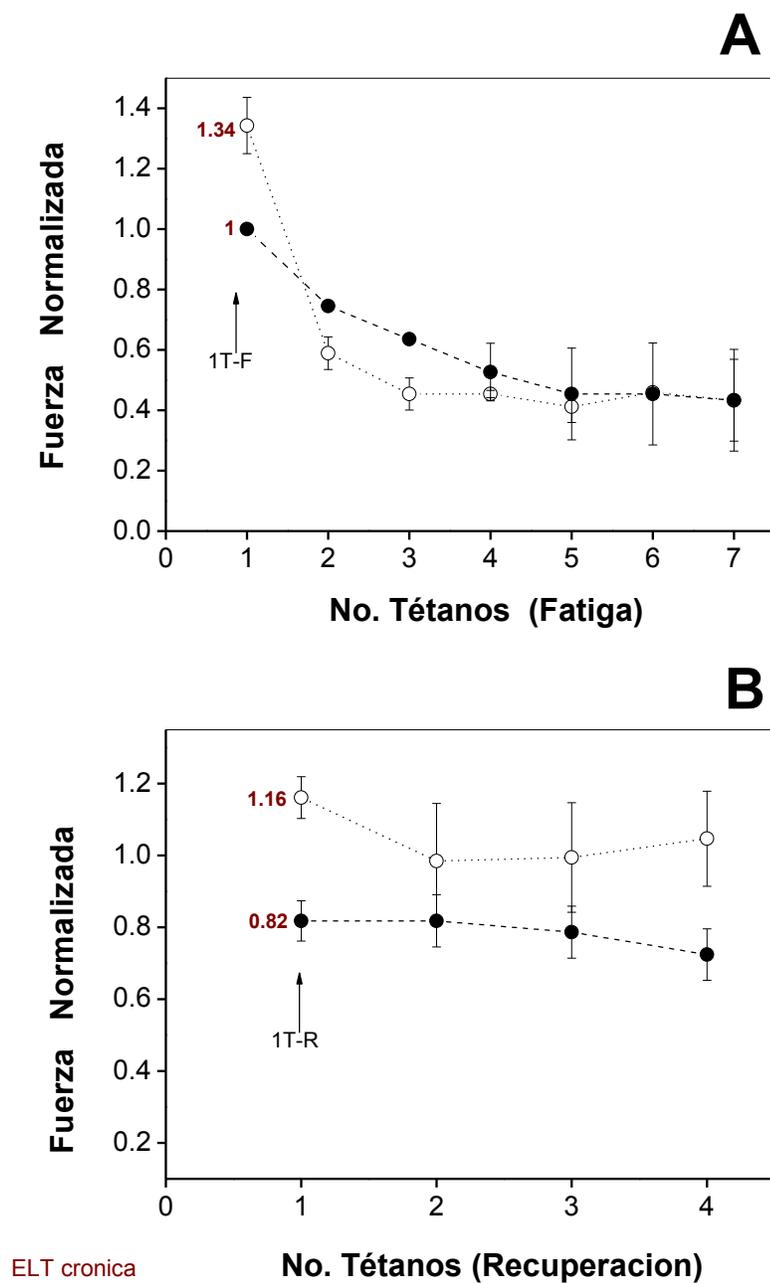


Figura 5.21. Fuerza normalizada respecto al tétano inicial del control de la fatiga y recuperación después de ésta en el ME de rata adulta con epilepsia crónica. **A)** Comparación de la pérdida de fuerza en un tren de tétanos para el grupo epiléptico Vs. grupo control. Fuerza promedio de la recuperación del ME en el grupo control. **B)** Comparación de la fuerza recuperada en el grupo epiléptico (○) Vs. grupo control (●); promedio \pm SD, $n=4,3$. La notación 1T-F = primer tétano de fatiga y, 1T-R = primer tétano de recuperación.

5.4.4. Efecto de la epilepsia crónica en la fatiga y recuperación del ME

Músculos EDL	Longitud Promedio [cm] ± 0.05	Peso Promedio [mg] ± 0.05	Índice Promedio de Fatiga a 75 Hz	Fuerza Tetánica Normalizada (respecto al control)		Ganancia de fuerza promedio en primer Tétano de Recuperación [%]
				Fatiga 1T-F	Recup. 1T-R	
Control, n=3 (Ratas de 144 días de edad)	3.9	140	0.32 ± 0.04	1	0.82	82
Epilepsia crónica, n=4 (Ratas de 144 días de edad)	3.8	138	0.17 ± 0.01 ↓	1.34 ↑	1.16 ↑	87 ↑

CUADRO 5.3 Características y Resultados notables de los experimentos realizados con músculos control y con epilepsia crónica. La notación **1T-F** = primer tétano de fatiga y, **1T-R** = primer tétano de recuperación.

En el Cuadro 5.3, se resumen las características físicas de los animales tratados así como parte de los resultados presentados en las graficas anteriores. Dado que las dimensiones de los músculos EDL de los animales tratados son aproximadamente las mismas, podemos mostrar con los resultados obtenidos que el proceso de epilepsia crónica ocasiona cambios en las propiedades mecánicas analizadas, se fatiga más pero tiende a generar una mayor fuerza de contracción y la recuperación de fuerza tetánica después de una fatiga es más satisfactoria.

Capítulo 6

Discusión y Conclusiones

“Maestro, te he traído a mi hijo que tiene un espíritu mudo y cuando se apodera de él le tira por tierra, le hace echar espumarajos y rechinar los dientes y se queda tieso”.

San Marcos 9, 17

La epilepsia es uno de los problemas neurológicos más comunes en todo el mundo, que se caracteriza por la presencia de varios síntomas incluyendo alteraciones de comportamiento y la conciencia ^[70].

El 0.7% de la población mundial padece alguna forma de epilepsia y el 80% de los 50 millones de personas con epilepsia en el mundo viven en regiones con altos índices de pobreza y recursos limitados para su tratamiento. Siendo la ELT la forma más común entre las epilepsias, representan el 40% de todos los casos ^[7].

A pesar de ser una afección de la que se tienen registros antiguos con observaciones detalladas, tipos de crisis y sus factores desencadenantes; y que fue considerada como una “*enfermedad sagrada*” por algunas culturas, es hasta hace más de 300 años que ha sido abordada de manera científica y aún se sabe poco sobre su fisiopatología. Donde la mayoría de los trabajos y publicaciones realizados se centran en los mecanismos de funcionamiento celulares y subcelulares de las áreas del SN involucradas en dicha alteración neurológica, así como producción y prueba de fármacos antiepilépticos. Sin embargo, no se tienen registros científicos de si existe daño o no, en las propiedades contráctiles del musculo esquelético de sujetos epilépticos.

6.1. Pilocarpina sobre músculo esquelético de rata

El uso de pilocarpina puede dar lugar a una serie de efectos adversos (transpiración y salivación excesiva, vasodilatación, broncoespasmos, etc.) la mayoría de ellos relacionados por su acción no selectiva como un receptor agonista colinérgico muscarínico^[71,72].

Los receptores muscarínicos son proteínas G acopladas a receptores de acetilcolina y se encuentran en la membrana plasmática de ciertas neuronas^[73] y otras células. Su contraparte son los receptores nicotínicos de la acetilcolina^[74]. Sustancias como la pilocarpina y la atropina manipulan estos dos receptores, actuando como agonistas o antagonistas respectivamente^[75]. Se conocen cinco subtipos de receptores muscarínicos llamados m_1 a m_5 ^[76], encontrados en corazón y músculo liso para m_2 y m_3 respectivamente. Y en el SNC se encuentran m_1 , m_4 y m_5 .

Se conoce el efecto de la pilocarpina al interaccionar con tejidos u órganos en los que se encuentran receptores muscarínicos. Se sabe que en el músculo esquelético tanto de humano como de rata, no existen éstos receptores, por lo que no se esperaría efecto al poner directamente pilocarpina sobre el músculo. Sin embargo, esto último no se había demostrado experimentalmente.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran lo esperado teóricamente de la pilocarpina sobre ME. Para ello nos centramos en el estudio físico de la fuerza de contracción de músculos de ratas sanas usando diferentes concentraciones de pilocarpina siguiendo un protocolo determinado en el que se analizó la tensión (fuerza) lograda y registrada en tétanos, fatiga y tétanos de recuperación después de fatiga comparados con músculos de ratas control. El análisis estadístico demostró que no hay diferencias en la biomecánica del músculo ni en las tendencias seguidas por las diferentes estimulaciones tetánicas realizadas incluso para concentraciones altas de pilocarpina.

Respecto a la biomecánica del músculo, nótese que la magnitud de fuerza oscila entre 350-600 mN para las diferentes estimulaciones tetánicas de músculos EDL de peso promedio 70 mg y longitud óptima 2.9 cm, de rata de 45 a 55 días de edad.

Vimos que el músculo disecado soportó bien la fatiga al 50% respecto al tétanos inicial de la misma y se recuperó en un alto porcentaje para ambos casos, esto es, con el fármaco incubado y sin éste. Al ser músculos EDL de rata joven se esperaría que soporten protocolos largos como sucedió en los experimentos, no así en músculos de rata vieja y que, además padezcan alguna afección, como obtuvimos en los experimentos restantes que se describen en siguientes secciones.

6.2. Alteraciones en el comportamiento de la rata tratada con pilocarpina

De la literatura se sabe que el modelo experimental con pilocarpina es un buen modelo para estudiar epilepsia de lóbulo temporal en sus diferentes fases. Puesto que, los resultados que se obtienen son similares a los que se verifican en la ELT humana, tales como alteraciones anatómicas, características conductuales y electroencefalográficas^[77,33,78]. Aunque la tasa de mortandad durante las primeras 24 horas de los animales tratados es elevada, alrededor del 63%^[79], debido a que el daño que ocasiona la pilocarpina principalmente en el SNC, es severo, aún a dosis bajas puesto que es un fármaco capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que, éste modelo asegura que los animales sobrevivientes al SE agudo desarrollan con el tiempo epilepsia crónica con características semejantes a la observada en el humano.

Por otro lado, los síntomas clínicos y comportamientos que se observamos en nuestras ratas tratadas con pilocarpina son semejantes en su mayoría, a los descritos en pacientes epilépticos y están en acuerdo con la literatura de trabajos realizados usando el mismo modelo experimental.

De acuerdo a varios autores, inmediatamente después de la administración de pilocarpina, todos los animales presentan cambios persistentes en el comportamiento, incluyendo acinesia, ataxia, signos colinérgicos periféricos (miosis), piloerección, diarrea y masticación, movimientos estereotipados, movimientos clónicos de las extremidades delanteras, movimientos repetitivos de cabeza y temblores. Estos cambios conductuales progresan a ser convulsiones límbicas como describió previamente Turski y colaboradores en 1983,^[80,81].

Por otro lado, se conocen los efectos de la pilocarpina en tejidos periféricos donde se encuentren receptores muscarínicos, tales como el exceso de salivación y presión intraocular –por mencionar algunos- que podrían confundirse con los efectos que ocasiona en sí la epilepsia. Por lo que, para

descartar que tales efectos sean por el fármaco, cabe recordar que de acuerdo al modelo experimental usado en este trabajo de tesis, se usa un antagonista colinérgico (bromuro de ipatropio), 30 minutos antes de la inyección con pilocarpina cuya dosis va de acuerdo al peso de cada animal, logrando con ello bloquear en su mayoría, los efectos colinérgicos en tejidos periféricos.

Más aún, las ratas sobrevivientes tratadas mostraron conductas persistentes a lo largo de la evolución de la epilepsia, y que son diferentes a los que se observan en ratas control, esto podría implicar alteraciones en la neurotransmisión^[79] derivando en conductas anormales como sucede en pacientes epilépticos.

6.3. Estudio funcional del sistema nervioso de rata con epilepsia crónica

Aunque existen técnicas imagenológicas que arrojan resultados confiables y que son usadas principalmente como de diagnóstico para diversos padecimientos, la técnica PET es por excelencia una de las mejores técnicas para objetivar lesiones metabólicas, al ser capaz de seguir procesos fisiológicos *in vivo*.

Sin embargo, la razón de usar esta técnica no fue como medio de diagnóstico pues como ya se mencionó en secciones anteriores, el modelo experimental de pilocarpina asegura la inducción de epilepsia en animales tratados. La razón radica en hacer uso de la ventaja que conlleva usar PET al poder observar *in vivo* la actividad glucolítica cerebral de animales epilépticos, ya que, se conoce de estudios *post mortem* mediante autoradiografías que existen cambios en el metabolismo glucolítico cerebral durante las diferentes fases que presenta el modelo de epilepsia^[52,82], y ha sido sólo en la última década, que éstos cambios metabólicos se han podido demostrar *in vivo* usando la técnica PET, convirtiéndose en una herramienta poderosa para hacer investigación además de su uso diagnóstico. Sin embargo, es una técnica muy costosa por todo el proceso que conlleva, mermando en un alto grado su uso para la investigación. Por tales razones, realizamos un estudio cualitativo de la actividad metabólica del SN de rata con epilepsia crónica con el objetivo de corroborar si hay cambios evidentes en el patrón glucolítico cerebral y poder reproducir aunque de manera cualitativa lo predicho, esclareciendo dicho proceso ya que, parecen existir discrepancias en los resultados PET obtenidos

Entre los diferentes grupos de trabajo y, por otro lado, la metodología empleada no es clara en su gran mayoría.

Actualmente, se sabe que los sustratos anatómicos activados durante una actividad convulsiva difieren de aquellos activados durante intervalos interictales^[82], y son conocidos, éstos son principalmente estructuras límbicas localizadas en el SNC (hipocampo, el tálamo, los cuerpos estriados, las cortezas entorrinal, piriforme, sensorimotora, auditiva, visual, el córtice cingulado, la amígdala, el septum). Con PET/FDG y modelos experimentales de epilepsia se han identificado patrones hipo e hiper metabólicos en éstas estructuras.

Durante el SE, se tiene sólo un trabajo reportado usando microPET^[83] y el modelo experimental de pilocarpina, en el que su escáner tiene una resolución espacial de 1.8 mm; como anestesia general usan quetamina/xilazina; y co-registran sus imágenes con imágenes de resonancia magnética tomadas de un atlas. La resolución espacial de su escáner es pobre comparada con las que se reportan en otros trabajos, en nuestro estudio usamos un escáner con resolución de 1.4 mm. No solo reportan resultados de regiones cerebrales pequeñas, sino que además los escaneos los realizaron minutos después del SE inducido con pilocarpina. Sin embargo, durante el SE, la rata sufre crisis epilépticas severas (como lo pudimos constatar usando el mismo modelo) por lo que, aún anestesiada, no es claro si fisiológicamente es posible que durante una crisis severa el animal permanezca inmóvil para poder realizar los escaneos PET que generalmente son de 15 a 30 minutos de adquisición. Mientras que, en casos clínicos se suspendería el escaneo de forma inmediata, si el paciente epiléptico comienza a sufrir una crisis.

En general, observaron un patrón cerebral hipermetabólico en los animales con SE respecto a los animales control; con incrementos del +33.2% en captación FDG para el hipocampo, +9.4% en el tálamo, +5.5% en el estriado, +10.4% en la corteza parietal, -6.1% en la corteza frontal y -6.5% en el cerebelo.

Para la fase aguda y latente, se tienen tres trabajos reportados en la literatura, cuyos resultados coinciden aun usando diferentes anestesias, K. Goffin y colaboradores^[90] usan como anestesia general pentobarbital (barbitúrico); mientras que Y. Guo y colaboradores^[83] usaron gas isofluorano; además de Jupp y colaboradores^[91], quienes también usaron un modelo experimental distinto de pilocarpina. En general, observan un marcado hipometabolismo, enfatizado en estructuras límbicas, principalmente hipocampo

y corteza entorrinal con niveles en la captación FDG alrededor del -23% menores respecto al control. Éstos resultados están de acuerdo con publicaciones clínicas que han reportado hallazgos con FDG-PET en pacientes con ELT^[84,85], y por equipos de trabajo que usaron técnicas de inmunohistoquímica y autoradiografías.

Respecto a las anestésicas, en un estudio anterior (1986) se documentó que los barbitúricos disminuyen el metabolismo cerebral y la captación de FDG^[86]. Por tal motivo, nosotros usamos como anestesia general antes de inyectar el radiofármaco y durante el estudio, gas isoflurano. Sin embargo, el isoflurano tiene un efecto anticonvulsivante^[87,88], aunque se cree que no interfiere con el metabolismo cerebral y la captación de FDG.

Para la fase crónica es donde no existe un consenso con los trabajos microPET publicados. Nuestro estudio se enfocó en esta etapa.

K. Goffin y colaboradores^[90] en el 2009 encuentran para la fase crónica (70 días después del SE) que no hay diferencias significativas respecto al control, en los valores de captación normalizados, excepto para el cerebelo, puente y médula oblongata cuyos valores resultaron mayores respecto al control. En cambio, Jupp y colaboradores^[91] en el 2007 reportan un hipometabolismo global persistente (35 días después del SE). Mientras que, Y. Guo y colaboradores^[83] en el 2009, durante la fase crónica (42 días después del SE), encuentran una recuperación en el hipometabolismo observado en fases anteriores (aguda y latente) a niveles cercanos a los obtenidos para los controles; sin embargo el hipometabolismo persiste en regiones como el hipocampo y tálamo aunque no es tan marcado como se observa en las fases temprana y latente; sin cambios evidentes en cerebelo y puente en ninguna de las fases. En otras palabras, Guo y colaboradores obtienen un patrón metabólico semejante al observado en el control en el estadio crónico de la epilepsia, ya que hubo una recuperación significativa de los niveles de captación FDG en todas las áreas corticales que analizaron excepto para el hipocampo y tálamo (ver Figura 5.12A sección 5.3), que presentaron un ligero hipometabolismo del 10% respecto al control.

En general, nosotros obtenemos (56 días después del SE) patrones metabólicos de cortes coronales semejantes a los observados para el control (ver Figura 5.12B sección 5.3), lo cual está en acuerdo con lo reportado por Guo y K. Goffin y en desacuerdo con Jupp. Sin embargo, es respecto a determinadas regiones corticales donde encontramos algunas diferencias de hipo o hiper captación. En

nuestro trabajo, los cuerpos estriados y el cerebelo no presentan cambios obvios en los ROIs normalizados respecto al control. Y, de manera cualitativa, los patrones metabólicos de la corteza prefrontal y la corteza piriforme son semejantes respecto al control; sólo con ligero hipometabolismo se observan el hipocampo, el tálamo y la corteza sensorimotora del cerebro de la rata epiléptica. Los posibles factores de confusión para la comparación de tales estudios PET es en los diferentes tiempos de imagen tomados después del SE y en la anestesia general usada antes de inyectar FDG y durante el estudio.

6.4. Estudio mecánico de las propiedades contráctiles del músculo esquelético de rata epiléptica

El estudio de las propiedades mecánicas del músculo aislado de rata epiléptica en el modelo de pilocarpina es fundamental en el entendimiento del posible efecto de la ELT sobre el músculo esquelético, secundario a los múltiples episodios convulsivos.

Las fuerzas externas que actúan sobre el sistema, el músculo EDL, es la fuerza de gravedad. Mientras que, las internas son fuerzas viscosas y elásticas debido a la naturaleza elástica de los componentes musculares, y, propiamente la fuerza de contracción. Sin embargo, en una contracción en condiciones tetánicas la fuerza total generada en el músculo es la fuerza de contracción que se puede registrar y medir.

De los dos tipos de músculo esquelético (lento y rápido) clasificados de acuerdo a sus propiedades mecánicas y metabolismo. Seleccionamos al músculo rápido por ser el que presenta mayor plasticidad y corresponde a la mayoría de músculo afectado durante los episodios convulsivos, son los músculos del movimiento los que experimentan mayor actividad. Los músculos rápidos tienen un tiempo de contracción y relajación rápido comparado otros tipos de musculo, son fatigables y por lo tanto es probable que los episodios de descargas neuronales que llevan a la movilidad del músculo puedan durar más que la misma actividad muscular, ya que ésta puede ser interrumpida por el fenómeno de fatiga. La generación de fuerza que registramos es en condiciones isotónico tetánica, lo que implica que hay un desplazamiento de los miofilamentos al 100% para producir la contracción, por lo que la fibra muscular se acorta modificando su longitud inicial. Implicando con ello que, la fibra muscular

realiza además trabajo. Por otro lado, la fuerza de contracción está directamente relacionada con la longitud y peso del músculo de manera proporcional en condiciones normales. Sin embargo, en el caso que exista una alteración en la estructura del músculo, no necesariamente se cumplirá esta relación.

Consideremos algunas relaciones entre el músculo EDL de 45 días de edad de rata normal y de un EDL proveniente de una rata epiléptica con 7 días de evolución. Con la misma medida longitudinal promedio de 2.8 cm el peso del músculo varió de 70 mg a 40 mg en la normal y epiléptica respectivamente. Lo que significa que la sección transversal del músculo también disminuyó. La fuerza de contracción en el EDL de la rata epiléptica disminuyó de 649 mN a 292 mN esto tiene una relación directa con la disminución de las dimensiones del músculo. La pérdida de la masa muscular después de 7 días de evolución de la epilepsia resulta muy probablemente de la disminución importante en la ingesta de alimentos y agua, ya que como hemos discutido anteriormente una de las conductas modificadas en el ELT es la pérdida de apetito.

Por otro lado, en los músculos de rata adulta control (144 días de edad) y con ELT, la fuerza aumenta alrededor del doble de la que se obtuvo para músculos de rata joven control (45 días de edad). Lo cual es consistente con el hecho de que la fuerza depende tanto de la longitud como del peso de la fibra muscular. Dado que, longitud y peso promedio de ambos músculos son las mismas, el aumento en promedio de alrededor del 34% en la fuerza de contracción del grupo epiléptico respecto al control, se debe al efecto de la ELT crónica.

Una característica interesante a destacar en las propiedades mecánicas del ME, es la diferencia de cinéticas que se observan en los registros electrofisiológicos entre músculos de ratas jóvenes y de edad adulta, como la tendencia de la pendiente de una contracción tetánica cuya tensión generalmente cae de forma lineal en músculos de ratas jóvenes y logarítmica en músculos de ratas adultas implicando mayor pérdida de fuerza en los músculos de ratas más grandes de edad, es decir se fatigan más rápido. Tales cambios, están relacionados con el metabolismo muscular, ya que, con la edad se modifica. En particular, el músculo rápido, produce en condiciones normales, mayor fuerza y fatiga muscular. Realizando un determinado protocolo de actividad, esto se puede revertir debido a la propiedad plástica del tejido muscular. Sin embargo, lo que nos interesa saber, es si la ELT modifica el metabolismo muscular lo que se traduce en el cambio de las propiedades contráctiles del ME y cuantificarlo.

6.4.1. Índice de fatiga del EDL en la epilepsia latente

Para la evaluación del efecto de la epilepsia en la fatiga de la fibra muscular se usó el índice de fatiga, que es el resultado del cociente del final de la fuerza de la estimulación y la fuerza registrada al final de la fase lineal de la contracción, este es un proceso bioquímico relacionado con el flujo de calcio existente entre el sarcoplasma y el RS.

El valor del índice de fatiga ($\equiv \frac{B}{A}$) para un musculo EDL sano joven es $0.8 < \frac{B}{A} < 1$. Nosotros obtuvimos en promedio para el control, un coeficiente de 0.9, y en el caso de músculos de rata desnutrida $\frac{B}{A} = 0.89$. El caso de ELT fue de 0.5, que implica un cambio evidente en la propiedad contráctil del musculo, fatigándose doblemente más rápido. Este resultado implica una disminución en la disponibilidad del calcio en las miofibrillas para mantener la fuerza de contracción, lo que involucra directamente al RS y particularmente a la SERCA (Figura 5.13). Enfatizamos el hecho, de que este cambio observado, es debido al grado de desnutrición que presentaba el animal. Por lo que, también realizamos experimentos con músculos de ratas desnutridas para discernir entre el efecto observado por la desnutrición y por la epilepsia inducida. El índice promedio de fatiga que obtuvimos para músculos de ratas desnutridas resulto como el control. Ello implica que, el proceso de desnutrición puede ser un factor determinante para modificar las propiedades mecánicas del musculo esquelético. Pues no es lo mismo inducir desnutrición a ratas mediante un protocolo establecido y desde temprana edad que la desnutrición desarrollada en pocos días a causa de la depresión del sistema nervioso y en ratas jóvenes inicialmente sanas. Más aun, demuestra la posible severidad de los efectos secundarios de una alteración neurológica como la ELT adquirida.

6.4.2. Fatiga y Recuperación del EDL en la epilepsia latente

El proceso fisiológico de fatiga en un musculo sano joven, se consigue a través de un tren de estimulaciones tetánicas que ocasiona, pérdida de fuerza del 45% en el sexto tétano y una recuperación de la misma después de un periodo adecuado de reposo. Mientras que, la pérdida de fuerza para el caso epiléptico es 8% mayor, es decir, se fatiga más rápido el epiléptico en un tren de

tétanos. Sin embargo, esta tendencia podría estar relacionada con el efecto de la desnutrición en el ME y no de la epilepsia. Sin embargo, en la cinética de recuperación de fuerza para el primer tétano, es 12% mayor que en el control. Lo que demuestra dos hechos importantes: que la desnutrición y/o epilepsia en un estadio temprano no causo daño celular a la fibra, y que, la tendencia a recuperar fuerza en la estimulación tetánica después de una fatiga es mayor en el epiléptico, resultado que sugerimos sólo puede ser explicado propiamente por el efecto de la epilepsia y ya no de la desnutrición, como resumimos en Cuadro 5.2.

6.4.3. Índice de fatiga del EDL en la epilepsia crónica

El índice de fatiga obtenido es menor con músculos epilépticos para un estadio crónico, lo que implica que hay mayor fatiga del músculo durante un tren tetánico y como las dimensiones del músculo son las mismas que el grupo control, este efecto es resultado de la epilepsia crónica. Este resultado es consistente para ambas frecuencias, 45 y 75 Hz.

Sin embargo, el índice de fatiga es alrededor del 37% menor a 75 Hz (control) que a una frecuencia de estimulación más baja (45Hz), este resultado es razonable, pues en general, los músculos tipo II, se fatigan más rápido a frecuencias altas.

6.4.4. Fatiga y Recuperación del EDL en la epilepsia crónica

En el tren de tétanos de la ELT con 99 días de evolución, a una frecuencia de estimulación (75 hz) y voltaje (90V), vimos que tiende a fatigarse 11% más rápido respecto al control. Sugiriendo que la SERCA juega un papel crucial en la recaptura del calcio liberado por RS durante un tren tetánico de músculos epilépticos. Lo cual podría implicar una menor disponibilidad de calcio en el receptor de rianodina y/o que el calcio es secuestrado más lentamente por la SERCA cuando no hay un suficiente tiempo de descanso del músculo antes del siguiente tétano, ocasionando que el músculo con ELT

crónica se fatiga más rápido que un músculo normal en un tren de tétanos. Sin embargo, en el caso en el que se dé al músculo epiléptico, el tiempo necesario para recuperarse entre cada tétano, la fuerza tiende a ser mayor y a recuperar más rápido dicha fuerza.

Conclusiones

Sí se modificaron las propiedades contráctiles del músculo esquelético con ELT crónica debido a la estimulación espontánea e hipersincrónica de las neuronas hiperexcitables afectadas por este trastorno neurológico, con lo cual probamos nuestra hipótesis.

Por otro lado, mediante la PET, demostramos que aún durante períodos interictales en los que las convulsiones tónico clónicas no se observan, sigue existiendo daño a nivel cerebral y por lo tanto, una posible estimulación anormal pero que no es lo suficientemente intensa para producir las contracciones sostenidas visibles, sin embargo, sigue existiendo estimulación pero asincrónica.

El efecto de la ELT crónica sobre el ME genera mayor fuerza de contracción (alrededor del 34%). Sin embargo, es menos resistente a la fatiga respecto de un ME normal. Por lo que demuestro que la ELT no produce daño celular al musculo, por el contrario, hay cambios que favorecen a nivel de retículo sarcoplásmico la regulación de las concentraciones de calcio disponibles en el aparato contráctil semejando cambios favorables observados durante el entrenamiento de una actividad muscular prolongada. El estudio del efecto del ELT sobre la adaptabilidad del músculo con una estimulación aleatoria y de diferentes frecuencias en el tiempo de evolución del la ELT, no es suficiente para evidenciar los cambios en todas las propiedades mecánicas de la contractilidad del músculo esquelético rápido aquí analizadas.

Bibliografía

- [1] Rocha A Luisa L, 2005. *La enfermedad que alguna vez fue sagrada*. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, vol. 56 núm. 3.
- [2] Lothman EW, Bertram EH, Stringer JL (1991). *Functional anatomy of hippocampal seizure*. Prog Neurobiol 37:1-82.
- [3] <http://www.psicologia-online.com/ebooks/general/emocional.htm>
- [4] Wang Liang, et al., 2010. *Increased insulin receptor expression in anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy*. Journal of the Neurological Sciences 296: 64-68.
- [5] Regesta G & Tanganelli P, (1999). *Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies*. Epilepsy Res 34:109–22.
- [6] Kiernan J. A. (2000). *Barr, EL SISTEMA NERVIOSO HUMANO, un punto de vista anatómico*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana. Séptima edición.
- [7] McNamara J., (1999). *Emerging insights into the Genesis of Epilepsy*. Nature, 399:A15-22.
- [8] Goldensohn E. S., et al., (1997). *The American Epilepsy Society: an historic perspective on 50 years of advances in research*. Epilepsia 38:124-50.
- [9] Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. (1998). *Glutamate receptors in the mammalian central nervous system*. Prog. Neurobiol. 58:1-618.
- [10] Millan M.H., et al., (1993). *Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures*. Epilepsy Res. 14:139-148.
- [11] Oxbury J.M., Whitty W.M., (1971). *Causes and consequences of status epilepticus in adults*. Brain 94:733-744.
- [12] Smolders I., et al., (1997). *Effectiveness of vigabatrin against focally evoked Pilocarpine induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, g-aminobutyric acid and dopamine levels, a microdialysis-electrocorticography study in freely moving rats*. Pharmacol. Exp. Ther. 283:1239-1248.
- [13] <http://medicablogs.diariomedico.com/diariomedico/category/sin-categoria/page/79/>

- [14] Jorge Gerardo Bravo Martínez, (2011). Tesis doctoral: "*Papel de los mecanismos de extrusión de calcio en el modelo de pilocarpina de la epilepsia del lóbulo temporal*". Instituto de Fisiología Celular UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F.
- [15] Sloviter R.S. (2005). *The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge*. Comptes Rendus Biologies. 328:143-153.
- [16] Yañez-Lermada A. *Cirugía de epilepsia. Actualización y conceptos básicos. Es factible en países en desarrollo?* Rev Neur Arg 1994; 19(4).
- [17] Hauser W. *The natural history of temporal lobe epilepsy*. In: Luders H (ed.). *Epilepsy surgery*. New York: Raven Press; 1991, p. 133-41.
- [18] Wiley John & Sons, (2006). *Principles of anatomy and physiology*. 11a.edición.
- [19] Somjen GG & Giacchino JL, 1985. *Potassium and calcium concentrations in interstitial fluid of hippocampal formation during paroxysmal responses*. J. Neurophysiol., 53, 1098-1108.
- [20] Vázquez C., et al., 2008. *Esclerosis temporal mesial: Paradigma de la epilepsia de resolución quirúrgica*. Revista argentina de neurocirugía, ISSN 1850-1532.
- [21] Felipe S Estrada, Vito S Hernández, Estela López-Hernández, et al., (2011). *Glial Resilience Loss in Rat Hippocampus Is Directly Linked to Epileptogenesis: a Temporal Morphometric and Quantitative Analysis in Pilocarpine Model*. Depto. De Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.
- [22] Ma. Teresa Castañeda Licón (2008). Tesis doctoral: "*Los grupos neuronales septales colinérgicos, gabaérgicos y glutamatérgicos y su proyección al hipocampo*". Editorial de la Universidad de Granada, ISBN: 978-84-692-3103-6.
- [23] <http://www.santillana.es/>
- [24] Ed. Sandra Vázquez Quiroz (2008). *Músculos en acción*. Rev. El faro. Julio-agosto no. 88-89. UNAM, México, D. F.
- [25] Santana P Sergio & Espinosa B Alicia (2003). *Composición corporal*. Acta médica 2003; 11(1): 26-37.
- [26] Rumberger E, 2002. *Fisiología y teoría del entrenamiento*. Rev. Vol. 22, No.3, pp 15-30.
- [27] http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/sistema-muscular_21.html
- [28] Gary G. Matthews, 2006. *Cellular Physiology of Nerve and Muscle*. 4 ed. Blackwell Publishing Company.
- [29] Antonio S. Frumento. *Biofísica*. Editorial Intermédica S.A.I.C.I. Primera edición, Buenos Aires, Argentina 1973.

- [30] Jorge Gerardo Bravo Martínez, (2011). Tesis doctoral: “*Papel de los mecanismos de extrusión de calcio en el modelo de pilocarpina de la epilepsia del lóbulo temporal*”. Instituto de Fisiología Celular UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F.
- [31] Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, et al. (2005). *Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study*. *Epilepsia* 46:677-87.
- [32] Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP (2002). *Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer’s hypothesis revisited*. *Prog Brain Res*. 135:237-51.
- [33] Pastor J, Uzcátegui YG, et al., (2006). Bases fisiopatológicas de la epilepsia del lóbulo temporal: estudios en humanos y animales. *Rev Neurol* 42(11): 663-673.
- [34] Goddard GV, (1967). *Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity*. *Nature* 1967; 214: 1020-1.
- [35] Morimoto K, Sato H, et al., (1997). *BW1003C87, phenytoin and carbamazepine elevate seizure threshold in the rat amygdala-kindling model of epilepsy*. *Eur J. Pharmacol* 339: 11-5.
- [36] Ben-Ari Y, (1985). *Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy*. *Neuroscience* 14: 375-403.
- [37] Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, et al., (1983). *Limbic seizure Produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study*. *Behav Brain Res* 9: 315.
- [38] Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1990). *Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy*. *Neurosci Biobehav Rev* 14:511-7.
- [39] Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, et al. (1991). *Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures*. *Epilepsia* 32:778-82.
- [40] Wieser HG (2004). ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. *Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis*. *Epilepsia* 45:695-714.
- [41] Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008). *The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. *J Neurosci Methods* 172:143–157.
- [42] Litter M, (1975). *Farmacología Experimental y Clínica*. Editorial “El Ateneo” 5ta. edición. Buenos Aires, Argentina, 572-574 pp.
- [43] Katzung B., (1999). *Farmacología básica y clínica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Página 590.
- [44] Judge S., Leitch B., (1999). *Modulation of transmitter release from the locust forewing stretch receptor neuron by GABAergic interneurons activated via muscarinic receptor*. *J. Neurobiol.*, 40(3):420-431.

- [45] Cavalheiro E. A., Leite J. P., Bortolotto Z. A., et al., (1991). *Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures*. *Epilepsia* 32:778-782.
- [46] <https://wiki.engr.illinois.edu/display/BIOE414/PET+Scanner+Overview>
- [47] Miguel A Avila-Rodriguez, A Zarate-Morales, A Flores-Moreno, (2011). *Cyclotron Production of Medical Radioisotopes*.
- [48] Fernando Iturbe Hermann (2008). *Protección Radiológica, curso para personal ocupacionalmente expuesto*. Instituto de Ciencias Nucleares-UNAM. México, D.F.
- [49] Miguel A Ávila-Rodríguez & Héctor Alva-Sánchez, (2010). *Radiofármacos para PET, una nueva perspectiva de la medicina nuclear molecular en México*. *El Residente*. Vol. V Núm. 3-2010: 103-110.
- [50] Vallabhajosula Shankar, (2009). *MOLECULAR IMAGING. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Springer – Verlag Berlin Heidelberg.
- [51] Erick Alexánderson Rosas, Nayelli Ortega López, Rafael Ojeda Flores, et al., (2008). *Modelo de estudio mediante microPET para la evaluación del metabolismo glucolítico en el miocardio de rata con 18F-FDG. Experiencia inicial en México*. *Arch. Cardiol. Méx.* Vol.78 n.1.
- [52] Antonio S. Frumento. *Biofísica*. Editorial Intermédica S.A.I.C.I. Primera edición, Buenos Aires, Argentina 1973.
- [53] Keele CA, Neil E & Joels N., (1982). *Muscle and the nervous system*. En Samson Wright's *Applied Physiology*. Oxford University Press, 13 a. ed., pp. 248-259.
- [54] Freddy Antonio Pérez, et al., (2007). *Modelo Biomecánico de la Generación de Fuerza Muscular en Condiciones Isométrica y Tetánica*. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, vol. 27, núm. 001.
- [55] Waldvogel D, Van Geldeen P, et al., (2000). *The relative metabolic demand of inhibition an excitation*. *Nature* 406: 995-998.
- [56] Ingvar M. *Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: Relationship to epileptic brain damage*. *Ann NY Acad Sci* 1986; 462:194-206.
- [57] Meldrum B. *Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death*. Delgado-Escueta AV, Wasterlain CG, Treiman DM, Porter RJ (eds). *Advances in Neurology*, Vol. 34: Status epilepticus. New York: Raven Press, 1983:261-275.
- [58] Casse R, Rowe CC, Newton M, et al., (2002). *Positron Emission Tomography and Epilepsy Mol Imaging*. *Biol* 4:338–351.

- [59] Cavalcanti Filho JLG, Fonseca LMB, Domingues RC, Domingues RC, et al., (2010). *Brain 18F-FDG PETMRI coregistration: iconographic essay*. Radiol Bras. 2010; 43(3):195–201.
- [60] <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/wrigglesworth/brainimaging.htm>
- [61] Mirrione MM, Schiffer WK, Siddiq M, et al., (2006). *PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy*. Synapse 59, 119-121.
- [62] Gao F, Guo Y, Zhang H, Wang S, Wang J, Wu JM, Chen Z, Ding MP (2009). *Anterior thalamic nucleus stimulation modulates regional cerebral metabolism: an FDG-MicroPET study in rats*. Neurobiol Dis 34:477–483.
- [63] Dubé C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (2000). *Progressive metabolic changes underlying the chronic reorganization of brain circuits during the silent phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat*. Exp Neurol 162:146–157.
- [64] Boling WW, Lancaster M, Kraszpulski M, Palade A, Marano G, Puce A (2008). *Fluorodeoxyglucose-positron emission tomographic imaging for the diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy*. Neurosurgery 63:1130–1138.
- [65] Ramos-Loyo J & Sanz-Martin A, (2005). *Trastornos emocionales en la epilepsia*. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, vol. 56 núm. 3.
- [66] Andrew B. Newberg, MD, y Abass Alavi, MD, (2005). *PET en los trastornos convulsivos*. Radiol Clin N Am 43 (2005) 79 – 92.
- [67] <http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/genetics/neurobiol.html>
- [68] <http://www.apuche.org/OIA/Anatomical-Page-03.htm>
- [69] Paxinos G & Watson C, (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, San Diego.
- [70] Freitas RM, Viana GSB, Fonteles MMF (2003). *Striatal monoamines levels during status epilepticus*. Rev Psiq Clín 30: 76-79.
- [71] Spalding et al. 2002.
- [72] Rang, Dale, Ritter & Moore, 2003. *Pharmacology*. 5th ed., Churchill Livingstone. ISBN 0443071454, pp 144.
- [73] Eglen RM (Julio 2006). *Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function*. Auton Autacoid Pharmacol 26 (3): 219-33.
- [74] Ishii M, Kurachi Y (2006). *Muscarinic acetylcholine receptors*. Curr. Pharm. Des. 12(28): 3573–81.

- [75] Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel La Mantia, James O. McNamara, and Leonard E. White (2008). *Neuroscience*. 4th ed. Sinauer Associates. pp. 122–6.
- [76] Caulfield MP, Birdsall NJ (1 June 1998). "International Union of Pharmacology XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors". *Pharmacol. Rev.* **50** (2): 279–90.
- [77] Freitas, R. M.; Oliveira, A. A.; F. Sousa, F. C.; M. Vasconcelos, S. M.; B. Viana, G. S.; F. Fonteles, M. M. *Pathophysiology of Status Epilepticus Induced by Pilocarpine*. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal, Volume 7, Number 1, March 2007, pp. 11-15(5).
- [78] Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, et al. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.
- [79] Freitas R, Oliveira M, et al., (2007). *Pathophysiology of Status Epilepticus Induced by Pilocarpine*. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal, Volume 7, Number 1, pp. 11-15(5).
- [80] Turski, W.A.; Cavalheiro, E.A.; Schwarz, M.; Czuczwar, S.J.; Kleinronk, Z.; Turski, L. *Behav. Brain Res.*, 1983a, 9, 315-336.
- [81] Turski, L.; Ikonomidou, C.; Turski, W.A.; Bortolloto, Z.A.; Cavalheiro, E.A. *Synapse*, 1989, 3, 154-171.
- [82] Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. *Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculine or pentrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy*. *Neuroscience* 1981; 6:1361-1391.
- [83] Guo Y, Gao F, et al., (2009). IN VIVO MAPPING OF TEMPOROSPATIAL CHANGES IN GLUCOSE UTILIZATION IN RAT BRAIN DURING EPILEPTOGENESIS: AN 18F-FLUORODEOXYGLUCOSE–SMALL ANIMAL POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY STUDY. *Neuroscience* 162, 972–979.
- [84] Franck G, Sadzot B, Salmon E, et al., (1986). *Study of cerebral metabolism and blood flow in partial complex epilepsy and status epilepticus in man using positron emission tomography*. *Rev. Electroencephalogr. Neurophysiol. Clin.* 16, 199-216.

- [85] Kawai N, Miyake K, Kuroda Y, et al., (2006). *Magnetic resonance imaging and positron emission tomography findings in status epilepticus following severe hypoglycemia*. Ann. Nucl. Med. 20, 371-376.
- [86] Theodore WH, DiChiro G, et al., (1986). *Barbiturates reduce human cerebral glucose metabolism*. Neurology 36, 60-64.
- [87] Hisada K, Morioka T, Fukui K, Nishio S, Kuruma T, Irita K, Takahashi S, Fukui M (2001) *Effects of sevoflurane and isoflurane on electrocorticographic activities in patients with temporal lobe epilepsy*. J Neurosurg Anesthesiol 13:333–337.
- [88] Murao K, Shingu K, Miyamoto E, Ikeda S, Nakao S, Masuzawa M, Yamada M (2002). *Anticonvulsant effects of sevoflurane on amygdaloid kindling and bicuculline-induced seizures in cats: comparison with isoflurane and halothane*. J Anesth 16:34–43.
- [89] Dubé C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (2001). *Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat*. Exp Neurol 167:227–241.
- [90] Goffin K, Paesschen WV, Dupont P, Laere KV (2009). *Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy*. Exp Neurol 217:205–209.
- [91] Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks R, O'Brien TJ (2007). *Imaging small animal models of epileptogenesis*. Neurol Asia 12:51–54.
- [92] Fernandes MJ, Dubé C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (1999). *Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats*. J Cereb Blood Flow Metab 19:195–209.
- [93] Ingvar M. *Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: Relationship to epileptic brain damage*. Ann NY Acad Sci 1986; 462:194-206.