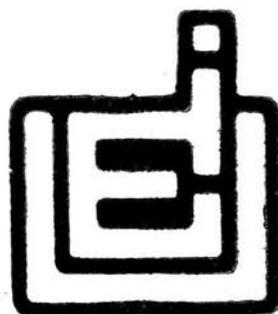


Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala



ACCION DEL DANTROLENE SOBRE EL EFECTO EXCITOTOXICO DE
LA ADMINISTRACION INTRAHIPOCAMPICA DE ROJO DE RUTENIO

T E S I S

Q u e p r e s e n t a

ENRIQUE LUIS SALERO COCA

Para obtener el Título de

B I O L O G O

Director de Tesis: Dr. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA



MEXICO, 1992.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia por su apoyo, asesoría y dedicación que me brindó durante mi estancia en su laboratorio en la realización de este trabajo.

Asimismo deseo agradecer al Instituto de Fisiología Celular y a su director Dr. Antonio Peña por todas las facilidades recibidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para realización del mismo.

A los miembros del jurado: Dr. Fernando García Hernández, Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia, M. en C. Jaime Barral, Biol. Enrique Bañuelos, Biol. Alonso Trujillo por la revisión crítica y los valiosos comentarios aportados a este trabajo.

A la M. en C. Martha Salcedo, Coordinadora de la carrera de Biología a quien agradezco todas sus atenciones.

Al Dr. Jose Damian Carrillo Ruiz por los comentarios y sugerencias que permitieron mejorar este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Biol. Guillermo Jimenez Bastida por la ayuda recibida en la elaboración de las ilustraciones.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco lo que todos y cada uno de ellos me enseñaron durante mi estancia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México germen de sabiduría y cultura, mi más profundo reconocimiento.

A todos mis profesores de quienes guardo con gran cariño las enseñanzas que recibí de cada uno de ellos.

El cerebro humano representa un mundo donde figuran algunos continentes explorados y vastas tierras ignotas ignotas¡Que de hallazgos emocionantes nos esperarán aún en la encrucijadas de nuestras células y vías nerviosas, si nos imponemos la tarea de autoobservarnos metódica y pacientemente a la luz de la ciencia y al calor de la meditación !

Santiago Ramón y Cajal, 1921.

INDICE

I	RESUMEN.....	11
II	INTRODUCCION	
A.	La Transmisión Sináptica.....	12
	1. Transmisión sináptica de tipo eléctrico.....	14
	2. Transmisión sináptica de tipo químico.....	16
	2.1 Terminal Presináptica.....	18
	2.2 Espacio Sináptico.....	23
	2.3 Terminal Postsináptica.....	23
B.	Función del Calcio en la célula.	
	1. Importancia biológica del calcio.....	24
	2. Mecanismos de liberación de neurotransmisores en la transmisión sináptica.....	25
	3. Papel del calcio en la neurotoxicidad y muerte celular	
	3.1 Receptores a aminoácidos excitadores.....	27
	3.1.1 Receptores tipo NMDA.....	28
	3.2 Neurotoxicidad y muerte celular.....	30
	3.2.1 Inducción.....	30
	3.2.2 Amplificación.....	31
	3.3.3 Expresión.....	31
	3.3 Dantrolene	
	3.3.1 Generalidades. Características físicas y químicas.....	33
	3.3.2 Farmacocinética y metabolismo.....	33

3.3.3 Aplicaciones clínicas.....	36
3.3.4 Efectos experimentales <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	37
3.3.5 Propiedades neuroprotectoras del dantrolene en la toxicidad celular.....	39

C. El Hipocampo

1. Citoarquitectura.....	40
2. Vías neurales, aferentes y eferentes.....	42
3. Región CA1. Organización y Neuroquímica.....	45
4. Alteraciones neuropatológicas	
4.1 Epilepsia.....	47

III ANTECEDENTES

A. ROJO DE RUTENIO

1. Generalidades. Características físicas y químicas	49
2. Efectos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	49
3. Efectos conductuales en el Sistema Nervioso Central...	53

IV OBJETIVOS.....	54
-------------------	----

V MATERIAL Y METODOS

1. Administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio...	55
2. Administración intraperitoneal e intrahipocámpica de dantrolene.....	56
3. Registro conductual.....	57
4. Análisis histológico.....	57
5. Pruebas estadísticas.....	57

VI RESULTADOS

1. Efecto de la inyección intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.....	59
2. Efecto del dantrolene en solución isotónica administrado intraperitonealmente sobre la acción de la inyección intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.....	61
3. Efecto del dantrolene disuelto en propilenglicol administrado intraperitonealmente sobre la acción de la administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio	64
4. Efecto de la co-administración intrahipocámpica de Dantrolene sobre la acción Rojo de Rutenio.....	69

VII DISCUSION

1. Epilepsia límbica y sacudidas de perro mojado provocadas por la administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio..... 75
2. Efecto citotóxico del Rojo de Rutenio en la citoarquitectura del hipocampo..... 76
3. El dantrolene disminuye la actividad convulsiva de SPM inducida por la administración de Rojo de Rutenio..... 79

VIII CONCLUSIONES..... 82

IX REFERENCIAS..... 83

ABREVIATURAS..... 95

RESUMEN

El Rojo de Rutenio (RRu) es un colorante inorgánico que se ha utilizado en la tinción de la membrana plásmica de diferentes tipos celulares. Cuando este colorante se administra en áreas específicas del cerebro como el hipocampo de la rata produce una serie de trastornos conductuales característicos de la epilepsia límbica y en asociación la conducta de "sacudidas de perro mojado" (SPM) que es una manifestación de carácter no convulsivo. Estudios en microscopía electrónica realizados después de la inyección de RRu en la región CA₁ del hipocampo han permitido observar que el colorante penetra rápidamente a los somas neuronales y provoca degeneración celular (García-Ugalde y Tapia, 1991). El efecto tóxico de este compuesto puede ocasionar la aceleración de una serie de eventos citotóxicos que provoquen la muerte neuronal debido a un exceso anormal en la concentración de calcio intracelular.

Las propiedades neuroprotectoras del dantrolene (DA) en la toxicidad celular inducida en cultivo de células *in vitro*, inhibe la liberación de calcio de reservorios intracelulares. Por este hecho el propósito del presente trabajo fue analizar el efecto protector del dantrolene sobre los efectos tóxicos que ejerce el RRu. Los resultados indican que los efectos conductuales y neurotóxicos del RRu se deben a una alteración de los mecanismos intracelulares que regulan la concentración citoplásmica del calcio.

II INTRODUCCION

A. LA TRANSMISION SINAPTICA

La teoría de la neurona desarrollada por Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX, constituye uno de los conceptos fundamentales que definen a la neurobiología moderna sobre la organización del sistema nervioso. La implicación más importante de esta teoría fue el desterrar la idea de estructura reticular propuesta por el alemán Gerlach y el italiano Camilo Golgi. His, Forel y Ramón y Cajal postularon que las neuronas son las unidades anatómicas y funcionales del sistema nervioso y que la comunicación entre ellas debía entenderse en términos de una continuidad fisiológica y no física (Eccles, 1982).

En 1906 Charles Sherrington acuñó el término sinapsis que proviene de la palabra griega *sinapto*, que significa agarrar fuertemente. Con esta palabra designó a las zonas de comunicación interneural donde las señales nerviosas pasan de una célula a otra. Sherrington postuló que tales sitios debían existir para poder explicar el retardo que observó en la respuesta del arco reflejo en músculo (Eccles, 1964).

La sinapsis es el sitio anatómico de contacto entre una neurona y otra con una función específica, a través del paso de información codificada en potenciales de acción de una célula emisora o presináptica, a una célula receptora o postsináptica (Bullock et al., 1977).

Las primeras especulaciones sobre la naturaleza de la transmisión sináptica surgen a finales del siglo pasado. En 1877 DuBois-Reymond fue el primero en sugerir el mecanismo de la transmisión química, a través de la secreción de una sustancia excitadora como causante de la contracción muscular, mientras que Hermann en 1879 y posteriormente en 1885 Lapicque y Forbes propusieron que la transmisión sináptica era de tipo eléctrico (Eccles, 1964).

Elliot en 1904 observó que al estimular las terminales nerviosas de los nervios simpáticos se liberaba adrenalina sobre la placa neuromuscular de músculo liso. En 1906 Dixon demostró que al estimular las terminales nerviosas de los nervios parasimpáticos se liberaba una sustancia semejante a la muscarina. Dale en 1916 describió que la acetilcolina y la adrenalina eran liberadas de las terminales nerviosas parasimpáticas y simpáticas respectivamente, además identificó una serie de compuestos que producían efectos semejantes a la estimulación eléctrica de las fibras autónomas. En 1921, Otto Loewi fue quien comprobó satisfactoriamente la hipótesis de la transmisión química con un sencillo experimento en el que perfunde el corazón de rana y simultáneamente estimula eléctricamente el nervio vago. Cuando el fluido que baña dicho órgano se coloca a otro corazón sin estimular, se induce una inhibición del latido. Loewi concluyó que el estímulo nervioso induce la liberación de una sustancia inhibitoria, que posteriormente se mostró era la acetilcolina (Eccles 1964; 1982).

Durante la década de los años 1930 y 1940 se originó una gran controversia entre los fisiólogos encabezados por Eccles y los farmacólogos representados por Dale con respecto al tipo de transmisión en el sistema nervioso, ya que se proponía que la transmisión sináptica operaba por un mecanismo simple y universal. Los fisiólogos argumentaban que la transmisión eléctrica se debía a un flujo de corriente desde la célula presináptica a la postsináptica por un paso directo, mientras los farmacólogos afirmaban que la transmisión química se debía a la liberación de una sustancia química (neurotransmisor) de la neurona presináptica hacia la neurona postsináptica y que en ésta se iniciaba un flujo de corriente que desencadenaba una alteración en el potencial de reposo provocando un potencial de acción en la célula postsináptica.

Los trabajos de Fatt y Katz por un lado, de Eccles y, de Furshpan y Porter por el otro, entre 1950 y 1960, demostraron que tanto la transmisión química como la eléctrica ocurrían en el sistema nervioso y que las sinapsis no operaban por un mecanismo universal.

A partir de estudios realizados en microscopía electrónica fue posible analizar desde el punto de vista morfológico la estructura de la terminal sináptica y establecer claramente las diferencias entre las sinapsis eléctrica y química (Eccles, 1964;1982; McGeer et al., 1987; Kandel et al., 1991).

1 Transmisión sináptica de tipo eléctrico

La sinapsis de tipo eléctrico se caracteriza por presentar una estrecha aposición de las membranas presináptica y postsináptica, debido a las uniones comunicantes (gap junctions), a través de las cuales se comunica el citoplasma de una célula con la siguiente. El espacio que separa a las membranas pre y postsinápticas es muy angosto (aproximadamente 2 nm) y representa la décima parte de la distancia que existe entre las membranas de una sinapsis química, aunque en ciertas zonas, las llamadas ocluidas, realmente no hay espacio alguno entre las dos membranas. Las uniones comunicantes están compuestas por canales de proteínas llamados conexones, que permiten la comunicación entre ambas células mediante el flujo de la corriente iónica y pequeñas moléculas con pesos moleculares menores de 1000 daltones y un diámetro no mayor de 1.5 nm. Cada conexón esta formado por seis subunidades proteicas llamadas conxinas las cuales estan embebidas en la membrana plasmática (Makowski et al., 1977). De esta manera en la sinapsis eléctrica no se produce el retardo sináptico del impulso nervioso al pasar de una neurona a la otra, lo cual parece ser la ventaja más importante de las sinapsis eléctricas, en términos de sincronización de sistemas neurales, especialmente aquellos relacionados con las reacciones de escape en los peces o de invertebrados como los insectos (Kandel et al., 1991) (Fig. 1).

En la transmisión eléctrica, el flujo de corriente generado por un potencial de acción es capaz de transmitir la despolarización directamente a través de la sinapsis, permitiendo la entrada de

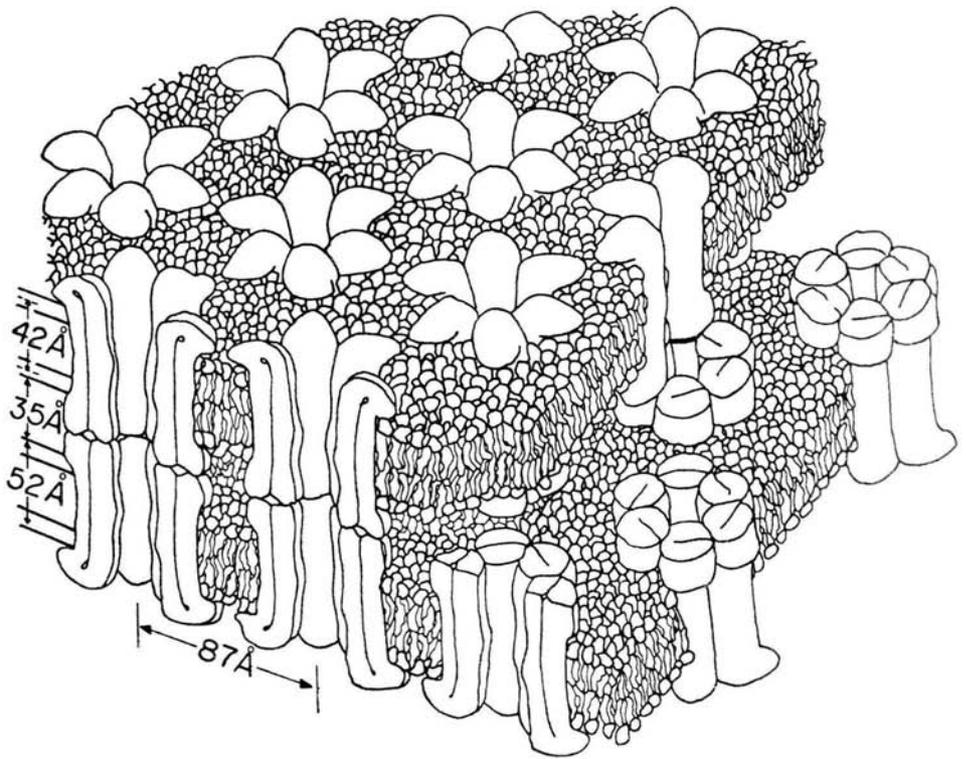


Fig. 1 Estructura molecular de la union comunicante (gap junction) donde se observa la disposición de los canales de proteína llamados conexones que permiten la comunicación entre una neurona y otra, característica de las sinapsis eléctricas. Tomado de Makowski et al., 1977.

iones sodio desde el exterior de la célula presináptica al interior de la terminal postsináptica a través de canales que se forman al entrar en contacto dos estructuras "gap", una de cada célula. La resistencia de la membrana en este tipo de unión es muy baja lo que permite que la transmisión eléctrica sea bidireccional, es decir que el paso de la corriente iónica fluya en ambas direcciones (de la pre a la postsinapsis y viceversa) (Kandel et al., 1991).

2 Transmisión sináptica de tipo químico.

La transmisión química es un fenómeno secretorio que se caracteriza por la liberación de neurotransmisores de la terminal presináptica hacia la región postsináptica de otras neuronas o bien a células del sistema endócrino y muscular. En este tipo de sinapsis no hay contacto entre las membranas, ya que se encuentran separadas por un espacio de aproximadamente 20 nm, que a pesar de ser tan pequeño, es lo suficientemente grande para impedir la conducción de un impulso eléctrico. Cuando el transmisor químico interacciona con el receptor específico de la neurona postsináptica altera los flujos iónicos de tal manera que la membrana se despolariza si el transmisor es excitador, o se hiperpolariza si el transmisor es inhibitorio (Pasantes-Morales et al., 1991).

Las terminales axónicas o presinápticas establecen contactos sobre diferentes regiones de la neurona postsináptica, distinguiéndose los siguientes tipos de sinapsis:

1. Sinapsis axodendríticas: Son aquellas que se establecen entre las terminales axónicas y las dendritas de la neurona postsináptica .
2. Sinapsis axosómicas: Se establecen entre las terminales axónicas y el soma de la célula o bien a nivel del cono axónico .

3. Sinapsis axoaxónicas: Este tipo de contacto ocurre entre una terminal axónica y otra terminal axónica. No son muy frecuentes y su distribución es limitada en el sistema nervioso central .
4. Sinapsis dendrodendríticas : Se realiza entre una dendrita con cierta especialización presináptica y presencia de vesículas sinápticas y otra dendrita .
5. Sinapsis neuromuscular: Las características de este tipo de sinapsis entre las terminales axónicas y los músculos son en primer lugar que la terminal presináptica es muy grande y contiene un gran número de vesículas sinápticas; además el espacio sináptico es más grande (40-50 nm) y la membrana postsináptica del músculo no es recta, sino que presenta surcos hacia el interior.

La variedad en la forma de las sinapsis, es decir, la manera en que la terminal presináptica se relaciona estructuralmente con las regiones postsinápticas presenta implicaciones en la formación de circuitos neurales, ya que una terminal axónica puede establecer más de una sinapsis con una única región postsináptica, con más de una región postsináptica de la misma neurona o con regiones postsinápticas de distintas neuronas También existen terminales axónicas que no son estrictamente terminales y que pueden ser sólo una especialización del axón para formar sinapsis sin que dicho axón acabe en ese sitio (Tomado de Pasantes-Morales et al., 1991).

2.1 Terminal Presináptica

La terminal presináptica contiene en su interior mitocondrias, cuerpos multivesiculares, elementos tubulares del retículo endoplásmico, vesículas sinápticas y material citoplásmico denso asociado a la membrana presináptica, cuya estructura se ha definido en parte como proyecciones electrodensas (Palay y Chan-Palay, 1977). Las primeras fotografías de una sinapsis realizadas por microscopía electrónica dieron gran información sobre la morfología y función de esta área. DeRobertis y Bennett llamaron a las partículas esféricas abundantes en la presinapsis *-vesículas sinápticas-* y propusieron que eran las responsables de liberar el transmisor al exterior. Del Castillo y Katz propusieron que la liberación de neurotransmisores es de tipo cuántico y sugirieron que dichas vesículas constituyen la unidad cuantales de liberación (Kandel, 1991).

Con base en observaciones hechas a microscopía electrónica, en la actualidad se han descrito dos tipos de vesículas sinápticas: i) Vesículas agranulares, en general esféricas, de un diámetro de 40-50 nm, con una membrana de 6-10 nm y una zona central clara. Se encuentran distribuidas en toda la terminal presináptica aunque con frecuencia se agrupan en la cercanía de la membrana presináptica y a veces da la impresión de que se asocia a ella. Otro tipo de vesículas agranulares que difieren de las más comunes, son las de tipo aplanadas o elipsoidales. Se ha sugerido que las terminales que contienen este tipo de vesículas aplanadas son de naturaleza inhibitoria, mientras que aquellas con vesículas esféricas son excitadoras (Fig. 2 a-b). ii) Vesículas de corazón denso, son de tamaño más variable algunas similares a las granulares (40-60 nm) y otras mucho mayores (80-100 nm). La región central de estas vesículas es opaca a los electrones y se localizan en zonas alejadas de la membrana presináptica (Fig. 2c). Las terminales en las que predominan estas vesículas son las catecolaminérgicas, sin embargo, es muy raro observar que una terminal contenga sólo este

tipo de vesículas, ya que hay más vesículas agranulares que granulares (Shephard, 1988; Palay y Chan-Palay, 1977; Pasantes-Morales, et al., 1991).



Figura 2 Tipos de vesículas sinápticas. Vesículas agranulares (A) esféricas y (B) aplanadas o elipsoidales. Vesículas de corazón denso (C). Tomado de Pasantes-Morales et al., Neurobiología Celular, 1991.

Los trabajos a microscopía electrónica efectuados por Palay en 1958, hicieron notar que las dos membranas que forman la sinapsis aparecen más gruesas o más densas, sugiriendo que esos sitios en la membrana eran especializaciones, por donde se liberaba el contenido de las vesículas, denominando a esos sitios complejos sinápticos (Kandel, 1991).

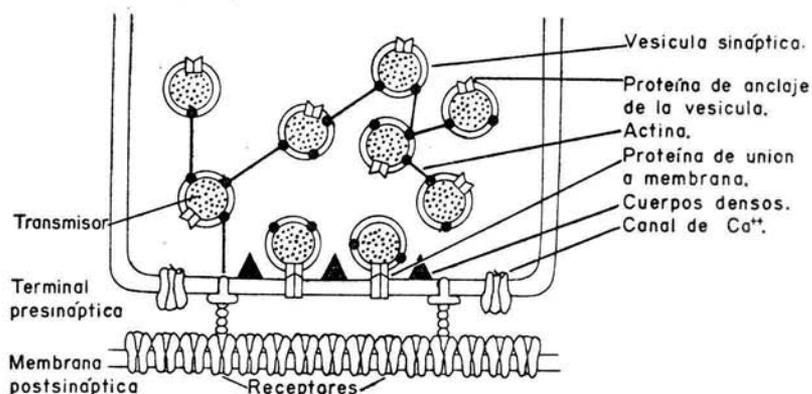
En 1959 Couteaux utilizó la técnica del ácido fosfotúngstico para teñir proteínas en las neuronas, postulando que las vesículas sinápticas no están dispersas al azar, sino que están concentradas cerca de la membrana donde existe una mayor densidad óptica, tal densidad corresponde a una serie de barras densas localizadas en la superficie interna de la membrana. A partir de este tipo de especialización (vesícula sinápticas y zonas de densidad presinápticas) Couteaux definió como zona activa a la región especializada y zona restringida a la ubicada dentro de la terminal presináptica, donde el neurotransmisor es liberado (Kandel, 1991). De esta forma se estableció que la polaridad de la sinapsis es en un solo sentido: de la pre a la postsinapsis.

Por otro lado, los primeros estudios realizados sobre los mecanismos presinápticos de la liberación de neurotransmisores involucraron técnicas electrofisiológicas, tales como el registro intracelular en la fibra muscular (postsinapsis). Los trabajos morfológicos realizados en 1960 por Reese y Heuser a nivel de la unión neuromuscular en rana propusieron la liberación del transmisor acetilcolina a través de la fusión de la vesícula en la membrana presináptica por un mecanismo de exocitosis (Kandel, 1991).

Los mecanismos moleculares responsables de la liberación de transmisores son poco conocidos, así también cómo es que el calcio provoca la liberación del neurotransmisor. La teoría general es que el calcio promueve la exocitosis mediante la movilización de las vesículas sinápticas, su integración a la membrana plasmática de la terminal en la zona sináptica, y la subsecuente liberación del transmisor al medio. Durante el estado de reposo los canales de calcio sensibles a voltaje están cerrados y muchas de las vesículas de la zona activa se encuentran ancladas unas a otras por filamentos del citoesqueleto y proteínas asociadas llamadas *sinapsinas*, mientras otras vesículas se encuentran unidas a la zona activa a través de proteínas llamadas *sinaptofisinas*. Al producirse un potencial de acción los canales de calcio se abren, el calcio entra a la terminal y provoca la fosforilación de los filamentos de actina, permitiendo el libre movimiento de las vesículas hacia los sitios activos para después fusionarse a la membrana plasmática (Fig. 3).

En el momento de la liberación, las vesículas son incorporadas a la membrana plasmática, provocando una expansión en el área de esta membrana. La membrana plasmática se dobla secuencialmente hacia el interior, estrangulándose en ciertos puntos y formando vesículas, que luego parecen fusionarse para construir cisternas de las cuales las vesículas sinápticas nuevamente son constituidas (Fig. 4). Este proceso de exocitosis y de construcción de vesículas se ha descrito en otras preparaciones como en la unión neuromuscular en invertebrados y en la sinapsis del ganglio cervical superior (Smith y Augustine, 1988; Kandel, 1991; Schwartz, 1991).

A Estado de reposo



B Entrada de Calcio

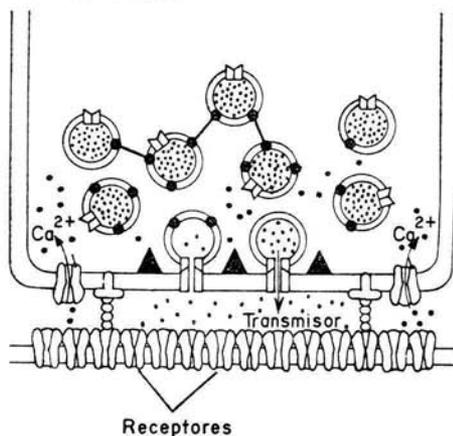


Figura 3 La entrada de calcio afecta la excitocitosis y la movilización de vesículas sinápticas hacia la zona activa. **A** En estado de reposo, muchas vesículas se encuentran unidas unas a otras por filamentos de actina y muy pocas están fijadas a la zona activa. **B** La entrada de calcio provoca el movimiento de las vesículas hacia la zona activa y permite la fusión de éstas con la membrana plasmática. Tomado de Kandel et al., Principles of Neural Science, 1991.

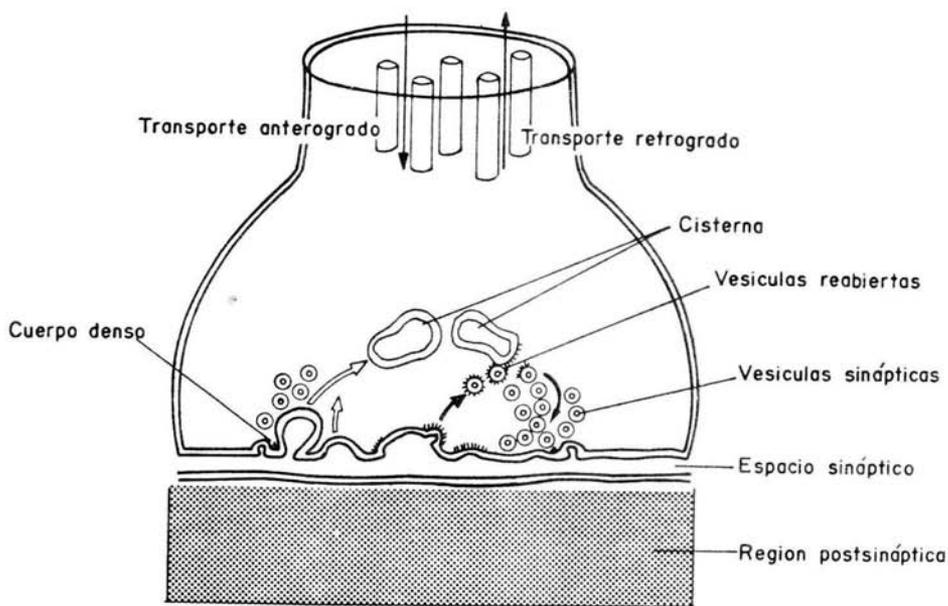


Figura 4 Esquema en el que se representa el momento en el que ocurre la liberación de las vesículas sinápticas hacia el espacio sináptico y el proceso de reciclamiento de éstas vesículas dentro de la terminal presináptica. Tomado de Kandel et al., *Principles of Neural Science*, 1991.

2.2 Espacio Sináptico

El espacio formado entre la membrana presináptica y postsináptica se conoce como el espacio sináptico. Mide aproximadamente entre 15-20 nm de ancho. Es en esta región donde se liberan los neurotransmisores y donde serán recaptados por mecanismos de alta afinidad a la terminal presináptica. Observaciones con microscopio electrónico han mostrado la presencia de mucopolisacáridos y proteínas, que de manera similar han sido encontrados en el glicocalix de otros tipos celulares. Se ha encontrado también enzimas como la acetilcolinesterasa que participa en la degradación del neurotransmisor acetilcolina después de ser liberado al espacio sináptico como un mecanismo de remoción rápida del transmisor del medio. Existen ciertas evidencias de que en ciertos sistemas la liberación de enzimas se realiza en la propia terminal además del neurotransmisor. Por otro lado, se ha observado en esta región, la presencia de ácido siálico elementos constituyentes de los gangliosidos, los cuales se localizan unidos a la membrana presináptica y postsináptica y que participan de manera importante en la transmisión sináptica al unir moléculas del transmisor liberado (Palay y Chan-Palay, 1977; Peters et al., 1991).

2.3 Terminal Postsináptica

La región postsináptica presenta asociada a la membrana material citoplásmico denso, así como, menos frecuentemente, los llamados cuerpos densos postsinápticos, que forman arreglos hexagonales adyacentes a la membrana pero no claramente asociados a ella (Pasantés-Morales et al., 1991; Erulkar, 1989); también se han observado cisternas subsinápticas, cuerpos multivesiculares, especializaciones micropinocitóticas y el aparato espinal dendrítico

(característico de las sinapsis de tipo axodendrítico). Sin embargo la especialización más importante no es a nivel morfológico sino bioquímico. Esta especialización bioquímica es el receptor, que permite la decodificación del mensaje contenido en la molécula del neurotransmisor. La respuesta inducida en la estructura postsináptica no es totalmente dependiente del neurotransmisor involucrado, sino del tipo de sistema de transducción al que está acoplado el receptor postsináptico, ya que un mismo neurotransmisor puede producir un efecto diferente en dos regiones distintas del sistema nervioso (Erulkar, 1989).

B. Función del calcio en los procesos celulares.

1. Importancia biológica del calcio.

Las células de todos los seres vivos han desarrollado funciones muy complejas que requieren de mensajeros entre el medio externo e interno. La actividad de las células está caracterizada por cambios en la permeabilidad de la membrana y el movimiento resultante de diferentes iones a través de ésta: así el sodio, el potasio, el magnesio y el calcio tienen papeles importantes en la actividad biológica. El sodio y el potasio son necesarios en el balance osmótico de la célula, en la actividad eléctrica de la membrana plasmática y en la activación de algunas enzimas. Sin embargo, los enlaces que establecen con macromoléculas son débiles e inestables. El magnesio es importante como sustrato para todas las cinasas y algunas fosfatasa, en el funcionamiento del ATP y en la activación de algunas enzimas. El calcio por sus propiedades únicas, es uno de los iones más importantes en términos de la gran variedad de funciones que puede llevar a cabo. La concentración de calcio en el medio intracelular es muy baja (10^{-7} M) en comparación con la concentración del medio externo que es cerca de cuatro órdenes de magnitud superior (2.5×10^{-3} M). Esta diferencia de concentración entre el medio externo e interno resulta y se mantiene gracias a varios procesos. Dentro de estos se incluyen la baja permeabilidad de la membrana celular a los iones calcio, la captura de estos cationes por organelos celulares como las mitocondrias y el retículo endoplásmico y la extrusión del calcio interno

en contra de su gradiente de concentración por el sistema de bombeo de la bomba de calcio, o a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En 1983 Campbell definió la importancia del calcio en cuatro aspectos: **1) Estructural:** el calcio interviene en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del tejido óseo. **2) Eléctrico:** permite la estabilización de la membrana, ya que se une a las cargas negativas fijas en la superficie de la membrana celular. **3) Cofactor de enzimas y proteínas:** algunas requieren de calcio para una máxima actividad y una mayor estabilización, como por ejemplo en la conversión de protrombina a trombina, y en la actividad de la adenilato ciclasa y fosfolipasa A. **4) Regulador intracelular:** de algunos procesos como la contracción muscular, la neurosecreción de transmisores, en la proliferación celular al regular la síntesis de DNA, en el flujo de cationes, fecundación, acción hormonal, adhesión celular y muerte celular (Rubin, 1982; Campbell, 1983).

2 Mecanismos de liberación de neurotransmisores en la transmisión sináptica.

Los gradientes eléctricos y químicos que existen entre el axoplasma y el medio externo se deben a las propiedades de la membrana en reposo. En ésta se realiza una migración independiente de iones a través de poros intramembranosos llamados canales, los cuales son selectivos para los tipos de iones que permiten pasar basados en el tamaño, radio de hidratación y carga.

Cuando un potencial de acción es conducido desde el soma hasta la terminal presináptica los canales de calcio sensibles a voltaje (CCaSV) se abren en respuesta a la despolarización presináptica en una corriente entrante de calcio. El calcio entra al interior celular con una fuerza electromotriz resultante de la distribución asimétrica en ambos lados de la membrana con lo que se crea una elevación local y transitoria de la concentración de calcio ionizado intraterminal que es esencial para la liberación de los neurotransmisores.

Cuando la terminal es repolarizada, es decir cuando el voltaje de membrana regresa a su valor inicial, la tasa de liberación del neurotransmisor disminuye rápidamente. Lo anterior probablemente se

debe a que los CCaSV, además de ser muy selectivos para el catión, permanecen abiertos sólo el tiempo que dura la despolarización, aunque también son importantes otros mecanismos encargados de la difusión del calcio citoplasmático que mantienen su concentración intraterminal en un valor cercano a 100 nM. Los mecanismos celulares encargados en los procesos de captura y amortiguamiento son: los propios organelos intracelulares como mitocondrias, retículo endoplásmico y vesículas sinápticas; la bomba de calcio dependiente de ATP localizada en el retículo endoplásmico liso y en la membrana plasmática, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; y proteínas plasmáticas que fijan calcio como la calmodulina (McGraw et al., 1982; McBurney y Neering, 1987; Blaustein, 1988; Meldolesi et al., 1988).

3 Papel del calcio en la neurotoxicidad y muerte celular.

3.1 Receptores a aminoácidos excitadores.

El glutamato y el aspartato son dos aminoácidos excitadores (AAE) que se encuentran presentes en grandes cantidades en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. El glutamato es el

AAE más abundante y la gran mayoría de las sinapsis excitadoras en el SNC están mediadas principalmente por él. Sin embargo la mayor parte del glutamato cerebral participa en el metabolismo intermediario de neuronas y glia y sólo una fracción de la poza total del aminoácido participa en la transmisión neuronal (López-Colome, 1983). Los AAE ejercen sus funciones fisiológicas a través de distintos subtipos de receptores que han sido denominados en función de las moléculas agonistas que se unen a ellos y los activan. Estudios bioquímicos y farmacológicos indican que existen al menos 5 tipos diferentes de receptores a AAE: **1)** el sensible a N-metil-D-aspartato (NMDA); **2)** el que responde a ácido kaínico (AK); **3)** el activado por el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA); **4)** el receptor sensible al ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4); **5)** el que se modula por el ácido trans-1, 3-dicarboxílico-1-aminociclopentano (ACPD). Sin embargo de manera más general, se pueden clasificar en dos tipos: receptores NMDA y receptores no-NMDA (Watkins, 1989; Monaghan et al., 1989; Fagg y Massieu, 1991).

3.1.1. Receptor tipo NMDA

El receptor tipo NMDA es el receptor más conocido y estudiado. Ha generado mucho interés debido a la amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos en los que participa, entre los cuales están la transmisión sináptica, la diferenciación y el crecimiento neural, la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, hiperexcitabilidad neuronal típica de la epilepsia, las enfermedades neurodegenerativas y la muerte celular producida por un exceso de excitación, isquemia y anoxia (Pasantes-Morales, et al., 1991).

El receptor-ionoforo NMDA es un complejo macromolecular que tiene asociado un canal iónico selectivo para calcio, sodio, potasio y posee al menos cinco sitios de modulación (Fig. 5):

- Sitio de unión al magnesio: se localiza dentro del canal iónico asociado al receptor, y en consecuencia su unión es dependiente de voltaje, por lo que es necesario que la membrana se despolarice para que el magnesio salga de su lugar y se active el receptor permitiendo que los iones fluyan a través del canal.
- Sitio de unión a los anestésicos disociativos: se localiza en el interior del canal iónico pero se une al canal solo en estado abierto; algunos compuestos capaces de unirse a este sitio son el MK-801, la PCP y la ketamina.
- Sitio de unión al transmisor endógeno: al que se une el NMDA, el cual es más potente que el glutamato.
- Sitio de unión a la glicina: se ubica en la parte extracelular y en condiciones fisiológicas siempre se encuentra saturado por el aminoácido, condición necesaria para que el receptor pueda activarse.
- Sitio de unión al zinc: disminuye la actividad sináptica mediada por el receptor; se localiza en la parte extracelular del receptor.
- Sitio de unión a poliaminas: se ha demostrado que las poliaminas ejercen un efecto regulador importante ya que es capaz de modular la unión del MK-801; sin embargo su sitio de unión aún se desconoce (Tomado de Watkins, 1989 y Fragg y Massieu, 1991).

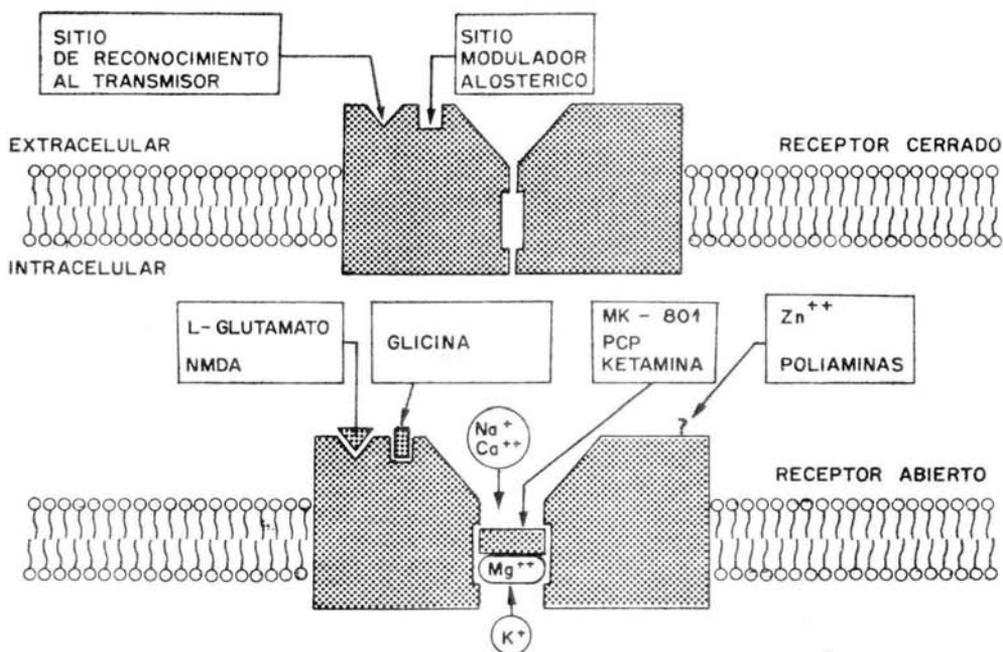


Figura 5 Estructura molecular del receptor NMDA . Tomada de Fagg y Massieu, Excitatory Amino Acid Antagonist, 1991.

3.2 Neurotoxicidad y muerte celular.

En 1957 los trabajos de Lucas y Newhouse demostraron que exposiciones a glutamato tenían la propiedad de dañar las neuronas de la retina de pollo. Olney demostró que la neurotoxicidad también ocurría en el cerebro después de la administración de glutamato o de algún otro aminoácido excitador, proponiendo que el daño neuronal era debido a un fenómeno de "excitotoxicidad" (Choi, 1990).

La intensa exposición a altas concentraciones a glutamato (100 μ M) durante 5 minutos ó bien de otros agonistas a receptores NMDA provocaban degeneración en cultivos de neuronas corticales (Choi y Rothman, 1990), por lo que se pensó que la rápida toxicidad

mediada por el receptor a glutamato podría deberse, primero a una dependencia iónica.

El fenómeno de neurotoxicidad puede ser considerado como un proceso que abarca 3 etapas: inducción, amplificación y expresión (Choi, 1990). A continuación se explica cada uno.

3.2.1 Inducción

La acumulación anormal de glutamato producida por algún proceso patológico sobreactiva a 3 de sus receptores ionotrópicos: NMDA, AK y AMPA, los cuales permiten el influjo extracelular de cationes. El ión sodio entra a través del canal selectivo localizado en los 3 tipos de receptores, su entrada va acompañada de un influjo pasivo de cloro y agua que provoca un hinchamiento en la neurona.

3.2.2. Amplificación

-*El aumento en la elevación de calcio libre intracelular*, Puede deberse a un rápido influjo de cationes mediados por receptores a glutamato, permitiendo la entrada de calcio a través de la activación de ciertas clases de CCaSV, o por activación de canales iónicos no específicos que pueden ser permeables a calcio.

- *Proteína cinasa y modificación de proteínas*, La proteína cinasa C (PKC) es activada por DAG en presencia de fosfatidilserina y calcio libre. La activación de PKC cataliza la fosforilación de muchas proteínas las cuales modificarán la excitabilidad y comportamiento de la neurona.

3.2.3 Expresión

La elevación de calcio libre intracelular puede provocar la movilización de varias cascadas destructivas que llevan a una degeneración neuronal. El hecho más importante es la activación de enzimas catabólicas y la generación de radicales libres originados de la acción enzimática de la xantina oxidasa, la activación de endonucleasas y fosfolipasas así como la ruptura de la membrana y la liberación de ácido araquidónico (Fig. 6) (Choi, 1988; 1990; 1991).

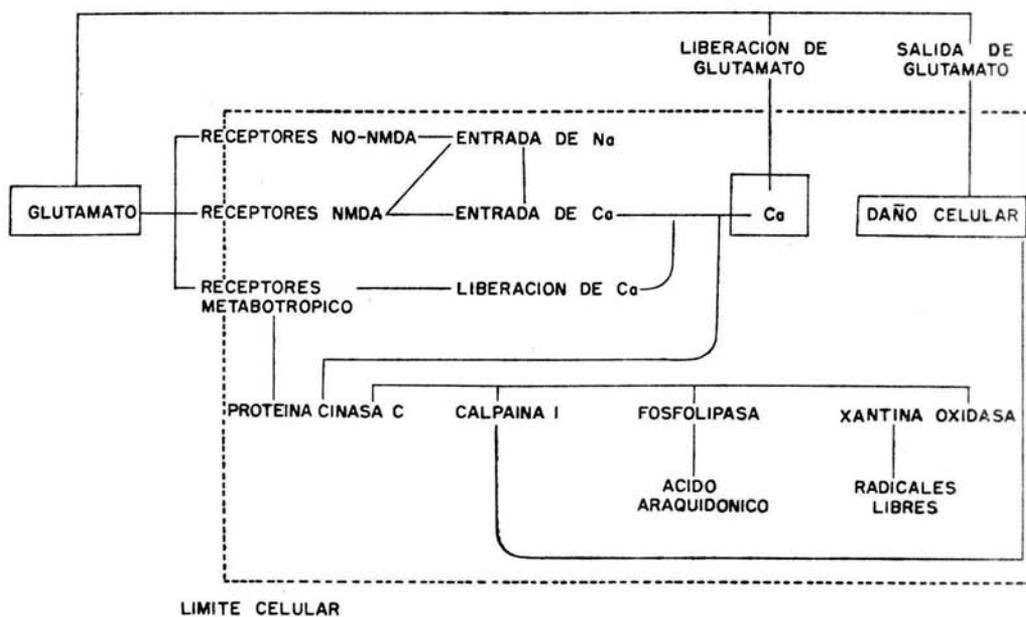


Figura 6 Diagrama en el que se ilustra como el calcio provoca degeneración y muerte neuronal inducida por glutamato. Tomado de Choi, Neuron 1: 623 - 634, 1988.

3.3 Dantrolene

3.3.1 Generalidades. Características físicas y químicas.

El dantrolene fue desarrollado en 1967 por Snyder y colaboradores y más tarde sintetizado comercialmente por Eaton Laboratories, Norwich Pharmacal Co. (citado por Cox et al., 1969). La estructura química del dantrolene es la siguiente: 1-[[5 (p-nitrofenil) furfurlideno] amino] hidantoina, (Fig. 7 a). Es un compuesto con un peso molecular de 314.26 posee un pKa de 7.5 y un pH de 7.4 a 20° C. Es poco soluble debido a su carácter ácido e hidrofóbico, sin embargo cuando se incrementa el pH de 5.4 a 9.4 la solubilidad de la molécula tiende a aumentar (Vallner et al., 1976; Jansen et al., 1991). El dantrolene es una droga lipofílica y cruza fácilmente la membrana plasmática, la placenta y la barrera hematoencefálica (Desmedt y Hainaut, 1975; Ward et al., 1986).

3.3.2 Farmacocinética y metabolismo.

Muchos métodos se han reportado para la cuantificación del dantrolene en los fluidos biológicos, como la polarografía de fase diferencial, la espectrofotofluorimetría, la colorimetría y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), sin embargo la poca solubilidad del dantrolene y sus metabolitos en muchos solventes incluido el agua y su degradación en presencia de luz son factores que constituyen ciertas limitaciones para su análisis (Wuis et al., 1982).

Estudios realizados en el hombre y en algunos animales demuestran que aproximadamente el 70% de la dosis administrada por vía oral es absorbida en el intestino delgado.

Experimentos *in vitro* sugieren que el dantrolene interactúa con la albúmina del suero humano en por lo menos dos sitios (Vallner, 1977). En retículo sarcoplásmico de músculo esquelético se han reportado 2 clases de sitio de unión para este compuesto, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, mientras que en el retículo sarcoplásmico de músculo cardíaco de cerdo solo se identificaron sitios de baja afinidad, lo que puede explicar en parte el efecto tan reducido de la droga sobre esta clase tejido (Sengupta et al., 1980).

En el hombre el dantrolene es metabolizado en el hígado. El metabolismo se realiza por vías reductoras y no reductoras. (Fig. 7 b). El grupo amino del dantrolene es reducido a amina, y en algunos animales, incluyendo al hombre el grupo amina es acetilado. Estos metabolitos reducidos (F490 y F563) son incapaces de producir relajamiento muscular. El metabolito acetilado (F490) se ha detectado en el plasma sanguíneo y orina, pero no así el metabolito aminado (F563). La oxidación del dantrolene da como resultado al 5-hidroxicantrolene presente en el plasma sanguíneo y orina y capaz de producir relajación muscular (Cox, et al., 1969; Wuis et al., 1982).

En humanos voluntarios se ha medido la tasa de eliminación de esta droga, reportándose que de un 15-25% de la dosis administrada por vía oral es excretada por el riñón. El 79% de la droga excretada por la orina es 5-hidroxicantrolene, mientras que el 17% es excretado como dantrolene acetilado y un 4% como dantrolene. La vida media de éste fármaco es de 6 a 9 horas y en condiciones extremas de 3 a 22 horas; la vida media del 5-hidroxicantrolene es de aproximadamente 15.5 horas (Ward, et al., 1986).

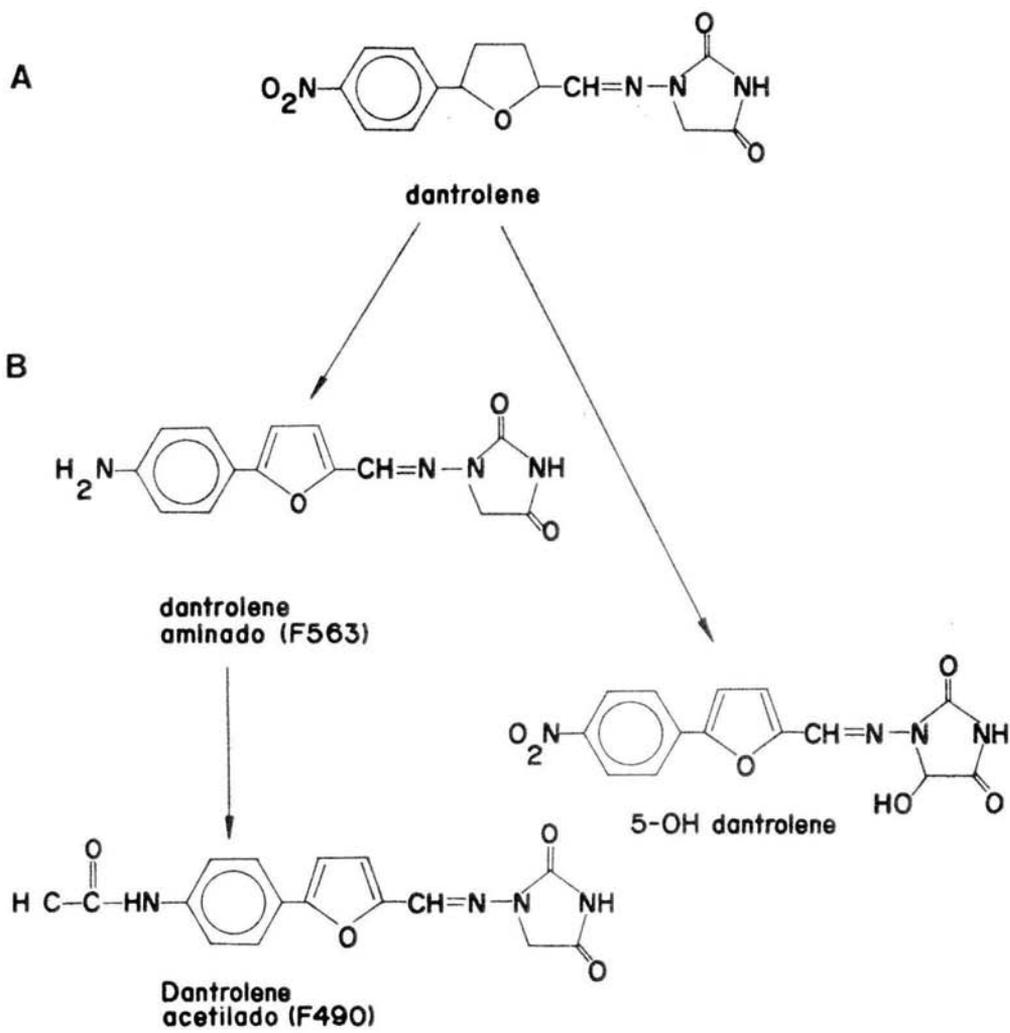


Figura 7 **A** Estructura química del dantrolene. **B** Vías metabólicas del dantrolene: reductora (F563 y F490) y no reductora (5-OH dantrolene). Tomado de Wuis, et al., Journal of Chromatography 23: 401 - 409, 1982.

3.3.3 Aplicaciones Clínicas.

A partir de la década de 1970 y 1980 el dantrolene se ha utilizado en la clínica para el tratamiento de síndromes hipercatabólicos como la hipertermia maligna, una enfermedad hereditaria de tipo autosómico dominante, caracterizada por disturbios metabólicos. A nivel celular la reacción parece deberse a un repentino aumento en la concentración de calcio en el citoplasma del músculo, activado por una serie de eventos bioquímicos anormales. El síndrome se manifiesta por los siguientes síntomas: taquicardia, alteración en la presión sanguínea, arritmias, hiperventilación, hipertermia, rigidez muscular, cianosis, hipoxia, acidosis metabólica y respiratoria, mioglobinuria y anormalidades electrolíticas. La incidencia en la población es más común en el hombre y disminuye después de iniciada la pubertad. El dantrolene se ha empleado como agente profiláctico para esta enfermedad, por sus efectos farmacológicos actúan sobre el mecanismo intrínseco de la contracción muscular en músculo esquelético (Ward et al., 1986).

También se ha utilizado en pacientes con síndrome neuroléptico maligno quienes presentan hipertermia, acinesia, rigidez muscular, alteraciones hepáticas, elevación en la concentración de creatina cinasa en suero. Este síndrome frecuentemente aparece en pacientes con enfermedades psiquiátricas tratados con drogas neurolépticas (Ward et al., 1986; Dickey, 1991). Estudios recientes sugieren que la patogénesis de este síndrome está relacionada a una disminución en los niveles de dopamina, o bien que los receptores dopaminérgicos del hipotálamo y ganglios basales se encuentren bloqueados, y a cambios metabólicos en la fibras de músculo esquelético. El tratamiento empleado para estos pacientes es la combinación de agonistas dopaminérgicos (amantidina, bromocriptina y L-dopa) y dantrolene que provoca relajación muscular y disminuye los niveles de la creatina cinasa (Dickey, 1991).

En muchos pacientes con espasticidad muscular el dantrolene reduce de manera significativa el tono muscular, las clonías, calambres y espasmos musculares y ha mejorado notablemente las funciones neurológicas tanto motoras como el control urinario. Sin embargo no todos los enfermos responden a este fármaco. En pacientes con espasticidad muscular debido a una distrofia muscular, parálisis cerebral o daño en médula espinal (hemiplejía, paraplejía) tienden a responder mejor que aquellos con esclerosis múltiple. Efectos similares se producen en pacientes con parálisis rígida ya que muestran cierta recuperación cuando se les administra dicha droga, pero no así con quienes sufren de parálisis flácida (Ward et al., 1986).

3.3.4 Efectos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

El dantrolene actúa intracelularmente en la contracción de las células de músculo esquelético inhibiendo la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, disminuyendo la contracción muscular sin alterar las propiedades eléctricas de la membrana muscular (Van Winkle, 1976; Morgan y Bryant, 1977; Desmedt y Hainaut, 1977). El dantrolene disminuye la capacidad de los canales de calcio para liberar Ca^{2+} durante la despolarización de la fibra sin afectar al sistema intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} , o a la enzima ATPasa del calcio responsable de la recaptura de calcio en retículo sarcoplásmico (Desmedt y Hainaut, 1975; 1979).

Estudios *in vivo* en cerdos susceptibles a hipertermia maligna han demostrado que el dantrolene inhibe el acoplamiento excitación-contracción, previniendo los efectos de la hipertermia maligna (Gronert et al., 1976; Harrison, 1975).

Experimentos *in vitro* utilizando músculo esquelético aislado de animales susceptibles a hipertermia maligna indican que esta droga inhibe la contracción muscular inducida por halotano, cafeína, suxametonina y cloruro de potasio (Okumura et al., 1980).

Los trabajos realizados *in vivo* en el sistema cardiovascular de perros y ovejas demuestran que el efecto del dantrolene en músculo cardíaco no es significativo (Ellis et al., 1973), sin embargo, Meyler y colaboradores (1976), observaron que en preparaciones *in vitro* de corazón de rata el dantrolene es capaz de disminuir la contracción

Los trabajos realizados *in vivo* en el sistema cardiovascular de perros y ovejas demuestran que el efecto del dantrolene en músculo cardíaco no es significativo (Ellis et al., 1973), sin embargo, Meyler y colaboradores (1976), observaron que en preparaciones *in vitro* de corazón de rata el dantrolene es capaz de disminuir la contracción muscular del corazón sin alterar la frecuencia cardíaca. Mészáros et al. (1981) reportaron que la droga facilita la entrada de calcio al interior de la célula e inhibe la permeabilidad de la membrana del retículo sarcoplásmico a iones calcio provocando que el eflujo transmembranal de calcio disminuya debido a la acumulación intracelular de calcio libre. Se ha postulado que presenta cierta actividad antiarrítmica en arritmias cardíacas inducidas experimentalmente por cloroformo en ratón, o por oclusión de la arteria coronaria en perro. Los estudios *in vitro* de Bolling y Gardner en 1985 demostraron que al inducir isquemia en corazón de conejo, el dantrolene previene el daño celular, disminuyendo la rigidez ventricular sin afectar la contracción muscular (Citado por Ward et al., 1986).

Observaciones realizadas *in vitro* en músculo liso indican que el dantrolene reduce la contracción muscular en el útero y la tráquea de cobayo, y el útero y el ileo de rata, aunque no en el mismo grado que lo reportado en preparaciones de músculo esquelético; sin embargo Mahmoudian et al. (1981) señalan que el efecto de dicha droga sobre músculo liso es la misma que la descrita para músculo esquelético.

Lowndes (1975) estudió el efecto del dantrolene en la placa neuromuscular del gato, sugiriendo que este compuesto no altera la transmisión neuromuscular.

Por otro lado los trabajos realizados *in vitro* por Janic et al. (1982) observaron que el dantrolene inhibe la liberación de insulina estimulada por glucosa, manosa y gliceraldehído, postulando que el dantrolene interfiere en la movilización de reservorios de calcio en las células beta.

3.3.5 Propiedades neuroprotectoras del dantrolene en la toxicidad celular

El dantrolene disminuye la movilización de calcio de reservorios intracelulares en células adrenales y varios tipos celulares más (Kojima et al., 1984; Ward et al., 1986). Recientemente se ha reportado que este fármaco posee propiedades neuroprotectoras en contra de la toxicidad celular inducida por glutamato (Frandsen y Schousboe, 1991). En cultivo de células granulares de cerebelo, el dantrolene previene el aumento en la concentración de calcio intracelular inducida por glutamato (Bouchelouche et al., 1989).

La citotoxicidad producida por glutamato, como ya se ha mencionado, estimula la liberación de calcio de reservorios intracelulares debido a la entrada de calcio extracelular o bien por la acción de segundos mensajeros. Frandsen y Schousboe (1991,1992) propusieron que el efecto protector del dantrolene se debe precisamente a su efecto inhibitorio de la liberación de calcio de fuentes intracelulares, cuando se estimula el receptor NMDA pero no al de KA o AMPA.

C. El Hipocampo.

1 Citoarquitectura.

En los roedores la formación hipocámpica presenta una forma de C, se encuentra adyacente a las paredes ventroposterior y ventrolateral de la corteza cerebral. El hipocampo es una estructura que presenta una organización laminar, bien limitada, en el que se pueden distinguir tres principales regiones: el giro dentado, el asta de Ammón y el complejo subicular.

El asta de Ammón consta de seis estratos, que son de externo a interno: **Alveus**: en este sitio se cruzan las fibras aferentes que llegan al hipocampo provenientes de otras regiones y las fibras eferentes que están formadas por los axones de las células piramidales que se proyectan hacia otras áreas del cerebro. **Oriens**: posee células en canasta que se localizan cerca del borde del estrato piramidal, sus axones no penetran hacia el álveus, sino que se agregan hacia atrás a través del estrato radiado para formar un denso plexo en cesto alrededor del cuerpo de las células piramidales. También contiene fibras aferentes y eferentes y células polimórficas. Esta capa se divide en dos zonas, externa e interna. Las células de la zona externa envían axones a la capa molecular. Las de la zona interna emiten algunos axones hacia el álveus, mientras que otras se ramifican dentro de esta capa o pasan a la capa piramidal. **Piramidal**: es el estrato más característico del hipocampo, está compuesto por células piramidales grandes y pequeñas, las cuales presentan varias diferencias morfológicas, especialmente en las dendritas. Las dendritas basales se distribuyen horizontalmente por el estrato oriens y las dendritas apicales se ramifican hacia los estratos radiado y molecular situados más profundamente. Los axones de estas células atraviesan la zona del oriens para entrar en el álveus de ahí pasan a la fimbria y posteriormente al fornix constituyendo la principal vía eferente del hipocampo. Estos axones

emiten ramas laterales denominadas colaterales de Schaffer que penetran a la capa lacunoso-molecular donde establecen sinapsis con las dendritas apicales de otras células piramidales. Otro tipo de neuronas que se localizan en esta capa son las células en candelabro. **Radiado:** está compuesto por prolongaciones de las dendritas apicales de las células piramidales. **Lacunoso-molecular:** considerados a veces como una sola lámina contiene células estrelladas, ramificaciones de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras aferentes.

Si bien la arquitectura de la formación del hipocampo es uniforme en toda su extensión, existen variaciones en la morfología celular y diferencias en el desarrollo de las diversas regiones corticales y en las vías que siguen los distintos sistemas de fibras. Sobre la base de estas diferencias citoarquitectónicas y conexiones Lorente de Nó, en 1934 subdividió el asta de Ammón en varios campos: CA₁, CA₂, CA₃ y CA₄.

El giro dentado es una estructura trilaminar constituida por las siguientes capas: **Molecular:** es el estrato más superficial contiene las dendritas de las células granulares, carece de células aunque se han descrito algunas neuronas de tipo fusiforme y triangulares. **Granular:** contiene neuronas esféricas u ovals densamente agrupadas, sin embargo las células más importantes de esta capa son las granulares cuyas prolongaciones dendríticas penetran a la lámina molecular. Las fibras axonales de estas células conocidas como "fibras musgosas" (por la gran cantidad de varicosidades), emiten colaterales hacia neuronas de la capa del hilus y dendritas apicales de las células piramidales del estrato radiado. Otros axones de estas células llegan al álveus para incorporarse posteriormente a la fimbria. **Hilus:** llamada también área CA₄, contiene una población neuronal muy heterogénea, incluye neuronas polimórficas, fusiformes y células piramidales modificadas, sin embargo las células musgosas son las más abundantes. Estudios por inmunocitoquímica han revelado que algunas de estas neuronas contienen GABA, colecistokinina (CCK), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y somatostatina, aunque algunas

de estas células contienen glutamato como principal neurotransmisor.

El complejo subícular es considerado como una continuación de la corteza entorrinal, presenta una transición y diferenciación celular gradual en su organización apreciándose las siguientes áreas: **Parasubículo**: se localiza contiguo a la corteza entorrinal, posee neuronas fusiformes, triangulares, polimórficas y células piramidales de tamaño medio. **Presubículo**: contiene muy pocas neuronas fusiformes, triangulares y poliformórficas de tamaño pequeño densamente agrupadas. **Subículo**: presenta un gran número de neuronas fusiformes y polimórficas que se distribuyen a lo largo de toda la capa (López-Antunez, 1980; Walaas, 1983; Carpenter y Sutin, 1990; Lothman et al., 1991). En la figura (8) se muestra la manera en la que están orientados los diferentes tipos de estratos que conforman las principales regiones del hipocampo, así como algunas de sus principales tipos celulares.

2 Vías aferentes y eferentes

La transmisión sináptica del hipocampo se inicia a través de la información proveniente desde el locus coeruleus, rafe, tálamo, septum y amígdala que llegan a la corteza entorrinal y forman la vía perforante (VP), principal vía aferente al hipocampo. Algunas de las fibras que constiuyen a la VP provienen de la corteza entorrinal, atraviesan el subículo y llegan al estrato lacunoso-molecular y establecen sinapsis axodendríticas con las dendritas apicales de las células piramidales de las regiones CA3 y CA1. Sin embargo, la mayor parte de las fibras de la VP llegan al giro dentado en donde hacen sinapsis axodendríticas con las células granulares; el neurotransmisor de estas fibras es el glutamato. A su vez, las células granulares emiten axones -las fibras musgosas- que hacen sinapsis con las espinas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA3, en la llamada capa lúcida. Las neuronas

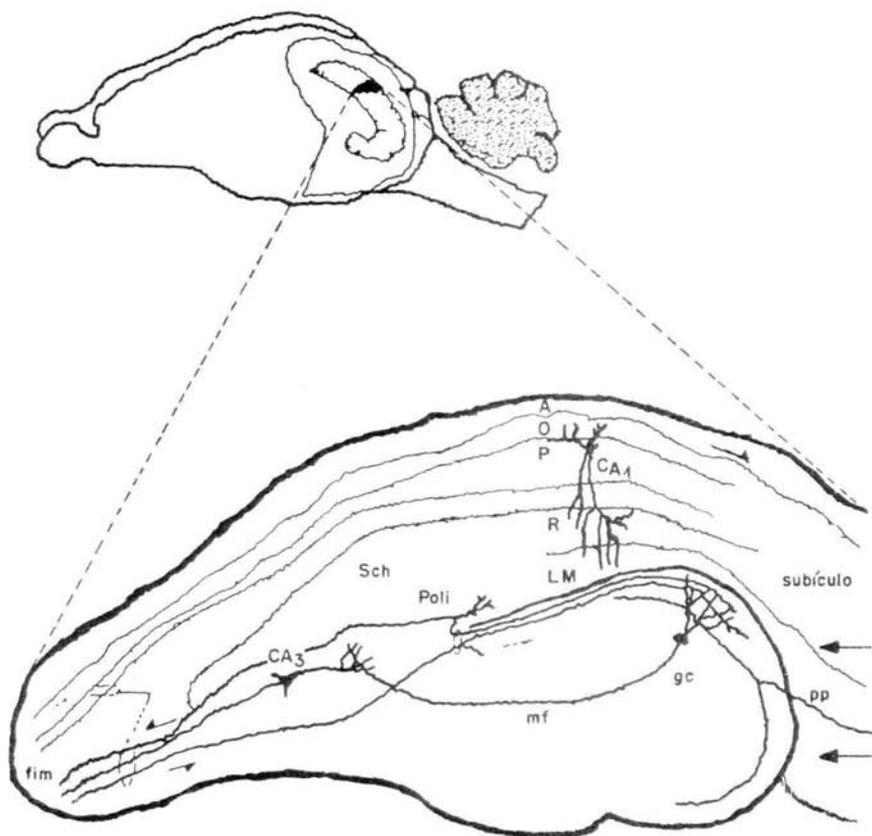


Figura 8 Esquema que muestra la localización del hipocampo en el cerebro de rata. La figura inferior representa un corte transversal del hipocampo con sus principales tipos celulares y vías. Las flechas indican la dirección del impulso y conducción nerviosa. Los símbolos son: A- alveus; O- estrato oriens; P- estrato piramidal; R- estrato radiado; LM- estrato lacunoso-molecular; Poli- neuronas polimórficas; Sch- colaterales de Schaffer; región CA1-CA3; fim- fimbria; mf- fibras musgosas; gc- células granulares; pp- vía perforante; subículo. Tomado de Pohorecki, et al., Rev. Clin. Basic Pharmacol 6:189 - 211, 1987

de CA₃ emiten axones que dan origen a las colaterales de Schaffer, éstas van a la región CA₁ y hacen sinapsis, principalmente con las dendritas apicales de las células piramidales de esta región.

Las colaterales de Schaffer del hipocampo contralateral también dan lugar a otra importante vía de entrada a la estructura: la vía comisural. Sus fibras, que también se originan en el hilus, entran por la fimbria al hipocampo contralateral y hacen sinapsis con las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales en CA₁ y CA₃. Otra parte de las fibras van a la capa molecular para hacer sinapsis con las interneuronas en cesta asociadas a las células granulares (Fig. 8). La vía comisural también emplea al ácido glutámico como neurotransmisor (Bayer, 1985; Andersen, 1987; Lambert et al., 1989; Lothman et al., 1991).

El subículo recibe aferencias del núcleo rafé y locus coeruleus. Las capas del presubículo y parasubículo reciben densas prolongaciones del núcleo anterior tálamico vía cíngulo. La región cortico anterior, cortico posterior, basolateral y lateral del núcleo amigdaloides se proyectan en la porción ventral del subículo y parasubículo. Las células piramidales de la región CA₁ emiten una gran cantidad de fibras hacia el subículo. Las células de CA₃ se proyectan hacia todo el complejo subicular a través de las colaterales de Shaffer.

Por su parte los estratos del presubículo, parasubículo y subículo hacen sinapsis con el núcleo tálamico anterior, núcleo del septum, región lateral del núcleo amigdalino, núcleo hipotálamico, cuerpos mamilares, núcleo acumbens y parte medial del núcleo anterior olfatorio.

La principal aferencia de la corteza entorrinal proviene del bulbo olfatorio. También se han descrito fibras aferentes del núcleo rafé dorsal, núcleo del tegmento reticular, locus coeruleus y área posteromedial del tegmento ventral, así como del núcleo magnocelular y supramamilar del hipotálamo.

Las proyecciones eferentes de la corteza entorrinal se dirigen hacia la parte lateral del núcleo acumbens, la región anteromedial del caudado-putamen y área medial del tubérculo olfatorio y porción

anterior del núcleo olfatorio. De igual manera, se han reportado conexiones hacia la región ipsilateral de la corteza piriforme, giro cingulado, corteza prefrontal, área lateral y basolateral de la amígdala y núcleo del septum (Bayer, 1985; Andersen, 1987; Lothman et al., 1991).

3 Región CA₁ hipocámpica. Organización y neuroquímica.

El hipocampo presenta varios tipos de interneuronas inhibitorias que se encuentran distribuidas diferencialmente, y que poseen características morfológicas específicas. La región CA₁ contiene además de las células piramidales, a las células en canasta que proyectan sus axones y los ponen en contacto con las dendritas y somas de las células piramidales y ejercen un efecto inhibitorio mediado por GABA. Este tipo de inhibición es recurrente ya que las células piramidales también prolongan sus axones hacia el soma de las células en canasta y así las excita. Otro tipo de interneuronas, es una población de células con axones cortos, denominadas células estrelladas, que se localizan en el estrato lacunoso-molecular del hipocampo. Un tercer tipo de neuronas son las células en candelabro del estrato piramidal, cuyos axones terminan alrededor del segmento inicial del axón de las neuronas piramidales. Se ha demostrado que muchas de estas neuronas contienen GAD, por lo que se ha postulado que la excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo está controlada por el efecto inhibitorio que ejercen estas interneuronas GABAérgicas (Andersen, 1987; Walaas, 1983).

Por otra parte, las proyecciones que emiten el núcleo septal medial y el núcleo de la banda diagonal hacia el hipocampo son de tipo colinérgico; estas fibras van a través de la fimbria y sus terminales llegan al estrato oriens en CA₃ al hilus, al giro dentado, al estrato piramidal y a las dendritas basales de las neuronas piramidales en CA₁ (Pohorecki, et al., 1987; Hass, 1983).

Las fibras eferentes que parten del locus coeruleus pasan a través del cerebro anterior vía el fascículo medial y llegan al estrato lacunoso-molecular de la región CA₁. Se ha reportado que éste sistema de fibras contiene norepinefrina (NE), que interactúa por medio de receptores α -2 adrenérgicos con terminales de las interneuronas GABAérgicas que hacen sinapsis con las dendritas y los somas de las células piramidales. El área tegmental ventral y la sustancia nigra proyectan terminales dopaminérgicas hacia el estrato oriens, produciendo efectos inhibitorios sobre las neuronas piramidales de CA₁.

Las aferencias serotoninérgicas provienen del núcleo superior y el núcleo del raqué dorsal y se proyectan hacia el estrato radiado y lacunoso-molecular, haciendo sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales que ejercen un efecto inhibitorio tónico sobre éstas células.

El estrato oriens contiene gran cantidad de fibras con somatostatina que excita a las neuronas piramidales. Algunos de los axones eferentes que contienen histamina de la región supramamilar del hipotálamo se dirigen hacia el hipocampo, atraviesan el fórnix y producen un efecto inhibitorio sobre las neuronas piramidales de CA₁. Se ha reportado la presencia de encefalinas en interneuronas y células con forma piramidal y algunos péptidos opiodes que ejercen un efecto excitador sobre neuronas piramidales (Hass, 1983; Walaas, 1983; Pohorecki et al., 1987).

4 Alteraciones patológicas.

4.1 Epilepsia.

La epilepsia se ha definido como una alteración paroxística de la función cerebral, recurrente y autosostenida, caracterizada por la descarga excesiva de las neuronas cerebrales. Sin embargo la etiología, los mecanismos neuroquímicos y fisiológicos, así como la expresión sintomática son variables y aún no bien esclarecidas (Otero-Siliceo y Brailowsky, 1991).

A principios del siglo XIX Bouchet y Cazauvicilh describieron lesiones a nivel del hipocampo, neocorteza y cerebelo en pacientes con epilepsia crónica. Sommer en 1880 fue el primero en reportar la pérdida selectiva de células piramidales de la región CA₁ de hipocampo. Pflieger en ese mismo año y más tarde Spielmeyer a principios de este siglo propusieron que las lesiones observadas en pacientes epilépticos eran la consecuencia de alteraciones vasculares (isquemia) y desórdenes metabólicos provocados por las crisis epilépticas (Siesjö y Wieloch, 1986).

Actualmente se reconoce que aunque el daño cerebral causado por epilepsia presenta algunas similitudes con los daños producidos por isquemia, hipoxia e hipoglucemia, éstos distan de ser idénticos. En efecto, se ha reportado que en animales con una adecuada función cardiovascular y buen aporte de oxígeno, al cabo de dos horas de *status epilepticus* se produce una necrosis neuronal moderada en la corteza cerebral (capas III y IV), el hipocampo (células piramidales de CA₁ y CA₄) y el núcleo ventromedial del tálamo. En roedores, el *status epilepticus* durante 30 minutos o más causa daños en sustancia nigra (pars reticulata) y globo pálido, y en menor grado en las células piramidales de CA₃ y neuronas de la pars compacta de la sustancia nigra (Nadler, 1989).

Los cambios neuropatológicos que con mayor frecuencia se presentan en pacientes epilépticos son la esclerosis hipocámpica

que se caracteriza por la pérdida neuronal y la presencia de gliosis en el hilus del giro dentado y campos CA₁ y CA₃ del asta de Ammón (Siesjö y Wieloch, 1986).

Con respecto a la distribución de la necrosis neuronal, ésta presenta diferencias ya que no todas las poblaciones celulares responden de igual manera. Se ha sugerido que la vulnerabilidad entre una población celular y otra varía de acuerdo con sus conexiones presinápticas y con el tipo de receptores postsinápticos, de tal manera que las neuronas hipocámpicas que resultan ser más vulnerables a las crisis epilépticas son las células piramidales de CA₁ y las neuronas polimórficas de la capa del hilus del giro dentado (Siesjö y Wieloch, 1986; Nadler, 1989).

En términos generales prácticamente cualquier tipo de lesión cerebral puede estar asociada a la producción de crisis epilépticas. Sin embargo las entidades patológicas que con mayor frecuencia se asocian a cuadros clínicos de epilepsia, convulsivos y no convulsivos, son las anormalidades vasculares, los tumores intracraneanos, las malformaciones congénitas corticales, los procesos infecciosos y parasitarios y algunas alteraciones degenerativas (Nadler, 1989).

Un número considerable de trabajos clínicos y experimentales han descrito la disminución de interneuronas del asta de Ammón y el hilus del giro dentado como resultado de las crisis convulsivas. La pérdida de interneuronas sin duda altera la modulación de las células piramidales y la actividad de las células granulares (Lothman et al., 1991). Se ha demostrado una disminución en la función inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas y aquellas que contienen somatostatina en el hipocampo como consecuencia de las alteraciones sinápticas que éstas células inhibitorias establecen con las células piramidales y granulares. En modelos experimentales de epilepsia se han reportado rearrreglos sinápticos en giro dentado y en el lóbulo temporal de pacientes epilépticos. Estudios por inmunocitoquímica han demostrado la presencia de fibras musgosas en la capa molecular del giro dentado, un estrato donde usualmente no se encuentran dichas células (Lothman et al., 1991).

II ANTECEDENTES

ROJO DE RUTENIO

Generalidades. Características Físicas y Químicas

El rojo de rutenio (oxicloruro de rutenio amoniacal) es un colorante inorgánico que presenta la siguiente estructura química: $[(\text{NH}_4)_5 \text{Ru} - \text{O} - \text{Ru} (\text{NH}_4) - \text{O} - \text{Ru} (\text{NH}_3)_5] \text{Cl}_6$ (Fig. 9 a). En 1892 fué descubierto por Joly y un año después el botánico francés Magin lo denominó rojo de rutenio (RRu), utilizándolo en la tinción de pectinas de la pared celular de plantas superiores (Stearling, 1970). Su espectro de absorción muestra un pico a 533 nm (Fig. 9 b). Durante la década de los 60' y 70' se utilizó en microscopía electrónica en la tinción de glucosaminoglicanos de la matriz extracelular y membrana citoplásmica (Gustafson et al., 1967; Luft, 1971).

Efectos del Rojo de Rutenio *in vitro* e *in vivo*.

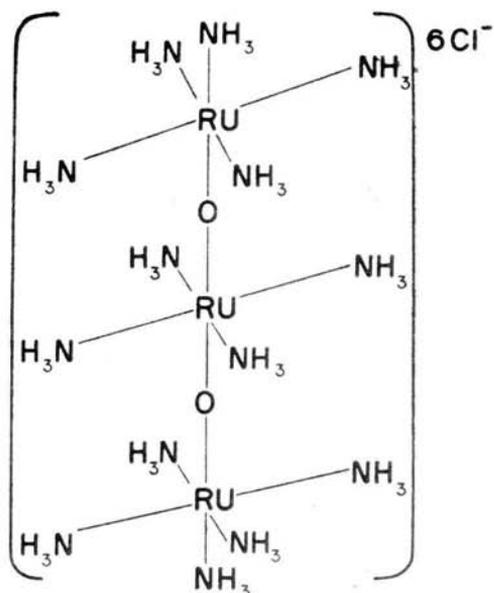
El interés por el RRu se incrementó al encontrarse que no solo tiñe estructuras celulares sino que además es capaz de bloquear la unión y el transporte de calcio en la membrana plasmática y mitocondrial.

Las primeras evidencias sugieren que el RRu se une a mucopolisácaridos de la membrana en el sitio de unión a calcio, existiendo un posible antagonismo entre ambos por el sitio de unión dentro de la membrana (Moore, 1971).

Experimentos efectuados en mitocondrias demostraron que el RRu inhibe la respiración, captura y transporte de calcio (Moore, 1971; Vasington et al., 1972; Reed y Bygrave, 1974; Luthra y Olson, 1977). En el sarcolema aislado de músculo esquelético inhibe la

Figura 9 **A** Estructura química del Rojo de Rutenio (oxicloruro de rutenio amoniacal).
B Espéctro de absorción del Rojo de Rutenio. Tomado de Gutierrez-Gonzalez et al., J. Microscopy 145: 333 - 340, 1987.

A



B

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ROJO DE RUTENIO

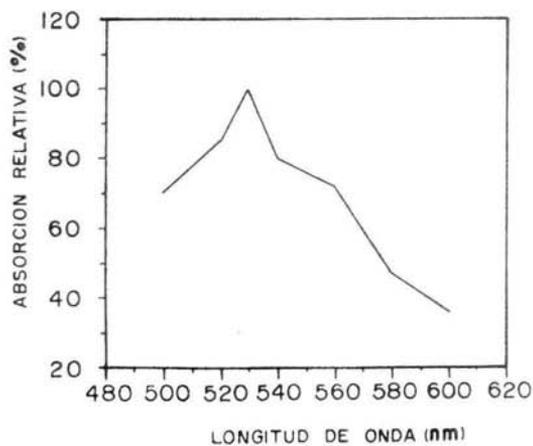


Figura 9 A Estructura química del Rojo de Rutenio (oxicloruro de rutenio amoniacal). B Espéctro de absorción del Rojo de Rutenio. Tomado de Gutierrez-Gonzalez et al., J. Microscopy 145: 333 - 340, 1987.

unión de calcio al sarcolema, proponiéndose que el RRu no actúa de manera competitiva con el calcio por el mismo sitio de unión (Madeira y Antunez-Madeira, 1974), sino que probablemente interfiera en los canales de calcio dependientes de voltaje (Greenberg et al., 1973).

El RRu es capaz de inhibir a la enzima ATPasa del calcio, responsable del transporte activo de calcio en mitocondria (Vasington et al., 1972), en retículo sarcoplásmico (Madeira y Antunez-Madeira, 1974) y en las membranas de glóbulos rojos (Charuk et al., 1990). También se ha demostrado la alta afinidad de éste colorante por proteínas que presentan sitio de unión a calcio como la calsequestrina, calmodulina y la troponina C (Charuk et al., 1990).

Además de la importante función del calcio en la fisiología de la mitocondria y músculo, se empezaron a realizar trabajos donde se estudió el efecto que ejerce el RRu sobre la unión y el transporte de calcio en las terminales nerviosas periféricas y del SNC, tomando en cuenta que la entrada de calcio a la terminal presináptica provoca la liberación de neurotransmisores en el SNC (Rubin, 1982).

Rahamimoff y Alnaes (1973) estudiaron el efecto del RRu en las terminales sinápticas de la unión neuromuscular y observaron una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado. Pearson y Kuhn (1979) corroboraron el efecto inhibitor del RRu sobre la liberación de acetilcolina en la sinapsis neuromuscular.

Kamino et al. (1976) realizaron estudios *in vitro* en sinaptosomas aislados de corteza cerebral de rata, encontrando que el RRu ejerce una acción en la unión de calcio a la membrana sinaptosomal, sugiriendo una posible interacción del colorante con las glicoproteínas de la membrana sinaptosomal.

Baux et al. (1978) y Wieraszko (1986) propusieron que el RRu interacciona directamente en los sitios de unión a calcio presente en los residuos de ácido siálico de gangliósidos localizados en la membrana plasmática de las terminales nerviosas centrales y periféricas, bloqueando la liberación de neurotransmisores.

Experimentos realizados por Tapia (1985) demostraron que el RRu se une a los sinaptosomas con una Kd de $3.7\mu\text{M}$ y Bmax de 10 nm/mg de proteína, e inhibe la entrada de calcio estimulada por despolarización, por lo que se sugirió que el RRu es capaz de bloquear los canales de calcio dependientes de voltaje en las terminales nerviosas.

Asimismo se ha reportado que el RRu inhibe la liberación de neurotransmisores dependiente de calcio en fracciones sinaptosomales de cerebro de ratón (Tapia y Meza- Ruiz, 1977) y al administrar el RRu por vía intracraneal (i.c.) en ratas, también se observó una inhibición en la liberación de GABA dependiente de calcio (Meza-Ruiz y Tapia, 1978).

Por otro lado, se han realizado estudios *in vivo* que han comprobado la capacidad del RRu para bloquear la liberación de neurotransmisores aunque, no obstante, se han observado ciertas diferencias en cuanto a la vía de administración del colorante. Los experimentos realizados *in vivo* en mamíferos (ratón y gato) por Tapia et al. (1976), demostraron que cuando es administrado i.c. se comporta como un agente excitador que provoca convulsiones tónico-clónicas generalizadas, mientras que la administración intraperitoneal (i.p.) produce parálisis flácida. Cuando se administra i.p. en ratas produce un doble efecto, primero parálisis flácida generalizada y segundo, convulsiones tónico-clónicas (García-Ugalde y Tapia, 1991). Estos resultados se pueden explicar : a) por el efecto de la administración i.p. del RRu debido a un bloqueo en la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular, lo que se manifiesta conductualmente como parálisis flácida (Tapia et al.,1985); b) el efecto de la administración i.c. e intraventricularmente (i.v.) se explica por el hecho de que los neurotransmisores inhibidores, como el GABA, son muy importantes para regular la excitabilidad celular de modo que el RRu al inhibir la liberación de GABA produce una desinhibición generalizada y en consecuencia las convulsiones (Tapia et al., 1976).

Los trabajos antes descritos permiten postular que el RRu ejerce un efecto inhibitorio de procesos fisiológicos mediados por calcio, como la actividad mitocondrial, y la liberación de neurotransmisores dependientes de este catión.

Efectos conductuales del Rojo de Rutenio en el Sistema Nervioso Central.

Cuando el RRu se inyecta en áreas específicas del cerebro produce efectos conductuales característicos. La administración del colorante en la sustancia nigra induce conducta de giro, con acción muy prolongado en comparación a otros fármacos que inducen la misma conducta, como la 4-aminopiridina y el mucimol (Tapia y Flores-Hernández, 1990). La inyección de RRu en la región CA₁ del hipocampo provoca epilepsia límbica y produce un efecto conductual asociado que se conoce como sacudidas de perro mojado (SPM) (García-Ugalde y Tapia, 1991). Estudios en microscopía electrónica realizados después de la administración de RRu en CA₁, permitieron observar que el colorante penetra rápidamente a los somas neuronales y provoca degeneración celular (García-Ugalde y Tapia, 1991), lo que podría estar relacionado con el efecto del colorante sobre los microtubulos en preparaciones *in vitro* (Deinum et al., 1981). La entrada de RRu en fibras nerviosas periféricas sólo se observa después de mantener las preparaciones por períodos prolongados de tiempo (Singer et al., 1972).

Tapia y Flores-Hernández (1990) han sugerido al respecto un efecto bifásico del RRu, en donde el colorante inhibe, en un principio la liberación de neurotransmisores y posteriormente penetra a las neuronas, aunque se desconoce el mecanismo por el que se introduce al interior de la célula.

IV OBJETIVOS

Durante la exposición previa se ha revisado el importante papel del calcio en la función cerebral, así como la alteración funcional de dicho catión en presencia de Rojo de Rutenio. Los trabajos realizados por Garcia-Ugalde y Tapia (1991) han demostrado que el colorante penetra rápidamente a las neuronas del hipocampo y las destruye, provocando una degeneración neuronal en el sitio de inyección. Este efecto del RRu podría deberse a un aumento en la concentración de calcio intracelular causado por su acción inhibitoria sobre la recaptura de calcio de reservorios intracelulares y sobre la unión de Ca a ciertas proteínas fijadoras del catión. Este incremento de calcio citoplásmico desencadenaría varias cascadas de actividad enzimática que provocan la degeneración neuronal.

Los trabajos realizados por Bouchelouche (1989) y Frandsen y Schousboe (1991, 1992) demuestran las propiedades neuroprotectoras del dantrolene en la toxicidad celular inducida en cultivo de células *in vitro*, inhibiendo la liberación de calcio de pozas intracelulares, por lo cual, de acuerdo con la hipótesis mencionada, esta droga debería ejercer un efecto protector sobre la acción del RRu.

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron:

- Evaluar el efecto neurotóxico de la administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio por medio del estudio de los signos conductuales propios de la epilepsia límbica en rata.
- Analizar el efecto neuroprotector del dantrolene administrado por vía sistémica e intrahipocámpica sobre los efectos neurotóxicos que ejerce el Rojo de Rutenio.

V MATERIALES Y METODOS

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 190 a 200 gramos de peso. El RRu (Sigma) se disolvió en agua destilada. El dantrolene (Norwich Eaton Pharmaceutical Inc.) se disolvió en solución isotónica o en propilenglicol al 20% y agua destilada, como se describirá.

1 Administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.

La rata fue anestesiada con halotano en una mezcla de bióxido de carbono (95%) con oxígeno (5%), se montó en un aparato estereotáxico Kopf. Con la ayuda de una microjeringa Hamilton de 1 μ l y un microinyector colocado en el propio marco estereotáxico se administró RRu (1.5 nmolas en 0.1 μ l) en el área CA1 del hipocampo derecho (vía intrahipocámpica, i.h.). Las coordenadas para la localización de la estructura, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986), fueron las siguientes: 3.0 mm anteroposterior (AP), 1.5 mm lateral (L) y 3.3 mm ventral (V), con respecto a bregma . El tiempo de duración de la inyección de 0.1 μ l, fue de 2-3 minutos.

2 Administración intraperitoneal e intrahipocámpica de dantrolene.

El dantrolene se administró por vía intraperitoneal (i.p.), 30 y 60 minutos antes de la aplicación i.h. de RRu, a las siguientes dosis y en condiciones de solubilidad: a) 20 mg/kg. de peso corporal, en un volumen de 0.4 ml de NaCl al 0.9%, quedando en suspensión el dantrolene; b) 20 mg/kg en un volumen de 0.4 ml de propilenglicol al 20%, calentado a 42-48° C; c) 30 mg/kg en un volumen de 0.6 ml. de propilenglicol al 20%. Se observó cierta flacidez en las ratas, aproximadamente 15 minutos después de la inyección, como consecuencia de los efectos producidos por esta droga a nivel del sistema muscular (Ward et al., 1986). No se observaron efectos tóxicos y/o conductuales producidos por la administración del dantrolene en propilenglicol caliente

En el caso de la administración i.h. el dantrolene se combinó con RRu a las siguientes dosis: 0.25 nmolas de dantrolene disuelto en agua destilada a una temperatura de 38-42° C, en una solución conteniendo 1.5 o 0.75 nmolas de RRu respectivamente. Estas cantidades se refieren a un volumen de 0.1 µl (Figura A).

También se inyectó sólo dantrolene i.h. a una dosis de 0.25 nmolas o 4 nmolas con el propósito de observar algún posible efecto conductual de esta droga per se. El dantrolene se disolvió con el colorante inerte Azul Directo (Sigma) (1mg/ml) que permite localizar el sitio de inyección. La administración del colorante por sí mismo no provocó ninguna alteración de tipo conductual.

3 Registro conductual

En todos los experimentos la conducta del animal se observó y/o filmó en videocinta magnética para registrar las conductas de SPM presentadas por el animal, una vez que desapareció el efecto de la anestesia, aproximadamente entre 10 y 15 minutos después que la rata realizó la primera sacudida (tiempo 0) hasta dos horas después, tiempo en el que el número de SPM disminuye considerablemente. El registro del número de SPM se realizó en intervalos de 10 minutos con la ayuda de un contador manual.

4 Análisis histológico

Una vez transcurrido el tiempo de observación se sacrificó al animal por decapitación, se extrajo el cerebro rápidamente y se congeló para posterior verificación histológica del sitio de inyección. La histología se realizó en cortes de 40 μm de grosor, realizados en un crióstato, que sirvieron para corroborar la localización de la lesión por el color rojo del RRu ó por el azul directo. Los animales en que la inyección no fue en el área CA1 no se consideraron.

5 Pruebas estadísticas.

Se utilizó la técnica paramétrica t-Student para muestras independientes, con el objeto de comprobar diferencias o no, entre los diferentes tratamientos experimentales empleando un nivel de confianza del 95% (valor de significancia $p < 0.05\%$).

ADMINISTRACION DE DANTROLENE

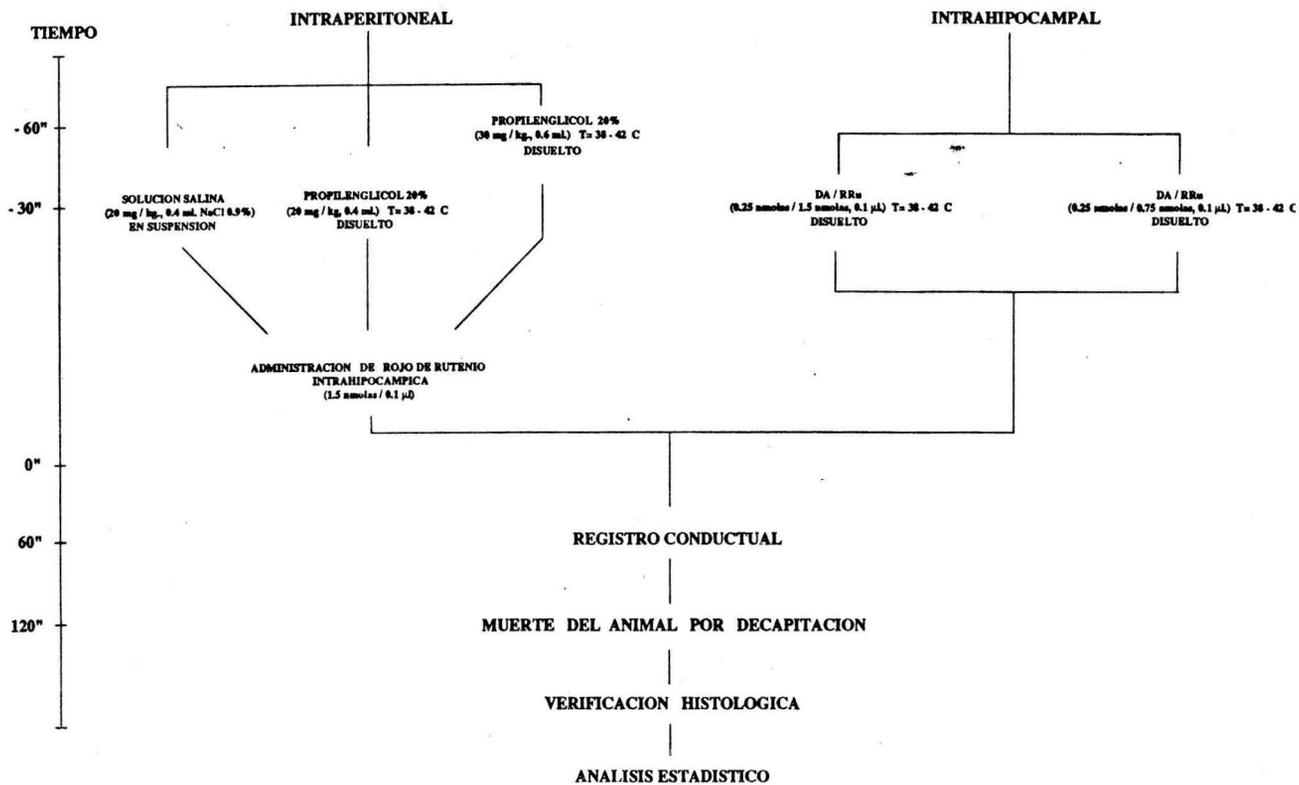


Figura A. Metodología utilizada para cada experimento

VI RESULTADOS

1. Efecto de la inyección intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.

Como se ha descrito previamente (García-Ugalde y Tapia, 1991), la administración i.h. de RRu (1.5 nmolas, 0.1 μ l) en la región CA₁ del hipocampo de las ratas provocó una serie de conductas motoras estereotipadas, que se han identificado como síntomas de epilepsia límbica que se caracterizan por presentar sacudidas mioclónicas de la cabeza y las extremidades superiores de la rata, olfateo, levantamiento sobre las extremidades posteriores, acicalamiento, temblor de vibrisas e hiperexcitabilidad. Además se presentó un comportamiento mucho más evidente y cuantificable, conocido como sacudidas de perro mojado (SPM) (wet dog shakes) que es una manifestación de carácter no convulsivo, asociado a los signos de epilepsia límbica (Lothman y Collins, 1981).

Todas las conductas mencionadas se presentaron entre los 10 y 15 minutos después que el animal salió de la anestesia. El registro del número de SPM se realizó en intervalos de 10 minutos durante 120 minutos (2 horas) ya que después de este tiempo la frecuencia de SPM producida por el RRu disminuye considerablemente, aunque no desaparecen del todo (García-Ugalde y Tapia, 1991). Las SPM aumentaron paulatinamente en frecuencia, alcanzando su máximo valor entre 50 y 70 minutos (10.16/ 10 min \pm 1.00, 12.66/ 10 min \pm 1.08, M \pm ES, n= 18) luego que la rata registró la primera sacudida (Fig. 10 a). El promedio total en la primera hora (48.88 \pm 2.07, M \pm ES) fue ligeramente menor con respecto a la segunda hora de registro (57.94 \pm 2.32) (Fig. 10 b).

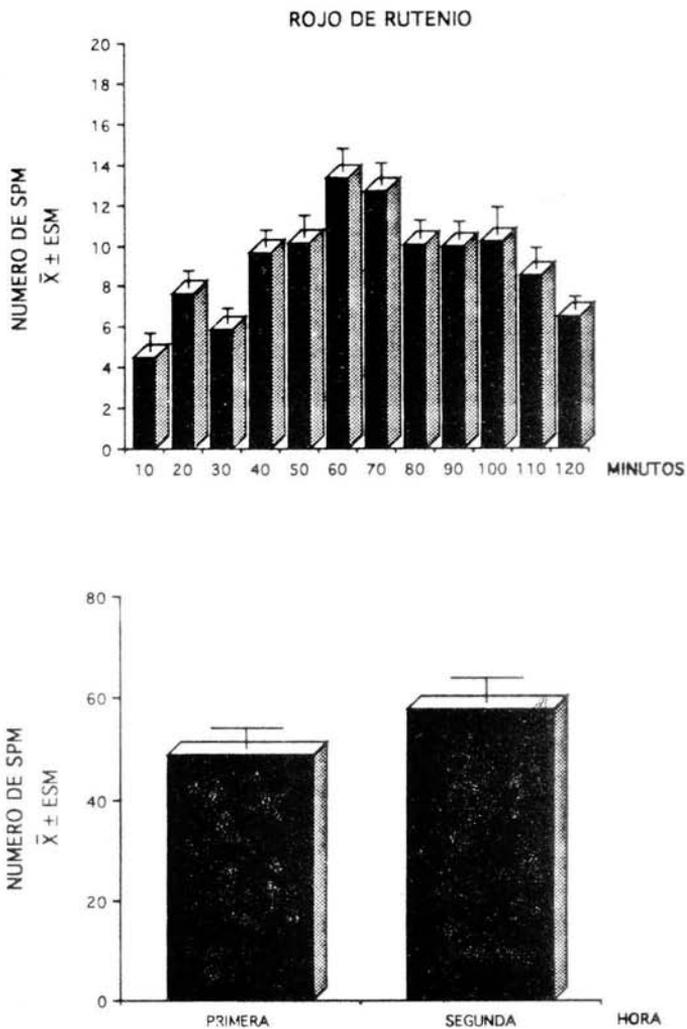


Figura 10 Número total de SPM en rata después de inyectarse Rojo de Rutenio (1.5nmolas, 0.1 μ l.) en la región CA₁ del hipocampo. El registro de las SPM se realizó cada 10 minutos durante 2 horas (A) y cada hora (B). La *n* para este grupo fue de 18.

2. Efecto del Dantrolene en solución isotónica administrado intraperitonealmente sobre la acción de la inyección intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.

En esta serie de experimentos se administró por vía i.p. dantrolene (20 mg/kg) suspendido en 0.4 ml. de solución salina (NaCl al 0.9%), 30 minutos antes de inyectar RRu i.h. (1.5 nmolas, 0.1 μ l).

En la figura 11 y 12 se observa que el DA i.p. en suspensión, a la dosis usada, no modificó significativamente el efecto del RRu. En la primera hora la frecuencia máxima de SPM en el grupo experimental fue de 59.25 ± 9.9 , mientras que el control fue de 61. En la segunda hora el promedio total de SPM fue de 41.37 ± 5.32 y 50.12 ± 3.93 respectivamente ($p < 0.05$, $M \pm ES$, $n=8$) (Fig. 12).

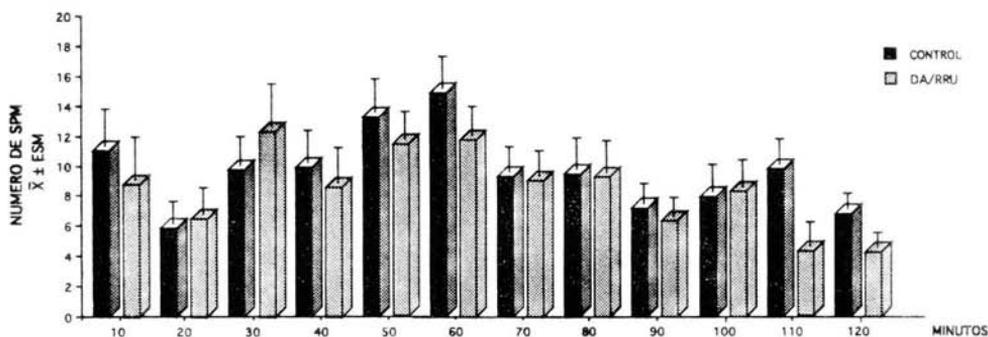


Figura 11 Cantidad total del número de SPM en rata cada 10 minutos. Al grupo experimental se inyectó dantrolene i.p. (20 mg/kg) suspendido en 0.4 ml de solución salina, 30 minutos después se administró RRU (1.5 nmolas, 0.1 μ l.) i.h. . Los animales del grupo control se les aplicó 0.4 ml. de solución salina, 30 minutos antes de administrarse i.h. RRU a la misma dosis. La n para cada grupo fue de 8 y un valor de significancia de $p < 0.05$. Las diferencias entre el control y DA no fueron significativas

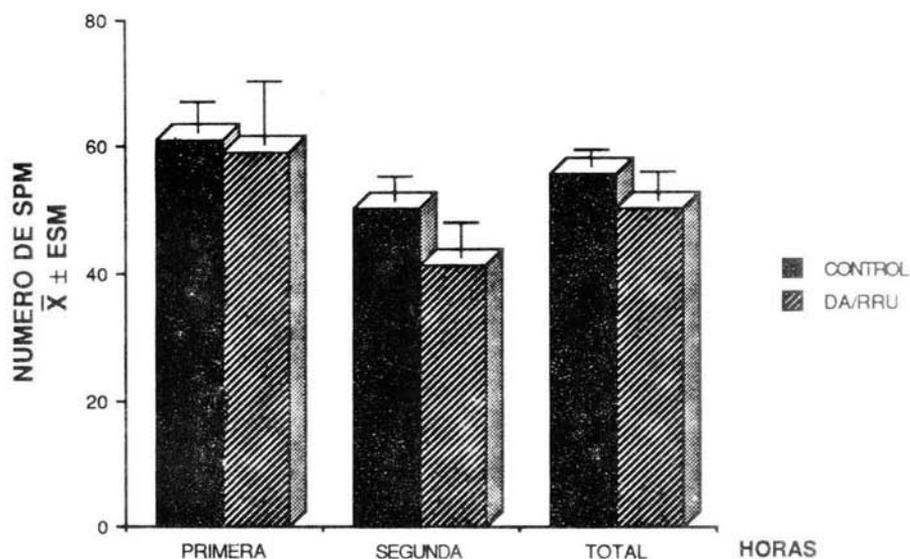


Figura 12 Cuantificación del número total de SPM en rata cada hora. Los animales del grupo experimental se les administró i.p. dantrolene (20 mg/kg) suspendido en 0.4 ml de solución salina y 30 minutos después RRu (1.5 nmolas, 0.1 μ l) i.h., mientras que las ratas del grupo control se les inyectó 0.4 ml de solución salina i.p. y 30 minutos más tarde RRu a la misma dosis. La n para cada grupo fue de 8 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las diferencias entre el control y el grupo experimental (DA/RRu) no fueron significativas.

3. Efecto del Dantrolene disuelto en propilenglicol, administrado intraperitonealmente, sobre la acción de la administración intrahipocámpica de Rojo de Rutenio.

Se administró i.p. dantrolene (20 mg/kg) disuelto en un volumen de 0.4 ml. de propilenglicol al 20% calentado previamente y 30 minutos después se inyectó RRu i.h. (1.5. nmolas, 0.1 μ l). A los sujetos del grupo control se les aplicó por vía i.p. unicamente el vehículo y 30 minutos más tarde RRu i.h. a la misma dosis.

El grupo experimental mostró una clara reducción del 38% en el número de SPM con respecto al grupo control (Fig. 13 y 21). Durante la primera hora el grupo experimental registró una disminución en la frecuencia máxima de SPM de 35.8 ± 3.46 con respecto al control que presentó 69.2 ± 7.63 , mientras que en la segunda hora el número total de sacudidas en el grupo de animales tratados fue 33.8 ± 5.54 con relación al control que tuvo un total de 59.5 ± 3.84 SPM (Fig. 14).

Cuando se aumentó la dosis de DA a 30 mg/kg y una hora después se inyectó el RRu i.h. el efecto protector también fue evidente, apreciandose una reducción del 52%, como puede verse en las figuras 15-16 y 21. Durante la primera hora de observación el número de SPM en el grupo experimental fue de 27.88 ± 7.9 , mientras que para el grupo control fue de 59.35 ± 4.34 . En la segunda hora se observó un pequeño aumento en el promedio de la frecuencia de la conducta del grupo experimental (30.52 ± 5.28) y el control (56.1 ± 5.2) (Fig. 16).

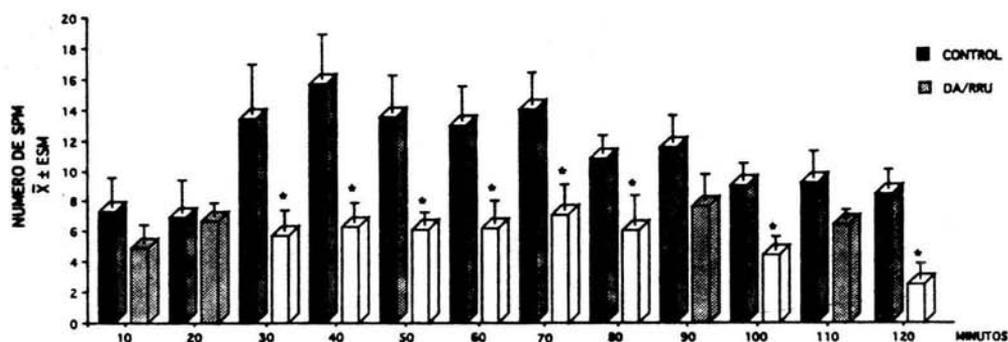


Figura 13 Total de SPM en rata cada 10 minutos durante 2 horas de registro al inyectarse al grupo experimental dantrolene i.p. (20 mg/Kg) disuelto en 0.4 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos después i.h. RRU (1.5 nmolas, 0.1 μ l.). Al grupo control se le administró 0.4 ml. de propilenglicol al 20% y 30 minutos más tarde RRU por vía i.h. a la misma dosis. La n para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las barras en blanco indican diferencia significativa entre el grupo experimental (DA/RRu) y el grupo control.

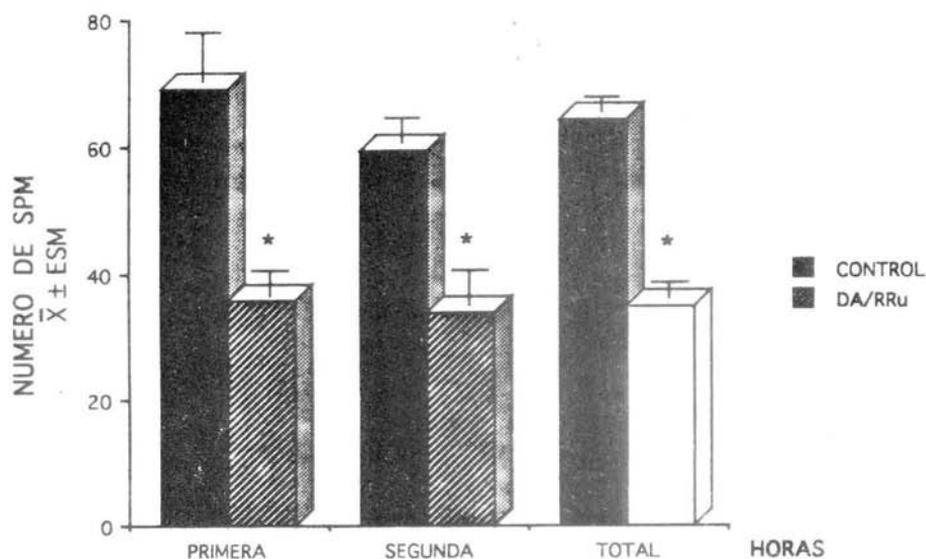


Figura 14 Frecuencia del número total de SPM en rata cada hora. Se administro dantrolene al grupo experimental por vía i.p. (20 mg/kg) disuelto en 0.4 ml. de propilenglicol al 20 % (caliente) y 30 minutos después se inyectó RRu (1.5 nmolas, 0.1 μ l) i.h. Al grupo control se le aplico i.p. 0.4 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos más tarde RRu a la misma dosis. La n en cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las diferencias entre el grupo control y el experimental fueron significativas.

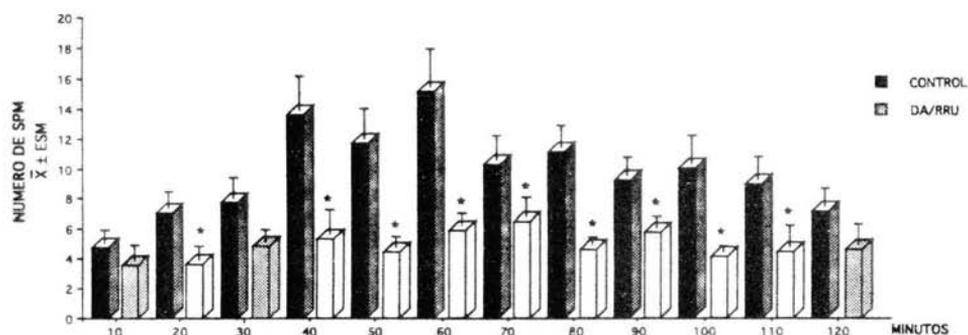


Figura 15 Cuantificación del número de SPM en ratas cada 10 minutos, en un período de 2 horas, inyectándose dantrolene i.p. (30 mg/kg) disuelto en 0.6 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos después se aplicó RRU (1.5 nmolas, 0.1 μ l.) i.h. . Los animales del grupo control únicamente se les administró 0.6 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos más tarde RRU por vía i.h. a la misma dosis .La *n* para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las barras en blanco indican diferencia significativa entre el grupo experimental (DA/RRu) y el control.

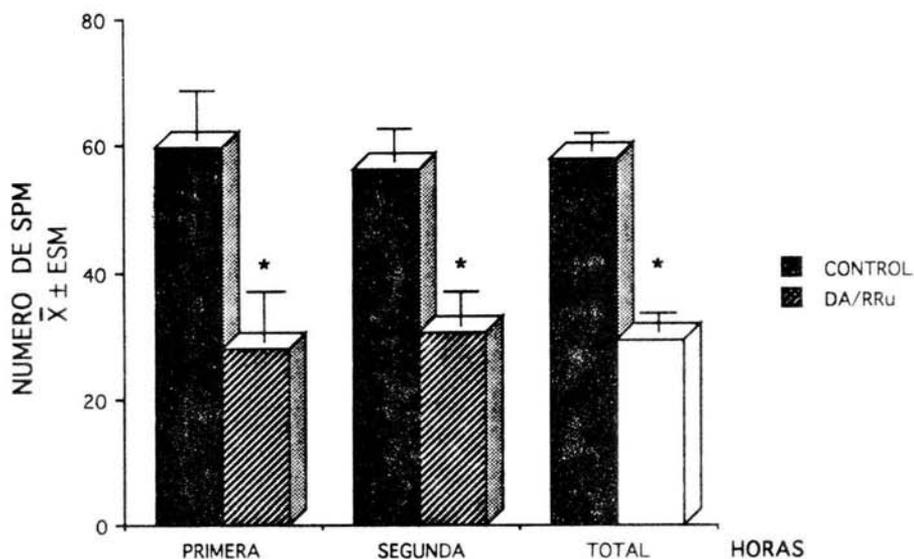


Figura 16 Número total de SPM en rata cada hora. Se administro i.p. dantrolene (30 mg/kg) disuelto en 0.6 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos después se inyectó RRu (1.5 nmolas, 0.1 μ l) i.h.. Al grupo control se le aplicó i.p. 0.6 ml. de propilenglicol al 20% (caliente) y 30 minutos más tarde RRu i.h. a la misma dosis. La n para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05\%$. Las diferencias entre el grupo control y el experimental fueron significativas.

4 Efecto de la co-administración intrahipocámpica de Dantrolene sobre la acción del Rojo de Rutenio.

Con base en los experimentos anteriores donde se observó un efecto protector del DA i.p., se decidió administrarlo junto con el RRU en el hipocampo.

El análisis estadístico reveló una diferencia significativa entre el grupo experimental y el control a los 10, 30, 60 y 90 minutos (2.4 ± 0.6 , 6.6 ± 1.2 ; 4.3 ± 1.2 , 8.4 ± 1.4 ; 7.3 ± 1.6 , 14.7 ± 1.3 y 5.1 ± 1.4 , 11.6 ± 1.8 $M \pm ES$, $p < 0.05$, $n = 10$). No obstante, la disminución en la frecuencia de SPM que presentaron las ratas tratadas fue del 45% (Fig. 17 y 21). El número total de SPM producidos en la primera hora de registro en el grupo experimental fue de 32.5 ± 4.02 y 55.8 ± 4.27 para el control. En los restantes 60 minutos (2 horas) la frecuencia de conducta fue del orden de 40.3 ± 3.16 y 53.1 ± 4.65 respectivamente (Fig. 18).

En la figura 19 se resúmen los resultados donde se administró conjuntamente dantrolene y rojo de rutenio por vía i.h. a una dosis de 0.25 nmolas y 0.75 nmolas respectivamente en 0.1 μ l. La actividad de SPM fue registrada cada 10 minutos durante los 120 minutos de observación. La prueba *t* de Student mostró diferencia significativa en ambos grupos, en casi todos los minutos de registro excepto en los primeros 10 y 30 minutos. De manera que la disminución en la frecuencia de SPM llegó a ser 72% (Fig. 19 y 21) siendo la frecuencia de SPM de 15.42 ± 4.16 para el grupo experimental y 51.14 ± 6.92 para el control, mientras que en la segunda hora fue de 17.82 ± 4.60 y 59.5 ± 4.25 respectivamente (Fig. 20).

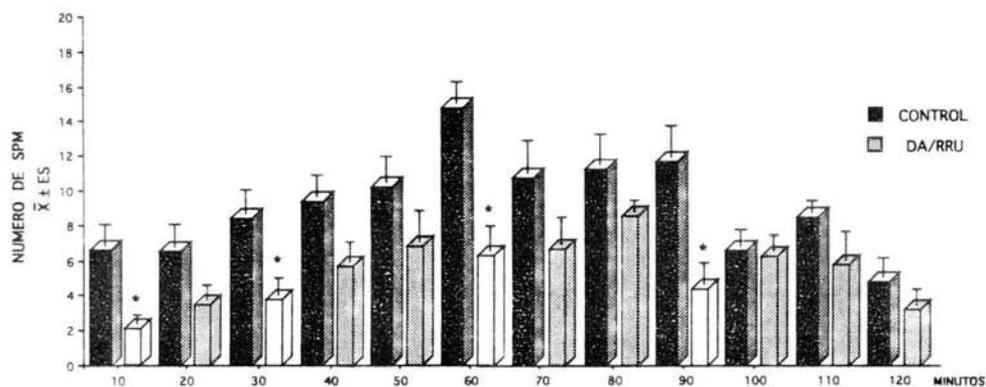


Figura 17 Frecuencia del número total de SPM en rata cada 10 minutos durante un lapso de 2 horas de observación. Al grupo experimental se le administró dantrolene junto con RRu i.h. (0.25 nmolas / 1.5 nmolas, 0.1 μ l.), mientras que al otro grupo sólo RRu i.h. (1.5 nmolas, 0.1 μ l.). La n para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las barras en blanco indican la presencia de diferencia significativa entre el grupo experimental (DA/RRu) y el control.

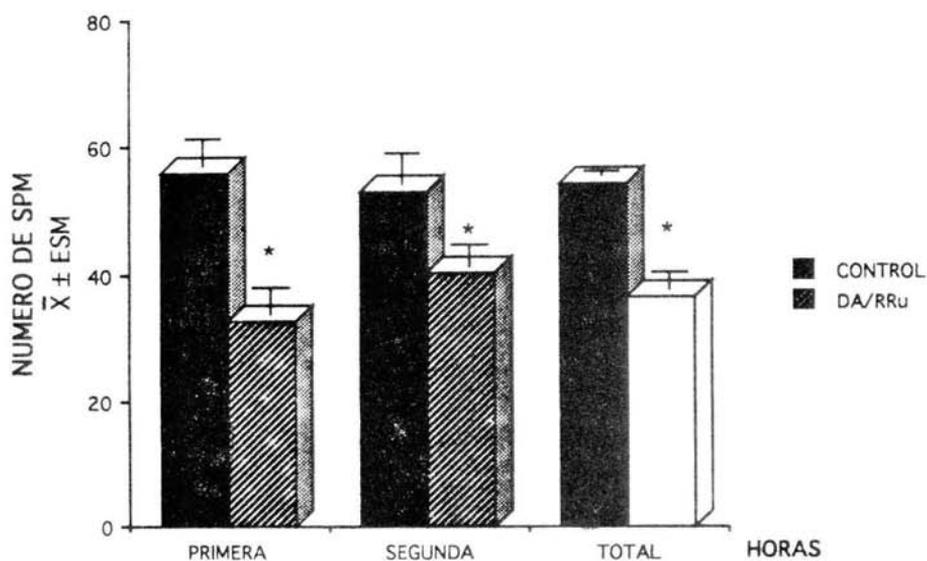


Figura 18 Cantidad total de SPM en ratas cada hora. A los animales del grupo experimental se le administró dantrolene junto con RRu i.h. (0.25 nmolas / 1.5 nmolas, 0.1 μ l). El grupo control solo se le inyectó RRu i.h. (1.5 nmolas, 0.1 μ l). La n para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las diferencias entre el grupo control y experimental fueron significativas.

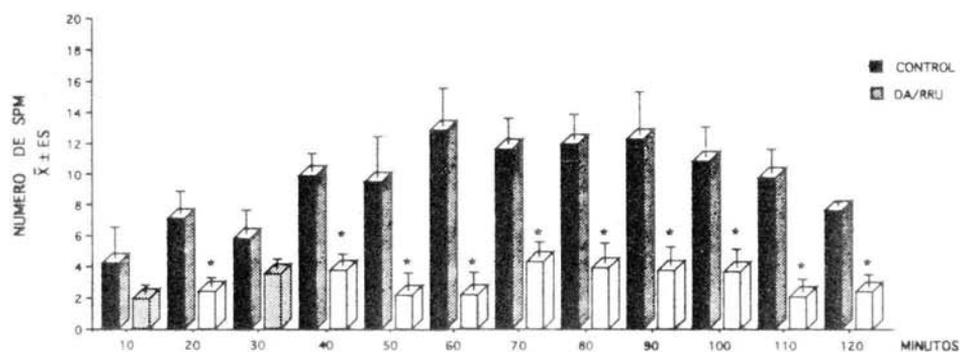


Figura 19 Cuantificación del número de SPM en rata cada 10 minutos durante un período de 120 minutos de observación. En el grupo experimental se inyectó dantrolene junto con RRU i.h. (0.25 nmolas / 0.75 nmolas, 0.1 μ l). Los animales del grupo control se les aplicó sólo RRU i.h. (0.75 nmolas, 0.1 μ l.). La *n* para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las barras en blanco indican diferencia significativa entre el grupo experimental (DA/RRU) y el grupo control.

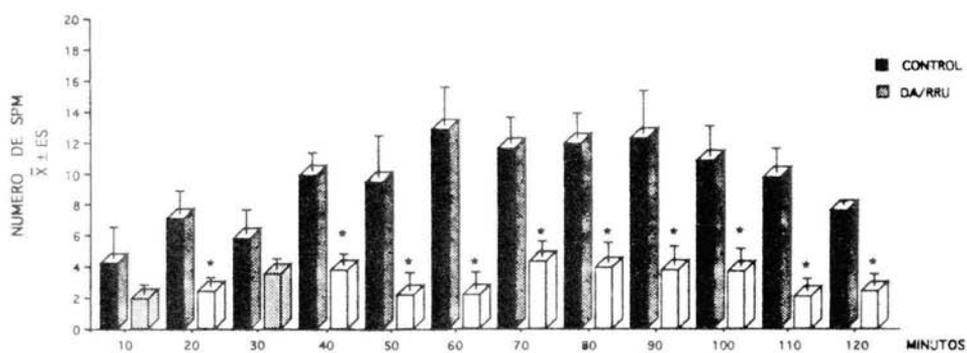


Figura 19 Cuantificación del número de SPM en rata cada 10 minutos durante un período de 120 minutos de observación. En el grupo experimental se inyectó dantrolene junto con RRU i.h. (0.25 nmolas / 0.75 nmolas, 0.1 μ l). Los animales del grupo control se les aplicó sólo RRU i.h. (0.75 nmolas, 0.1 μ l.). La *n* para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las barras en blanco indican diferencia significativa entre el grupo experimental (DA/RRu) y el grupo control.

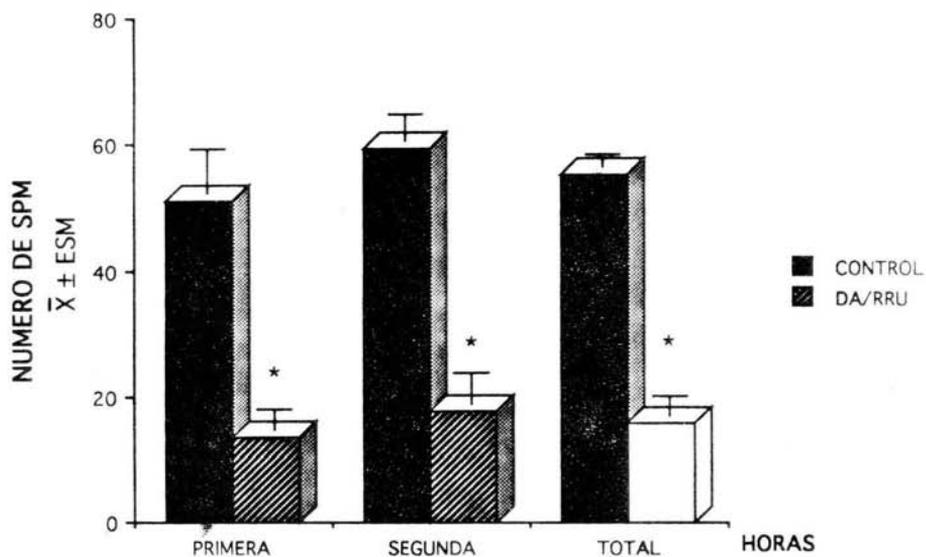


Figura 20 Registro total de SPM en rata, cada hora, durante dos horas de observación. El grupo experimental le fue administrado i.h. dantrolene junto con RRu (0.25 nmolas / 0.75 nmolas, 0.1 μ l) . Al grupo control solo le fue inyectado RRu i.h. (0.75 nmolas, 0.1 μ l) . La *n* para cada grupo fue de 10 y el valor de significancia empleado fue de $p < 0.05$. Las diferencias entre el grupo control y el experimental fueron significativas.

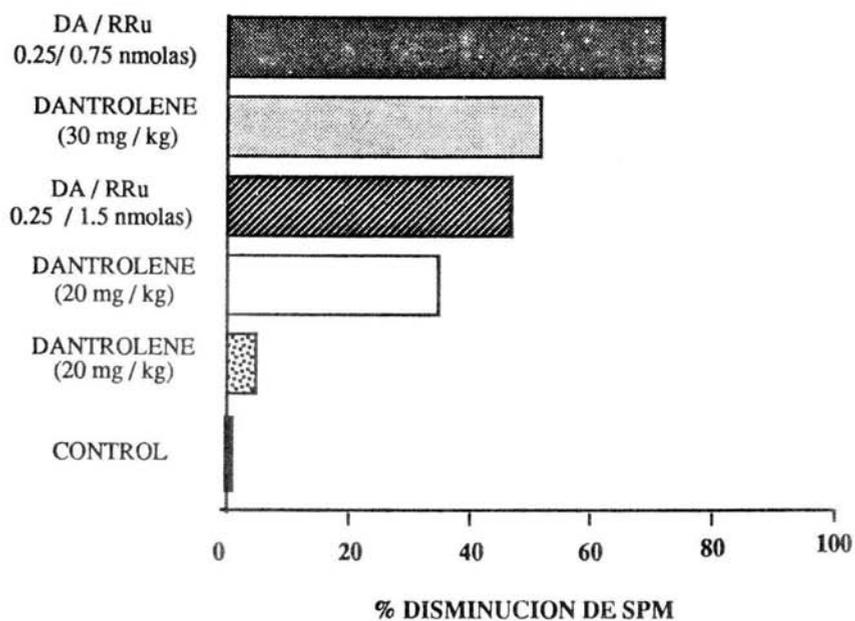


Figura 21 Porcentaje de disminución en la frecuencia de SPM obtenida de cada uno de los tratamientos experimentales, tomando como referencia a su control respectivo.

VII DISCUSION

Epilepsia límbica y sacudidas de perro mojado provocadas por la administración intrahipocámpica de RRu.

Trabajos anteriores realizados en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis han demostrado que cuando se administra rojo de rutenio en el hipocampo de la rata produce epilepsia parcial de tipo límbico (García-Ugalde y Tapia, 1991), similar a la que se observa por la administración de ácido kaínico cuando se aplica en esa misma área. (Lothman y Collins, 1981; Lothman et al., 1990).

En un principio se postuló que tal efecto era el resultado de una desinhibición de las neuronas piramidales del hipocampo, promovida por un decremento de la liberación del GABA (Tapia et al., 1976). Muchos de los neurotransmisores que se liberan de las terminales sinápticas lo hacen a través de un mecanismo dependiente de calcio, por lo que se llegó a pensar que el RRu estuviera inhibiendo el flujo de calcio hacia las terminales sinápticas, sin embargo este compuesto no se ha identificado unido a las terminales, aunque se ha reportado que *in vitro* es capaz de unirse a la membrana de terminales nerviosas aisladas y bloquear canales de calcio dependientes de voltaje presentes en los sinaptosomas (Tapia et al., 1985). Se ha observado que el RRu penetra a los somas neuronales y los destruye provocando una degeneración neuronal en el sitio de inyección, lo cual parece ser la causa principal de las alteraciones de carácter epiléptico (García-Ugalde, 1992).

Además de las convulsiones límbicas, que se caracterizan por presentar sacudidas mioclónicas de la cabeza y las extremidades superiores de la rata, olfateo, acicalamiento y levantamiento del cuerpo sobre las extremidades posteriores, la inyección i.h. produjo un comportamiento asociado a los anteriores mucho más evidente y cuantificable, denominado como SPM.

Efecto citotóxico del Rojo de Rutenio en la citoarquitectura del hipocampo.

Observaciones en microscopía electrónica y óptica en hipocampo inyectado con RRu realizadas por García-Ugalde y Tapia (1991), se observó que el colorante penetra rápidamente a las neuronas del hipocampo, acumulándose preferentemente dentro del nucléolo y en menor grado en el citoplasma de las células nerviosas hipocámpales. En estas neuronas ocurre un proceso de degradación, observándose la cromatina disgregada y una marcada vacuolización en la porción nuclear y citoplásmica de la célula, además de un retraimiento de los somas. Sin embargo no se identificó RRu alrededor de las terminales sinápticas permaneciendo aparentemente inalteradas. El efecto neurotóxico producido por este compuesto provoca la pérdida neuronal.

Estos hallazgos coinciden sólo en parte con los estudios realizados por Singer et al. (1972), quienes reportaron la entrada de RRu en preparaciones de fibras nerviosas periféricas después de mantenerlas por períodos prolongados de tiempo, y los trabajos de Howell (1974) donde se observó la entrada del colorante en células de músculo esquelético.

Las neuronas piramidales son propablemente las primeras células a las que el RRu se une, debido a que fue en la región CA₁ del hipocampo donde se inyectó el colorante (García-Ugalde y Tapia, 1991). El mecanismo por el que el colorante se introduce a las células no se conoce. Como se describirá a continuación se ha postulado que al internalizarse el RRu afecta la homeostasis intracelular de Ca²⁺, de modo que la célula se hiperexcita.

La capacidad del citoplasma para amortiguar el calcio que proviene del medio extracelular y el que se encuentra intracelularmente es relativa, por lo que existen otras estructuras celulares que participan en el proceso de amortiguamiento como son las mitocondrias, el retículo endoplásmico y las proteínas que unen calcio (McBurney y Neering, 1987; Blaustein, 1988; Miller, 1991).

La mitocondria tiene la capacidad de recapturar y almacenar calcio intracelular en grandes cantidades. La entrada y salida de calcio de la matriz mitocondrial ocurre a través del mecanismo de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana mitocondrial. Este proceso es dependiente de la concentración de sodio intracelular, de manera que cuando la concentración de sodio aumenta, la salida de calcio en mitocondria también aumenta (Miller, 1991). Se ha reportado que el RRu bloquea la recaptura de calcio en mitocondria (Moore, 1971; Thayer y Miller, 1990) y el retículo sarcoplásmico (Madeira y Antunez-Madeira, 1974), al inhibir la enzima ATPasa del Ca^{2+} responsable del transporte activo de calcio en mitocondria (Vasington et al., 1972; Reed y Bygrave, 1974; Luthra y Olson, 1977). Por lo que es posible que mediante este mecanismo se incremente la concentración de calcio intracelular.

El retículo endoplásmico y organelos de morfología parecida como los calciosomas, captan calcio a través de ATPasas dependientes de Ca^{2+} o por la unión a proteínas asociadas a estos organelos como la calcequestrina y la calreticulina en retículo sarcoplásmico de músculo. Altas concentraciones (mM) de sustancias como metilxantinas, cafeína, rianodina, teofilina, estimulan la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico de músculo liso, esquelético y cardíaco (Endo et al., 1970; Fabiato y Fabiato, 1979; Palade, 1987) y este proceso puede ser inhibido por varios fármacos como la procaína (Palade, 1987) y el dantrolene (Desmedt y Hainaut, 1977).

Los experimentos realizados *in vitro* por Vites y Pappano (1992) en retículo sarcoplásmico de músculo cardíaco de pollo han reportado que el RRu es capaz de inhibir la liberación de calcio de canales sensibles a IP_3 debido a la interacción específica del colorante sobre sitios de unión a Ca^{2+} en el canal. Sin embargo también han observado que el RRu aumenta notablemente la liberación de calcio de canales sensibles a cafeína en retículo sarcoplásmico. Estos experimentos sugieren la posible participación selectiva del colorante en la liberación de calcio de ciertos

reservorios intracelulares localizados en el interior del retículo endoplásmico.

Los trabajos realizados *in vitro* por Marrion y Adams (1992) en preparaciones de neuronas simpáticas de rana en presencia de cafeína provocan un aumento en la concentración de calcio intracelular liberado de pozas intracelulares. Cuando estas células son tratadas con Rojo de Rutenio y cafeína, el aumento en la concentración de calcio intracelular es considerablemente mayor, sin embargo cuando se quita del medio la cafeína y se deja sólo en presencia de RRu, la concentración de calcio intracelular disminuye lentamente en comparación con células sin RRu y a las que se les extrajo la cafeína del medio, sugiriendo estos autores que el RRu inhibe los mecanismos de captura de calcio de los organelos intracelulares.

Estos experimentos confirman por un lado las observaciones de Vites y Pappano (1992) en cuanto que el RRu aumenta la liberación de calcio de pozas intracelulares, como el retículo endoplásmico, y por otro, que inhiba la recaptura de calcio de organelos como mitocondria (Moore, 1971; Vasington et al., 1972; Reed y Bygrave, 1974; Luthra y Olson, 1977; Thayer y Miller, 1990).

La recaptura de calcio en mitocondria y retículo endoplásmico es relativamente lenta, por lo que la célula necesita de otros sistemas de amortiguamiento que capturen y remuevan más rápidamente el calcio del citoplasma. Entre los posibles sistemas de amortiguamiento que se han propuesto, se encuentran algunas proteínas citoplásmicas que fijan calcio (Miller, 1991). Estudios realizados por electroforesis han demostrado la alta afinidad del RRu por proteínas que presentan sitio de unión a calcio, como la calsequestrina y la calreticulina en el retículo sarcoplásmico y proteínas de membrana en eritrocitos (Charuck et al., 1990). Esta propiedad del RRu para unirse a proteínas que presentan sitio de unión a calcio, también pueden contribuir de forma significativa en la elevación del calcio intracelular.

El aumento en la concentración de calcio intracelular causado por los efectos del RRu para bloquear la recaptura de calcio en mitocondria y retículo endoplásmico y la unión a Ca^{2+} en ciertas proteínas puede provocar la movilización de varias reacciones enzimáticas de carácter destructiva que ocasionan degeneración neuronal. La activación de enzimas catabólicas, la generación de radicales libres, la activación de proteínas como la calmodulina, las calpaínas, fosfolipasas y endonucleasas, así como la ruptura de la membrana y la liberación de ácido araquidónico pueden contribuir al daño y muerte celular (Choi, 1990).

Los efectos neurotóxicos que induce el RRu sobre la citoarquitectura del hipocampo determinaron utilizar al dantrolene por sus efectos neuroprotectores en la actividad convulsiva de SPM.

El dantrolene disminuye la actividad convulsiva de SPM inducida por la administración de Rojo de Rutenio.

El dantrolene, por su naturaleza lipofílica, cruza fácilmente la barrera hematoencefálica y la membrana plasmática de las células (Desmedt y Hainaut, 1975; Vallner et al., 1976; Ward et al., 1986; Jansen et al., 1991). El DA actúa intracelularmente en el músculo esquelético inhibiendo la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y disminuye la contracción muscular, sin alterar las propiedades eléctricas de la membrana muscular (Van Winkle, 1976; Morgan y Bryant, 1977; Desmedt y Hainaut, 1977). El dantrolene reduce la capacidad de los canales de calcio para liberar Ca^{2+} durante la despolarización de la fibra, y no afecta al sistema intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, ni a la enzima ATPasa del Ca^{2+} responsable de la recaptura de calcio en retículo sarcoplásmico (Desmedt y Hainaut, 1975; 1979).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en apoyo de la hipótesis descrita en los párrafos anteriores, muestran una notable acción protectora del dantrolene sobre las alteraciones conductuales que resultan del efecto neurotóxico del RRu.

En la primera serie de experimentos se administró i.p. dantrolene en solución salina y aunque el DA no se disolvió, se inyectó en suspensión. En estas condiciones, la droga no afectó significativamente las SPM, lo cual puede explicarse por el hecho de que el dantrolene se inyectó en suspensión. Sin embargo Desmedt y Hainaut (1977) han reportado que el dantrolene en suspensión es capaz de penetrar la membrana plasmática y entrar a la célula, observándose cierta inhibición en la liberación de calcio de reservorios intracelulares.

En los experimentos siguientes, administramos dantrolene disuelto en propilenglicol al 20% previamente calentado (Mészáros et al., 1981), a la misma concentración que en los experimentos anteriores y observamos una disminución en la frecuencia de SPM del 47% con respecto al grupo control (Fig. 13-14 y 21). Posteriormente decidimos aumentar la dosis de dantrolene de 20 a 30 mg/kg utilizando el mismo vehículo y los resultados mostraron un decremento de la conducta de un 52% de los animales tratados en comparación con el grupo control (Fig. 15-16 y 21).

Estos experimentos revelaron cierto decremento en la frecuencia de la conducta por lo que decidimos administrar conjuntamente RRu y dantrolene en la región CA₁ de hipocampo. Cuando aplicamos DA/RRu (0.25 nmolas/1.5 nmolas, 0.1 µl) se apreció una reducción de sólo el 35%, mientras que cuando se disminuyó la dosis de RRu de 1.5 a 0.75 nmolas se observó un efecto más notable de aproximadamente el 72% (Fig. 19- 20 y 21).

Estos resultados coinciden con la hipótesis planteada, ya que el efecto del DA fue, como era de esperarse mucho mayor cuando se administró por vía intrahipocámpica que al aplicarse por vía intraperitoneal.

El efecto local del DA logró deprimir la excitabilidad celular provocada por el RRu, en el sitio de lesión y en consecuencia bloquear en cierta forma la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA₁, inhibiendo la propagación de la excitabilidad hacia otras estructuras del sistema límbico y posiblemente quizás

también la inactivación de otras vías cerebrales.

La acción protectora del dantrolene obtenida de nuestros resultados coincide de cierta manera con los trabajos realizados por Bouchelouche (1989) y Frandsen y Schousboe (1991; 1992) en cuanto a las propiedades neuroprotectoras del dantrolene contra la toxicidad celular inducida por glutamato en cultivo de células corticales y células granulares de cerebelo *in vitro*, lo cual es de interés, ya que como es sabido la citotoxicidad producida por glutamato estimula la liberación de calcio de reservorios intracelulares debido a la entrada de calcio a través de la activación de receptores a AAE, de CCaSV, canales iónicos no específicos permeables a calcio ó por el sistema $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (Choi, 1988; 1990).

Frandsen y Schousboe (1991) han propuesto que la vía por la cual se incrementa la concentración de calcio intracelular es a través de un mecanismo que permite que el influjo de calcio externo libere calcio de reservorios intracelulares sensibles a dantrolene. Frandsen y Schousboe (1992), encontraron que el influjo de calcio mediado por receptores a NMDA no induce la liberación de calcio de pozas intracelulares sensibles a dantrolene, reduciéndose notablemente los efectos neurotóxicos. Sin embargo el daño celular producido por KA y AMPA es debido posiblemente a un mecanismo dependiente de la entrada de calcio externo que provoca la liberación de calcio de reservorios intracelulares no sensibles a dantrolene ya que con estos compuestos el DA fue menos efectivo.

VIII CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que los efectos conductuales y neurotóxicos del RRu se deben a una alteración de los mecanismos intracelulares que regulan la concentración citoplásmica del Ca^{2+} .

El efecto del dantrolene administrado por vía intrahipocámpica fue mayor, que cuando se aplicó por vía intraperitoneal. La acción local del dantrolene inhibe la excitabilidad celular provocada por el RRu en la región CA₁ de hipocampo donde se realizó la lesión.

VIII REFERENCIAS

- Andersen, P. O. (1987) Properties of hippocampal synapses of importance for integration and memory. En: *Synaptic Function*. Edelman, G.M., Gall, W. E. y Cowan, W. M. eds., John Wiley & Sons Ed., New York, pp. 403 - 429.
- Baux, G., Simonneaaau, M y Tauc, L. (1978) Blocking action of ruthenium red on cholinergic and non-cholinergic synapses: possible involvement of sialic acid - containing substrates in neurotransmission. *Brain Res.* 152: 663-638.
- Bayer, S. A. (1985) Hipocampal Region. En: *The rat nervous system. Vol. 1 Forebrain and Midbrain*. Paxinos, G. ed., Academic Press Ed., Sydney Australia, pp. 335 - 352.
- Blaustein, M. P. (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *TINS.* 11(10): 438-443.
- Bouchelouche, P., Belhage, B., Frandsen, A., Drejer, J. y Schousboe, A. (1989) Glutamate receptor activation in cultured cerebellar granule cells increases cytosolic free calcium by mobilization of callular calcium and activation of calcium influx. *Exp. Brain Res.* 76: 281 - 291.
- Bullock, T.H., Orkand, R. y Grinnell, A. (1977) *Introduction to Nervous Systems*. Kennedy, D. ed. W. H. Freeman and Company Ed. San Fransisco Ca., pp. 29-49 y 177-201.
- Campbell, A.K. (1983) *Intracellular Calcium*. Gutfreund, H. ed., John Wiley and Sons Limited Ed. New York, pp. 13-17.
- Carpenter, M. B. y Sutin, J. (1990) *Neuroanatomía Humana*. Edit. El Ateneo, México D. F., pp. 573 - 585.

- Charuk, J.H.M., Pirraglia, C.A. y Reithmeier, R.A.F. (1990) Interaction of ruthenium red with calcium binding proteins. *Anal. Biochem.* 188: 123 - 131.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate Neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623 - 634.
- Choi, D.W. (1990) Cerebral hipoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 10(8): 2493 - 2501.
- Choi, D.W. y Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 171- 182.
- Choi, D.W. (1991) Excitotoxicity. En: *Excitatory Amino Acid Antagonists*. Meldrum, B. S. ed., Blackwell Scientific Publications Ed., Oxford., pp. 216 - 236.
- Cox, P. L., Heotis, J. P., Polin, D. y Rose, G. M. (1969) Cuantitative determination of dantrolene sodium and its metabolites by differential pulse polarography. *J. Pharmaceutical Sci.* 58(8): 987 - 989.
- Deinum, J., Wallin, M., Kanje, M. y Lagercrantz, C. (1981) The effect of ruthenium red on the assembly and disassembly of microtubules and on rapid axonal transport. *Biochim. Biophys. Acta* 675: 209 - 213.
- Desmedt, J. E. y Hainaut, K. (1975) Dantrolene sodium and "skinned" muscle fibres. *Nature* 254: 364.
- Desmedt, J. E. y Hainaut, K. (1977) Inhibition of the intracellular release of calcium by dantrolene in barnacle giant muscle fibres. *J. Physiol.* 265: 565 - 585.
- Desmedt, J. E. y Hainaut, K. (1979) Dantrolene and A23187 ionophore: specific action on calcium channels revealed by the aequorin method. *Biochem Pharmacol.* 28: 957 - 964.

- Dickey, W. (1991) The neuroleptic malignant syndrome. *Prog. Neurobiol.* 36: 1130 - 1131.
- Eccles, J.C. (1964) The physiology of synapses. Springer-Verlag Ed. Berlín, Alemania, pp. 1-26.
- Eccles, J.C. (1982) The synapse: From electrical to chemical transmission *Ann. Rev. Neurosci.* 5: 325-339.
- Ellis, K. O., Castellion, A. W., Honkomp, L. J., Wessels, F. L., Carpenter, J. F. y Halliday, R. P. (1973) Dantrolene, a direct acting skeletal muscle relaxant. *J. Pharmaceutical Sci.*62(6): 948 - 951.
- Endo, M., Tanaka, M. y Ogawa, Y. (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228: 34 - 36.
- Erulkar, S.D. (1989) Chemical mediated synaptic Transmission: An overview. En: *Basic Neurochemistry*. Siegel, G.J. ed., Raven Press 4a. Ed. New York, pp.151-182.
- Fabiato, A. y Fabiato, F. (1979) Use of chlortetracycline fluorescence to demonstrate calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Nature* 281: 146 - 148.
- Fagg, G. E. y Massieu, L. (1991) Excitatory amino acid receptor subtypes. En: *Excitatory Amino Acid Antagonists*, Meldrum, B. S. ed., Blackwell Scientific Publications Ed., Oxford, pp 39 - 63.
- Frandsen, A. y Schousboe, A. (1991) Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and calcium release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.* 56(3): 1075 - 1078.

- Frandsen, A. y Schousboe, A. (1992) Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pool is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hidroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(7): 2590 - 2594.
- García-Ugalde, G. y Tapia, R. (1991) Convulsions and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat. *Exp. Brain Res.* 86(3): 633 - 640.
- García-Ugalde, G. (1992) Epilepsia límbica producida por la administración de Rojo de Rutenio en el área CA1 del hipocampo. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica, Especialidad Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
- Greenberg, J.P. y Diecke, F.P.J. (1973) Differentiation of calcium pools utilized in the contractile response of canine arterial and venous smooth muscle to norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188: 493 - 504.
- Gronert, G. A., Milde, J. H. y Theye A. R. (1976) Dantrolene in porcine malignant Hyperthermia. *Anesthesiol.* 44(6): 488 - 495.
- Gustafson, T. G. y Pihl, E. (1967) Staining of mast cell acid glycosaminoglycans in ultrathin section by ruthenium red. *Nature* 216: 697 - 698.
- Hass, H. L. (1983) Amine Neurotransmitter actions in the hippocampus. En: *Neurobiology of the hippocampus.* Seifert, W. ed., Academic Press Ed., London, pp. 139 - 155.
- Harrison, G. G. (1975) Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br. J. Anaesthesiol.* 47: 62 -65.
- Howell, J. N. (1974) Intracellular binding of ruthenium red in frog skeletal muscle *J. Cell Biol.* 62: 242 - 247.

- Janjic D., Wollheim, C. B. y Sharp, G. W. G. (1982) Selective inhibition of glucose stimulated insulin release by dantrolene. *Am. J. Physiol.* 243: E59 - E67.
- Jansen, A. C. A., Hilbers, H. W., Ni, X. R., van Helden, S.P. y Janssen, L. H. M. (1991) Some physical-chemical properties of dantrolene and two of its analogues. *Inter. J. Pharmaceutics* 75: 193 -199.
- Kamino, K., Ogawa, M., Uyesaka, N. y Inouye, A. (1976) Calcium-binding of sinaptosomes isolates from rat brain cortex. *J. Memb. Biol.* 26: 345 - 356.
- Kandel, E. R., (1991) Transmitter Release. En: *Principles of Neural Science* Kandel, E.R., Schwartz, J. H. y Jessel, T. H. eds., Elveiser Science Publishing 3a. Ed., New York, pp. 123-134.
- Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A. y Schwartz, J.H. (1991) Synaptic Transmission. En: *Principles of Neural Science* Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessel, T.H. eds., Elveiser Science Publishing 3a Ed., New York, pp. 123- 134.
- Kojima, I., Kojima, K., Kreutter, D. y Rasmussen, H. (1984) The temporal integration of the aldosterona secretory response to angiotensina occurs via two intracellular pathways. *J. Biol. Chem.* 259(23): 14448 - 14457.
- Lambert, J. D. C., Jones, R. S. G., Andreasen, M., Jensen, M. S. y Heineman, U. (1989) The role of excitatory amino acids in synaptic transmission in the hippocampus. *Comp. Biochem. Physiol.* 93 A (1): 195 - 201.
- López-Antunez. L. (1980) *Anatomía funcional del Sistema Nervioso*. Edit. Limusa México D.F., pp. 573 - 581.

- López-Colome, A. M. (1983) Ácidos glutámico y aspártico. En: Aminoácidos y peptidos en la integración de funciones nerviosas. Pasantes-Morales y Aréchiga H. eds., UNAM Ed., México D. F., pp. 93 - 105.
- Lothman, E. W. y Collins, R. C. (1981) Kainic acid induced limbic seizures: Metabolic, behavioral, electroencephalographic & neuropathological correlates. *Brain Res.* 218: 299 - 318.
- Lothman, E. W., Bertram, E. H., Stringer, J. L. (1991) Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37: 1- 82.
- Lowndes, H.E. (1975) Dantrolene effects on neuromuscular function in cat soleus. *Eur. J. Pharmacol.* 32: 267 - 272.
- Luft, J.H. (1971) Ruthenium red and violet. II Fine structural localization in animals tissues. *Anat. Rec.* 171: 369 - 416.
- Luthra, R. y Olson, M.S. (1977) The inhibition of calcium uptake and release by rat liver mitochondria by ruthenium red. *FEBS Lett.* 81(1): 142 - 146.
- Madeira, V. M. C. y Antunes-Madeira, M. C. (1974) Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma. *J. Memb. Biol.* 17: 41 - 50.
- Mahmoudian, M., Dehpour, A. R. y Mofakhan, S. (1981) Effect of dantrolene sodium on the contractility of guinea pig atrial myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 181- 188.
- Makowski, L., Casper, D. L., Phillips, W. C. y Goodenough, D. A. (1977) Gap junction structure II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74: 629-645.
- Marrion, N.V. y Adams, P.R. (1992) Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine bull-frog sympathetic neurones. *J. Physiol.* 445: 515-535.

- McBurney, R.N. y Neering, I.R. (1987) Neuronal calcium homeostasis. *TINS*. 10 (4): 164- 169.
- McCall, R. B. y Aghajanian, G. K. (1980) Pharmacological characterization of serotonin receptors in facial motor nucleus: microionophoretic study *Eur. J. Pharmacol.* 65: 175 - 183.
- McGraw, C.F., Nachshen, D.A. y Blaustein, M.P. (1982) Calcium movement and regulation in presynaptic nerve terminals. En: *Calcium and Cell Function*. Vol II, Cheung, W.Y. ed., Academic Press Ed. New York, pp. 81- 110.
- McGeer, P.L., Eccles, J.C. y McGeer, E.G. (1987) *Molecular Neurobiology of the mammalian brain*. Plenum Press 2a. Ed., New York, pp. 127- 146.
- Meldolesi, J., Volpe, P. y Pozzan, T. (1988) The intracellular distribution of calcium. *TINS*. 10(4): 164 - 169.
- Meyler, W.J., Wesseling, H. and Agoston, S. (1976) The effects of dantrolene sodium on cardiac and skeletal muscle in rats. *Eur. J. Pharmacol* 39: 127 - 131.
- Mészáros, J., Kecskemeti, V. y Szegi, J. (1981) Effect of dantrolene sodium on the transmembrane potentials and contractility of guinea pig atrial myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 74: 181 - 188.
- Meza-Ruiz, G., Tapia, R. (1978) H-GABA release in sinaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 154: 163-166.
- Miller, R. J. (1991) The control of neuronal calcium homeostasis. *Prog. in Neurobiol.* 37: 255 - 285.

- Monaghan, D. T., Bridges, R. J. y Cotman C. W. (1989) The excitatory amino acid receptor: Pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 29: 365 - 402.
- Moore, C. L. (1971) Specific inhibition of mitochondrial calcium transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 42: 298 - 305.
- Morgan, K. G. y Bryant, S. M. (1977) The mechanism of action of dantrolene sodium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201: 138 - 147.
- Nadler, V. J. (1989) Seizures and neuronal cell death in the hippocampus. En: *The Hippocampus New Vistas*. Chan-Palay, V. y Köhler, C. eds., Alan R. Liss Inc. Ed., New York, pp. 463 - 481.
- Okumura, F., Crocker, B. D. y Denborough, M.A. (1980) Site of the muscle cell abnormality in swine susceptible to malignant hyperpyrexia. *Br. J. Anaesthesiol.* 52: 377 - 383.
- Otero-Siliceo, E. y Brailowsky, S. (1991). *Epilepsia Experimental. Serie en Neurología No. 2*. Academia Mexicana de Neurobiología A.C. y Sociedad de Ciencias Fisiológicas A.C. Ed., México D. F. pp. 263.
- Palade, P. (1987) Drugs - induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262(13): 6135 -6141.
- Palay, S.L. y Chan-Palay, V. (1977) General morphology of neurons and neuroglia. En: *Handbook of Physiology Vol. 1* Geiger, S.R. ed. American Physiological Society Ed., Bethesda, Ma., pp. 5-33.
- Pasantes-Morales, H., Sanchez. J. y Tapia R. (1991) *Neurobiología Celular* Ed. Fondo de Cultura Económica. México D.F., pp.127-146 y 260 - 263.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney.

- Pearson, R. J. y Kuhn, J. A. (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. *Brain Res. Bull.* 4: 669 - 674.
- Peters, A., Palay, S. L. y Webster H. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System.* Oxford University Press 3a. Ed., Oxford, pp. 159 - 160.
- Pohorecki, R. y Domino, E. F. (1987) Synaptic pharmacology of the hippocampus. *Rev. Clin. Basic Pharmacol.* 6: 189 - 211.
- Rahamimoff, R. y Alnaes E. (1973) Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3613 - 3616.
- Reed, K. C. y Bygrave, F. L. (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem J.* 140: 1464 - 1470.
- Rubin, R. (1982) *Calcium and secretion cellular.* Plenum Press Ed., New York, pp. 1- 43 y 45 - 177.
- Sengupta, Ch., Meyer, V.A. y Carafoli, E. (1980) Binding of dantrolene sodium to muscle intracellular membranes. *FEBS Lett.* 117(1):37- 38.
- Shephard, G.M. (1988) *Neurobiology.* Oxford University Press 2a. Ed. Oxford, pp. 65-86.
- Shwartz, J.H. (1991) *The Synaptic Vesicle.* En: *Principles of Neuronal Science.* Kandel, E.R., Shwartz, J. H. y Jessel, T. H. eds., Elveiser Science Publishing 3a Ed., New York, pp.225-234.

- Siesjö, B.K. y Wieloch, T. (1986) Epileptic Brain Damage: Pathophysiology and Neurochemical Pathology. En: Basic Mechanisms of the Epilepsies. Advances in Neurology Vol. 44. Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Woodbury, D. M. y Porter, R.J. Eds., Raven Press Ed., New York, pp. 813 - 847.
- Singer, M., Krishnan, N y Fyfe, D.A., (1972) Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers. Anat. Rec. 173: 375 - 390.
- Smith, S.J. y Augustine, G.J. (1988) Calcium ions active zones and synaptic transmitter release. TINS. 11(10): 458 - 464.
- Stearling, C. (1970) Crystal-structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain. Amer. J. Bot. 52(2): 172-175.
- Tapia, R., Meza-Ruiz, G., Duran, L. y Drucker-Colín, R. (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. Brain Res. 116:101-109.
- Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium dependent release of H-GABA in sinaptosomal fractions. Brain Res. 126: 160- 166.
- Tapia, R. (1985) Effects of drugs on neurotransmitter release: Experiments *in vivo* and *in vitro* . Neurosci. Biobehav. Rev. 9: 391 - 397.
- Tapia, R., Arias, C. y Morales, E. (1985 b) Binding of lanthanum ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitters release. J. Neurochem. 45: 1464 -1470.
- Tapia, R. y Flores-Hernandez, J. (1990) Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. Neurosci. 39: 657 - 663.

- Thayer, S. A. y Miller, R. J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones *in vitro* J. Physiol. 425: 85 - 115.
- Vallner, J. J., Sternson, L. A. y Parsons D. L. (1976) Interaction of dantrolene sodium with human serum albumina. J. Pharmaceutical Sci. 65(6): 873 - 877.
- Van Winkle, W. B. (1976) Calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: site of action of dantrolene sodium. Science 193: 1130 - 1131.
- Vasington, F. D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. y Carafoli, E. (1972) The effect of ruthenium red on calcium transport and respiration in rat liver. Biochem. Biophys. Acta 250: 43-54.
- Vites, A. N. y Pappano, A. (1992) Ruthenium red selectively prevents Ins (1,4,5) P₃ but not caffeine-gated calcium release in avian atrium. Am. J. Physiol. 262: H268 - H277.
- Walaas, I. (1983) The hippocampus. En Chemical Neuroanatomy. Emson, P.C. ed., Raven Press Ed., New York, pp. 337 - 358.
- Ward, A., Chaffman, M. O. y Sorkin, E. M. (1986) Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and update od its use in spasticity. Drugs 32: 130 - 168.
- Watkins, J. C. (1989) The NMDA receptor concept: origins and development. En: The NMDA receptor. Watkins, J. C. y Collingridge G.L. eds., Oxford University Press Ed., Oxford, pp. 1 -17;
- Wieraszko, A. (1986) Evidencia that ruthenium red disturbs the synaptic transmissions in the rat hippocampal slices through interacting with sialic acid residues. Brain Res. 378: 120 - 126.

Wuis, E. W., Grutters, A. C. L. M., Vree, T. B. y Van der Kleyn, E. (1982) Simultaneous determination of dantrolene and its metabolites 5-hidroxidantrolene and nitro-reduced acetylated dantrolene (F 490), in plasma and urine of man and dog by high performance liquid cromatography. J. Chrom. 231: 401 - 409.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	aminoácidos excitadores.
ACPD	ácido trans -1,3-dicarboxílico-1-aminociclopentano.
AK	ácido kaínico.
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole.
ATP	adenosin trifosfato.
CAT	colinacetiltransferasa.
CCaSV	canales de calcio sensibles a voltaje.
CCK	colecistokinina.
CPP	ácido fosfónico-3-(2-carboxipiperacina-4-il-propil-1).
DA	Dantrolene.
DAG	diacil-glicerol.
GABA	ácido gama-aminobutírico.
GAD	glutamato descarboxilasa
IP ₃	inositol trifosfato.
i.c.	intracraneal.
i.h.	intrahipocampal.
i.p.	intraperitoneal.
i.v.	intraventricular.
L-AP4	ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico.
MK-801	5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo (a, d) ciclo ± hepteno-5,10.
NE	norepinefrina.
NMDA	N-metil - D-aspártato.
PKC	proteína cinasa C.
RRu	Rojo de Rutenio.
SNC	sistema nervioso central.

SPM	sacudidas de perro mojado.
VIP	péptido vasoactivo intestinal.
VP	vía perforante.
5-HT ₂	receptor serotoninérgico tipo 2.