



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE LOS NIVELES
DE ASPARTATO, GLUTAMATO, GLUTAMINA Y GABA EN
HIPOCAMPO, BULBO OLFATORIO Y PLASMA, EN UN MODELO DE
STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR PILOCARPINA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**



PRESENTA

GLORIA CASTILLO SOTO

Ciudad Universitaria, CDMX. 2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Fernando Montiel Aguirre**

VOCAL: **Profesor: Martin Daniel Trejo Valdez**

SECRETARIO: **Profesora: Rosalinda Guevara Guzmán**

1er. SUPLENTE: **Profesora: Laura Carmona Salazar**

2° SUPLENTE: **Profesor: Efrén Pérez Vázquez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA;
LABORATORIO SENSORIAL 1 Y 2, FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Virginia Selene Arriaga Ávila

SUSTENTANTE:

Gloria Castillo Soto

ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	1
2. Introducción.....	4
2.1 Epilepsia.....	4
2.2 Epilepsia del Lóbulo Temporal.....	5
2.3 Modelos animales.....	8
2.4 Homeostasis de neurotransmisores en SN.....	9
2.5 Papel de aspartato, glutamato y ácido gaba-aminobutírico (GABA) en la epilepsia.....	13
2.6 Farmacorresistencia.....	15
2.7 Terapias dietéticas.....	16
3. Justificación.....	21
4. Objetivo.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Materiales y métodos.....	24
6.1 Animales.....	24
6.2 Diseño experimental.....	24
6.3 Escala de Racine.....	26
6.4 Obtención de las muestras.....	27
6.5 Cuantificación de proteínas totales.....	28
6.6 Generalidades sobre el uso del equipo Agilent 1100.....	29
6.7 Condiciones cromatográficas.....	29
6.8 Control interno y estándar interno.....	31
6.9 Curva de calibración.....	33
6.10 Estandarización de la técnica de cuantificación de amino ácidos.....	34
6.11 Tratamiento de las muestras.....	35
6.12 Obtención de los cromatogramas.....	36
6.13 Cálculo de los niveles de amino ácidos.....	37
6.14 Validación del método analítico.....	41
6.15 Análisis estadístico.....	43
7. Resultados.....	44
7.1 Gráfica del peso de los animales.....	44
7.2 Escala de Racine.....	45
7.3 Curva estándar para la cuantificación de proteínas.....	47
7.4 Hipocampo.....	48
7.5 Bulbo olfatorio.....	50
7.6 Plasma.....	52
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones.....	63

10.	Perspectivas.....	65
11.	Bibliografía.....	66
12.	Apéndice.....	76

1. Abreviaturas

AA amino ácidos

Acetil CoA Acetil-Coenzima A

AL *Ad libitum*

AL-P *Ad libitum*- pilocarpina

AMPA ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ATP trifosfato de adenosina

AST aspartato aminotransferasa

BCA ácido bicinconínico

BHE barrera hematoencefálica

BO bulbo olfatorio

Ca⁺ ion calcio

CA *Cornu Ammonis*

CAT ciclo de los ácidos tricarboxílicos

CC cuerpos cétonicos

CO₂ dióxido de carbono

DC dieta cetogénica

DG diacil glicerol

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

ELT Epilepsia del lóbulo temporal

GABA ácido gama aminobutírico

GABA-T transaminasa de GABA

GAD descarboxilasa de ácido glutámico

Glu glutamato

Gln glutamina

GS glutamina sintasa

g gramo

h horas

HDACs desacetilasas de histonas

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IP3 inositol trifosfato

K⁺ ion potasio

LCR líquido cefalorraquídeo

M/T células mitrales/tufted

M1 receptores muscarínicos

M2 receptores muscarínicos

mg miligramo

μM microMol/Litro

Na⁺ ion sodio

NAD(P) glutamato deshidrogenasa

nmol nanomol

NMDA N-metil-D-aspartato

OMS Organización Mundial de la Salud

OPA o-ftalaldehído

PAG glutaminasa activada por fosfato

post-SE posterior al SE

RA restricción alimentaria

RA-P Restricción alimentaria-pilocarpina

RC restricción calórica

rpm revoluciones por minuto

SE *status epilepticus*

SNC Sistema Nervioso Central

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epilepsia

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia es una enfermedad que afecta a cerca de 50 millones de personas en el mundo, aproximadamente entre 1-2% de la población mundial, tiene una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo (World Health Organization, 2005).

La epilepsia se caracteriza por crisis epilépticas recurrentes (International League Against Epilepsy, 1993) con consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales (Fisher et al., 2014). La principal evidencia de esta enfermedad es la aparición de crisis, las cuales se definen como un evento transitorio con signos y/o síntomas producidos por una actividad neuronal excesiva y sincrónica en el cerebro (Fisher et al., 2005).

Es importante diferenciar una crisis epiléptica de un *status epilepticus* (SE). Se denomina SE, a la condición en la cual ocurre un solo ataque epiléptico con una duración menor a 5 minutos o una serie de crisis epilépticas continuas en un periodo de 30 minutos, sin recuperación total de la función cerebral entre una crisis y otra (International League Against Epilepsy, 1993). El SE es ocasionado por la falla en los mecanismos responsables de la terminación de las crisis o en el inicio de mecanismos que conducen a crisis prolongadas anormales. Además, el SE puede tener consecuencias a largo plazo como: alteración de redes neuronales, lesiones y muerte neuronal (Trinka et al., 2015).

Por otra parte, en la epilepsia ocurren cambios en los circuitos sinápticos que provocan redes neuronales hiperexcitables capaces de generar crisis espontáneas y recurrentes; al proceso de desarrollo y extensión de este daño se le conoce como epileptogénesis (Pitkänen, 2010).

En este sentido, la fisiopatología de la epilepsia relaciona la generación de la actividad neuronal sincronizada con un desequilibrio entre los sistemas de neurotransmisión excitatorios mediados por glutamato y los sistemas de

neurotransmisión inhibitorios mediados por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), favoreciendo la excitabilidad (Dalby y Mody, 2001).

Debido a que existen numerosos factores causales que pueden incidir en la generación de crisis epilépticas, recientemente se ha propuesto la siguiente clasificación de la epilepsia según su etiología (Berg et al., 2010) (International League Against Epilepsy, 2010):

1. Genética: es el resultado de un defecto genético o presuntamente genético, en el cual las crisis son el principal síntoma de esta enfermedad.
2. Estructural/metabólica: existe una condición estructural o metabólica distinta o una afección que ha demostrado estar asociada a un riesgo significativamente mayor a desarrollar epilepsia.
3. Desconocido: el origen de la causa es desconocido, puede tener una base genética no reconocida previamente o puede ser consecuencia de un trastorno estructural o metabólico que aún no ha sido identificado.

2.2 Epilepsia del Lóbulo Temporal

Existen varios tipos de epilepsia; sin embargo, este trabajo está enfocado en la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT), que es la epilepsia más frecuente; puede ser progresiva y con frecuencia refractaria al tratamiento farmacológico (French, 2007).

En la ELT, el foco epiléptico (área cerebral responsable de la fuente de descargas) se localiza en el lóbulo temporal (López-Meraz et al., 2009) y se caracteriza por la actividad excitatoria excesiva de neuronas en las estructuras límbicas (Boeree, 2002) o disminución en la función inhibitoria, en algunos casos ocurren ambos eventos, es decir, exceso de actividad excitatoria y disminución de la función inhibitoria (Meldrum, 1991).

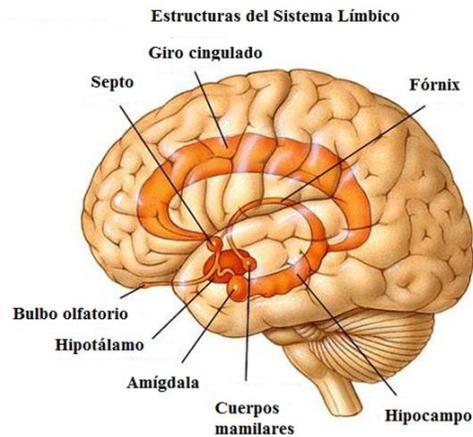


Figura 1. Representación esquemática del cerebro donde se observan estructuras del sistema límbico.

En la ELT, las principales regiones del cerebro que sufren alteraciones son: la neocorteza, la corteza entorrinal, la amígdala y el hipocampo (Cabo-de la Vega et al., 2006).

El hipocampo (ver figura 1) es una estructura en forma de C que se ubica al interior del lóbulo temporal y se encuentra involucrado con las funciones de memoria y aprendizaje; estos procesos se llevan a cabo mediante transmisión glutamatérgica (Kiernan, 2012).

En los pacientes con ELT se observa la presencia de esclerosis hipocampal (ver figura 2); que se caracteriza por la pérdida neuronal en el *Cornu Ammonis* (CA), principalmente en el sector CA1 y un daño menor en CA2, CA3 y giro dentado, (Ingmar et al., 2013) junto con abundante proliferación de células gliales (gliosis) en el hipocampo y giro dentado (Falconer, 1974).

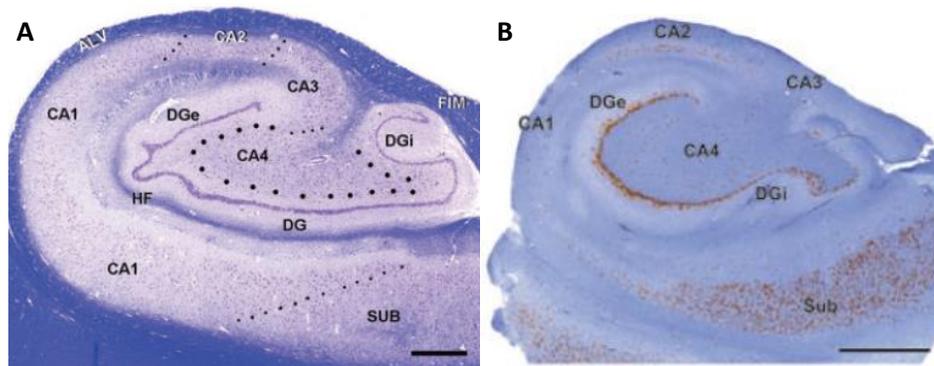


Figura 2. Hipocampo. (A) Anatomía de un hipocampo humano. Terminología: SUB, subículo; CA-1 - CA-4, sectores de *Cornu Ammonis*; DG, Giro Dentado; HF, Formación Hipocampal; ALV, alveus; FIM, fimbria. (B) Esclerosis Hipocampal en un paciente con ELT, se observa la pérdida de células piramidales en los sectores CA-1 y CA-4. Un daño en los sectores CA-2 y CA-3, pérdida variable de células en GD y la preservación de células en SUB.

Estudios en modelos experimentales demuestran que el daño neuronal y la gliosis son resultado de la actividad epiléptica; y que estas alteraciones contribuyen al establecimiento de ataques recurrentes (Oroquieta et al., 2002).

Por otra parte, la participación de las estructuras del lóbulo temporal en la función olfatoria se detectó al observar que pacientes con ELT presentaban disfunción olfatoria. Varios estudios han evidenciado que el lóbulo temporal tiene una función importante en la percepción de los olores. Particularmente, la corteza piriforme, la corteza entorrinal y la amígdala están involucradas en la percepción de la olfacción y juegan un papel importante en la percepción, detección, discriminación y consolidación de la memoria olfativa. Estructuras del lóbulo temporal, específicamente el hipocampo y la amígdala, juegan un papel importante en la generación de las crisis convulsivas en la ELT. Se podría asumir por lo tanto, que en la epilepsia los cambios estructurales y funcionales pueden intervenir en el proceso olfatorio (Melo et al., 2005; Hummel et al., 2013).

En los trastornos neurológicos es común el deterioro olfativo así como la disfunción de los sustratos neuronales temporo-límbicos involucrados en la percepción olfativa (Kohler et al., 2001). De hecho, la ELT ha sido asociada con

un deterioro en la función olfativa (Rausch et al., 1975) (Carrol et al., 1993). Sin embargo, hasta el momento son realmente pocos los estudios que han descrito a profundidad las alteraciones fisiológicas del bulbo olfatorio en la ELT.

En un estudio reciente realizado en la Universidad de Pensilvania, se utilizó una prueba de identificación de olores en pacientes con ELT y sujetos controles. Sus resultados sugieren una disminución en la capacidad de identificar y discriminar olores en los pacientes con ELT en comparación con los sujetos controles (Desai et al., 2015).

En el año 2013, Hummel y cols. publicaron un estudio en donde observaron que el volumen del bulbo olfatorio en pacientes con ELT estaba disminuido, asociando este hallazgo al posible daño del sistema nervioso central (SNC).

2.3 Modelos Animales

Para estudiar la epilepsia se utilizan modelos animales agudos y crónicos, que reproducen la fisiopatología de la epilepsia en humanos. De acuerdo con el tipo de crisis que los modelos reproducen, se pueden clasificar como: modelos de crisis focales, modelos de crisis generalizadas y modelos en estado epiléptico (Garcia et al., 2010).

En este trabajo, el modelo animal utilizado es de estado epiléptico inducido con litio-pilocarpina. La pilocarpina es el compuesto utilizado como agente causante de crisis; este fármaco es un agonista muscarínico que reproduce la ELT en humanos. La pilocarpina actúa sobre los receptores muscarínicos M1 y M2. Al actuar sobre los receptores M1, activa la fosfolipasa C y produce diacil glicerol (DG) e inositol trifosfato (IP3); como consecuencia, se altera el balance de K^+ y Ca^{2+} favoreciendo la excitabilidad del cerebro. Adicionalmente, el glutamato liberado puede actuar sobre sus receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) permitiendo la entrada de Na^+ y Ca^{2+} dentro de la célula e inducir excitotoxicidad (Segal, 1988). El modelo

litio-pilocarpina es una variante del modelo de pilocarpina que se caracteriza por la administración de litio (3mEq/kg) 18 horas antes de la inyección de pilocarpina. El litio potencia el efecto convulsivo de la pilocarpina porque sensibiliza los receptores muscarínicos, razón por la cual exacerba los efectos de la pilocarpina; con la administración previa de litio es posible usar una dosis menor y con ello disminuir la alta mortalidad que se observa al utilizar la pilocarpina en dosis altas (Marinhoa et al., 1998).

El modelo consta de tres períodos (Cavalheiro, 1995):

- a) Un período agudo que avanza progresivamente a un estado epiléptico límbico y que dura máximo 24 horas (SE).
- b) Un período de latencia que consiste en la ausencia de convulsiones y varía de 4 a 44 días.
- c) Un período crónico con convulsiones recurrentes y espontáneas que va de 44 a 325 días (modelo de epilepsia).

Las principales características del modelo son: la localización de focos epilépticos en el sistema límbico, particularmente en el hipocampo, corteza entorrinal y amígdala; un "daño inicial" (SE) en el que se observan diferentes cambios conductuales hasta la presencia de convulsiones generalizadas tónico-clónicas; un período de latencia y una alta incidencia de esclerosis mesial o esclerosis en Cornu Ammonis (Scorza, 2009) produciendo animales con epilepsia establecida.

Dependiendo del tiempo post administración de la pilocarpina, en el que se utilicen los animales, se determina como un modelo de estado epiléptico (SE) o un modelo de epilepsia (ELT).

2.4 Homeostasis de neurotransmisores en SNC

Antes de describir las alteraciones que se han observado en ciertos amino ácidos y neurotransmisores en la epilepsia, es importante comprender cómo funciona la neurotransmisión en condiciones fisiológicas.

Existen amino ácidos que participan de manera fundamental en la transmisión y regulación del impulso nervioso; de ahí que es muy importante que la homeostasis de: el aspartato, el glutamato, la glutamina y el GABA en el cerebro, mantenga un balance entre su liberación, captura y metabolismo. Además existen transportadores gliales y neuronales, que permiten la regulación de las concentraciones extracelulares (Ueda y Willmore, 2009).

La sinapsis glutamatergica está relacionada con procesos excitatorios y la gabaérgica con procesos inhibitorios, por lo tanto funciona como un ciclo. Éste es el —ciclo de glutamato/GABA-glutamina”, el cual es una respuesta adaptativa entre la excitación y la inhibición sináptica que se lleva a cabo entre las neuronas (presináptica y postsináptica) y astrocitos (Bak et al., 2006).

Neurotransmisión glutamatergica

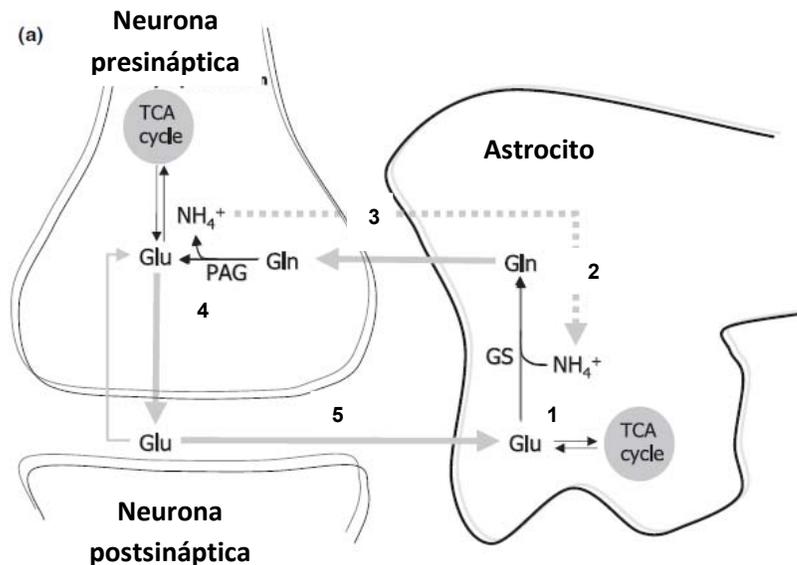


Figura 4. Esquema de una sinapsis glutamatergica.

Para explicar la sinapsis glutamatergica (excitatoria), en la figura 4 se observa una representación gráfica del proceso, la cual se describe a continuación:

1. La célula astrogliosa sintetiza glutamato (Glu) a partir de α -cetoglutarato (intermediario de TCA) mediante la enzima glutamato deshidrogenasa NAD (P).
2. La glutamina sintasa (GS), es la enzima responsable de la síntesis de glutamina (Gln), adiciona un grupo amonio al glutamato a expensas de la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP). El cerebro es rico en esta enzima y es activada por el α -cetoglutarato.
3. La Gln sintetizada por los astrocitos es liberada y puede ser captada por una neurona glutamatérgica.
4. La Gln es utilizada para sintetizar Glu mediante la enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG). Aunque también la neurona puede formar glutamato a partir de α -cetoglutarato, como se describió anteriormente.
5. El Glu de la hendidura sináptica es recapturado por la glia.

Neurotransmisión gabaérgica

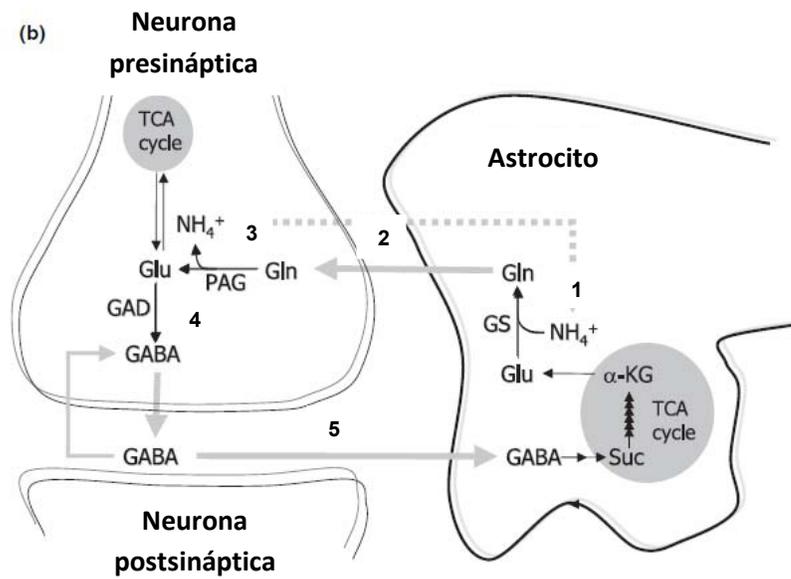


Figura 5. Esquema de una sinapsis gabaérgica.

Para explicar cómo se lleva a cabo la neurotransmisión gabaérgica (inhibitoria), en la figura 5 se observa una representación gráfica que comprende los mecanismos que se describen a continuación:

1. La célula astrogial sintetiza glutamato a partir de α -cetoglutarato, posteriormente puede mediante GS formar glutamina.
2. La Gln es liberada y captada por la neurona presináptica gabaérgica.
3. La Gln es utilizada para sintetizar Glu mediante PAG.
4. La enzima responsable de la síntesis de GABA es la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) que cataliza la descarboxilación del carboxilo α del ácido glutámico dando como productos GABA y CO_2 .
5. El GABA de la hendidura sináptica es recapturado por la glía. El GABA se degrada mediante la transaminasa de GABA (GABA-T) a semialdehído succínico. El semialdehído succínico es oxidado a succinato (intermediario de TCA) contribuyendo así en la síntesis de glutamato.

En este punto es importante mencionar que GAD regula las concentraciones de GABA y está limitada por la disponibilidad de glutamato. Se conocen dos isoformas: GAD67 y GAD65. La primera se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y permanece en su forma activa (holo GAD) sintetizando GABA (Petroff, 2002).

Aspartato

Dentro del proceso excitatorio, es importante mencionar el aminoácido, ácido aspártico o aspartato, aunque su papel en la neurotransmisión aún no se ha determinado (Fleck et al., 1993). Este no es considerado un neurotransmisor porque no se almacena en vesículas como los demás neurotransmisores. Su síntesis se realiza por la acción de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) a través de la condensación de glutamato y oxalacetato. El aspartato podría ser liberado directamente del citosol o de las terminaciones nerviosas. Actúa exclusivamente sobre los receptores de glutamato NMDA y no tiene efecto sobre los receptores AMPA (Purves et al., 2001).

2.5 Papel de aspartato, glutamato y ácido gaba-aminobutírico (GABA) en la epilepsia

El aspartato, el glutamato, la glutamina y GABA participan en un ciclo que se auto regula y auto limita en el proceso de la transmisión sináptica. Sin embargo, existen pocos estudios enfocados en correlacionar alteraciones en las concentraciones de estos amino ácidos (AA) y los trastornos neuronales, como lo es la ELT.

Entre los estudios realizados, Carlson y cols. reportaron la cuantificación de amino ácidos en muestras de microdiálisis del foco epiléptico de pacientes y observan un aumento estadísticamente significativo del aspartato y glutamato durante una crisis parcial; aludiendo una posible relación de los cambios en las concentraciones de aspartato y glutamato por la generación de crisis.

Por otra parte, la investigación en pacientes conscientes con epilepsia parcial compleja y refractaria al tratamiento farmacológico, indicó un aumento de glutamato antes de la aparición de la actividad epiléptica así como su incremento sostenido, mientras que GABA aumentó durante y después de las crisis para contrarrestar la excitación mediada por glutamato en el hipocampo (During y Spencer, 1993).

Este fenómeno fue corroborado por Wilson (1996) quien encontró un aumento en la liberación de glutamato, aspartato y GABA en el espacio extracelular (microdiálisis) durante convulsiones espontáneas en el hipocampo de pacientes con ELT.

La liberación sináptica de glutamato es un proceso dependiente de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje; para ser liberado, es necesario un estímulo que active sus diferentes receptores, ya sean de tipo ionotrópicos o metabotrópicos (ver tabla 1; Purves et al., 2001).

Tabla 1. Receptores de Glutamato. Receptores ionotrópicos y metabotrópicos

Receptores ionotrópicos	Receptores metabotrópicos
AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)	Grupo I mGlu1 y mGlu5
NMDA (N-metil-D-aspartato)	Grupo II mGlu2 y mGlu3
Kainato (ácido 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina)	Grupo III mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8

Durante las crisis epilépticas, el aumento excesivo de glutamato activa principalmente los receptores NMDA, AMPA y metabotrópicos del Grupo I; lo que ocasiona un desequilibrio iónico que permite la entrada excesiva de Ca^{2+} y Na^+ al interior de la célula generando un proceso conocido como excitotoxicidad. Este fenómeno se refiere a la muerte celular ocasionada por el aumento de Ca^{2+} que activa lipasas, proteasas y nucleasas; que conducen a procesos de necrosis y apoptosis (Meldrum, 2000; Bradford, 1995).

En cuanto a GABA (participa en procesos inhibitorios), los estudios realizados apuntan a la reducción de este neurotransmisor en pacientes epilépticos. Mediciones en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con crisis generalizadas revelaron una disminución significativa del contenido de GABA (Wood et al., 1979). Asimismo, bajos niveles de GABA (lejos del foco epiléptico) parecen tener una relación con una mayor predisposición de los pacientes a presentar crisis (Petroff et al., 1996).

En 1983 Huxtable y cols. cuantificaron los niveles de AA en plasma por la técnica de microdiálisis; entre sus hallazgos encontraron la duplicación de los niveles de aspartato en pacientes con crisis tónico clónicas y otros tipos de crisis, así como un aumento de tres a cuatro veces en los niveles de glutamato en pacientes con crisis de ausencia, crisis tónico clónicas y otros tipos de crisis.

La evaluación de los niveles de AA en plasma en pacientes después de una crisis tónico-clónica reveló un aumento de los niveles de glutamato en pacientes con

epilepsia mioclónica juvenil; mientras que, los pacientes con epilepsia refractaria localizada no presentaron diferencia respecto al grupo control (Rainesalo et al., 2004). Por lo tanto, las mediciones en LCR y plasma podrían ser indicadores de los cambios neuroquímicos que ocurren en las regiones del cerebro, lo que podría contribuir al conocimiento de los cambios neuronales durante los estados patológicos; sin embargo, es necesario realizar más investigación al respecto.

2.6 Farmacorresistencia

En el tratamiento de la epilepsia, como primera opción está la farmacoterapia. En la actualidad se cuenta con diferentes esquemas farmacológicos para el tratamiento de la epilepsia. Entre los cuales se encuentran medicamentos como la carbamazepina, valproato y fenitoína que pueden bloquear la excitabilidad nerviosa; las benzodiazepinas, barbitúricos, tiagabina y vigabatrina que aumentan la inhibición sináptica mediada por GABA; y otros como la carbamazepina, lamotrigina y fenitoína que también actúan bloqueando los canales de sodio (Kumar et al., 2015).

Sin embargo, hay una alta incidencia de pacientes que no logran un manejo adecuado de las convulsiones con el primer o el segundo esquema terapéutico. También algunos pacientes, al principio del tratamiento controlan las crisis; pero al paso del tiempo parecen insensibilizarse y vuelven las crisis lo que conduce a cambiar constantemente los esquemas de tratamiento. Cuando se presenta esta condición se le denomina farmacorresistencia (Kwan et al., 2011). Desafortunadamente, las crisis convulsivas no consiguen controlarse en un alto porcentaje de pacientes con epilepsia, y para los pacientes con epilepsia refractaria aún sigue siendo una meta no lograda. En el caso de la ELT, se estima que el 30% de los pacientes son farmacorresistentes (French, 2007). Se continúan haciendo grandes esfuerzos para lograr nuevos fármacos más eficaces y seguros que puedan cubrir las necesidades de los pacientes con epilepsia.

Lo anterior conduce a la necesidad de buscar nuevas estrategias antiepilépticas, entre ellas se encuentran: la cirugía en algunos casos, la estimulación del nervio vago y las terapias basadas en modificaciones de la dieta.

La terapia dietética más conocida es la dieta cetogénica (DC) que se ha empleado en el tratamiento de la epilepsia refractaria al tratamiento farmacológico, principalmente en niños (Freeman et al., 1998, Pablos et al., 2014).

2.7 Terapias dietéticas

Antecedentes se remontan a la época de Hipócrates. Desde entonces se conocía que un ayuno sostenido disminuía las crisis epilépticas. En 1911, Guelpa y Marie utilizaron el ayuno como tratamiento a la epilepsia; más tarde, en 1921, Woodyatt y Wilder demostraron que la presencia de acetona y β -hidroxibutirato en sujetos en ayuno disminuía las crisis epilépticas. Así surgió la posibilidad de semejar un estado de ayuno al modificar la dieta (Pedrón, 2009).

En un estado de ayuno o sin ingerir glucosa; de manera alternativa para obtener energía, se pueden metabolizar los ácidos grasos que se encuentran en tejidos como: hígado y músculo esquelético, proceso llamado lipólisis. Éste conduce a la formación de acetil-Coenzima A (Acetil Co A), pero cuando hay un excedente, una fracción conduce a la producción de cuerpos cétonicos (CC) mediante un proceso llamado cetogénesis. Los CC que se forman son: acetona, acetoacetato y β -hidroxibutirato; éstos pueden viajar por el torrente sanguíneo para posteriormente ser utilizados en otros tejidos, donde se pueden convertir a acetil-Co A e incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) donde son oxidados para obtener moléculas energéticas (Voet y Voet, 2004).

Durante la DC se produce un estado de cetosis; es decir, una alta concentración de CC. La DC es una dieta alta en grasa, moderada en proteína y baja en carbohidratos que es cuidadosamente controlada (International League Against Epilepsy). El uso de la dieta cetogénica ha manifestado que el 10% de los

pacientes quedan libres de ataques epilépticos, y el 50% presentan una reducción del 50% de crisis (Kozák y Csiba, 2007).

Una de las limitantes de la DC, es que presenta efectos secundarios y/o alteraciones bioquímicas significativas. Al inicio de la dieta hay restricción de líquidos lo que produce deshidratación e hipoglucemia; adicionalmente, se presentan alteraciones gastrointestinales como: náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento y anorexia. Las alteraciones metabólicas suelen ser leves como hipercolesteremia, hiperuricemia transitoria, hipocalcemia, disminución de los niveles de algunos amino ácidos, hipoproteinemia, hiponatremia e hipomagnesemia, hasta complicaciones tardías como cálculos renales (Pedrón, 2009).

El efecto antiepiléptico de la DC no ha sido descrito con exactitud. Al respecto se han propuesto diversas hipótesis como: cambios en los sistemas de neurotransmisión, regulación de canales iónicos, restricción glucolítica, reducción en el estrés oxidativo, efectos de anaplerosis del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, así como mejora de la bioenergética celular y la función mitocondrial, (Rho, 2015). Inclusive se ha investigado la posibilidad que la cetosis altere el metabolismo de los AA y que, estos cambios en los sistemas de neurotransmisión sean los responsables del efecto antiepiléptico (Yudkoff et al., 2008).

La DC produce una gran cantidad de CC que pueden atravesar la barrera hematoencefálica mediante transportadores de monocarboxilato para ser usados en el cerebro (Koehler-Stec et al., 1998). La acetona no tiene función metabólica; por su parte, el acetoacetato es metabolizado en tejido a acetona y β -hidroxibutirato, de manera que el principal CC es el β -hidroxibutirato (Voet & Voet, 2004).

Los CC no solo tienen la función de ser una fuente de energía sino que también participan en el anabolismo de AA y lípidos. Se ha descrito que el incremento en el metabolismo de los CC implica una mayor formación de Acetil-Co A, por lo que se incrementa el flujo de la reacción citrato sintasa:



de esta manera aumenta el flujo del CAT. Al respecto, se ha descrito que la velocidad de flujo de la reacción citrato sintasa es diez veces mayor que el flujo de la piruvato deshidrogenasa (obtención de Acetil-Co A mediante glucólisis) (Ratnakumari y Murthy, 1998).

Por lo tanto en la DC la gran cantidad de Acetil-Co A que se incorpora al CAT, incrementa el flujo y debe acelerar la síntesis de glutamato, ya que su síntesis requiere α -cetoglutarato, un intermediario de CAT. Además, para formar aspartato se requiere la condensación de glutamato y oxaloacetato, pero la reacción citrato sintasa utiliza oxaloacetato; por lo tanto, la formación de aspartato se ve limitada. De esta manera hay más glutamato disponible para formar GABA y su aumento se relaciona con una disminución de la excitación neuronal y/o beneficiando la inhibición, (ver figura 6. Yudkoff et al., 2007).

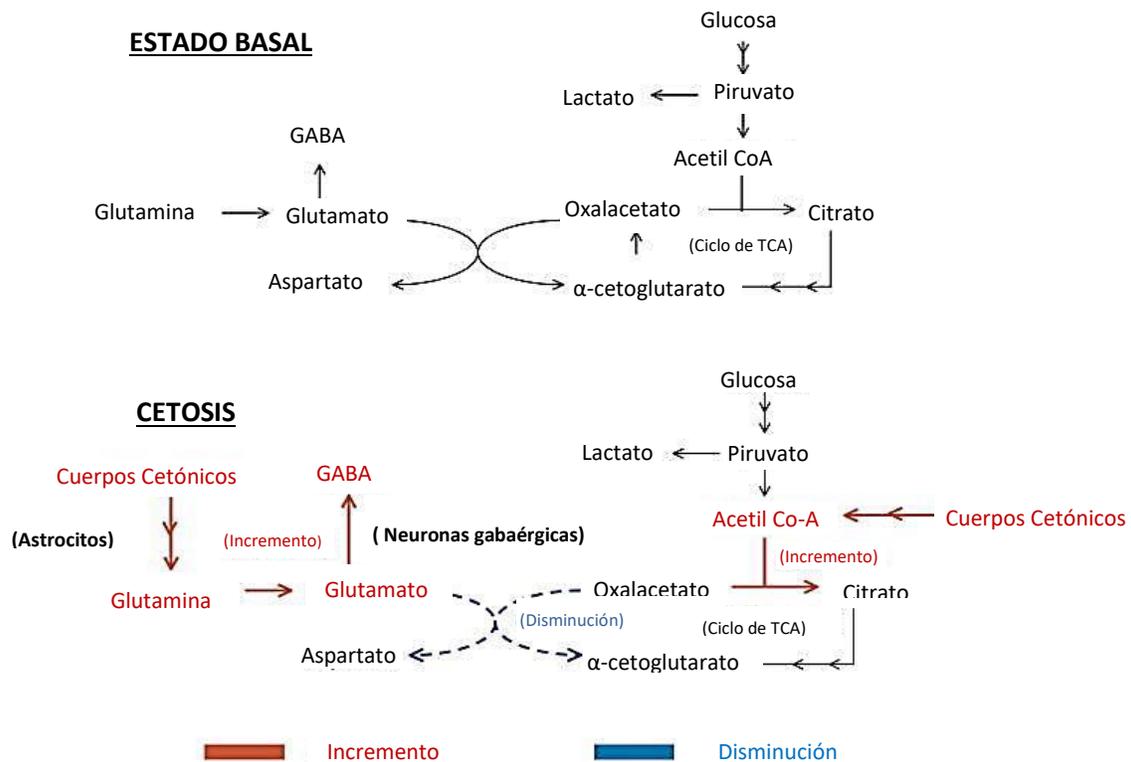


Figura 6. Metabolismo de los aminoácidos en cerebro. La imagen representa una condición basal y debajo una en presencia de cuerpos cetónicos.

Debido a las complicaciones que la DC presenta, se ha investigado otro tipo de dietas restrictivas que ofrezcan sus beneficios, sin las complicaciones metabólicas. En el año 2000, en un estudio publicado por Freeman y cols., se observó que la eficacia de la DC en la epilepsia mejoraba cuando la dieta se administraba después de un ayuno prolongado o cuando las calorías totales eran restringidas. Por otro lado, las evidencias en modelos experimentales apuntan que las dietas restrictivas ofrecen neuroprotección mediante mecanismos como: antiinflamación, neurogénesis, plasticidad neuronal, autofagia, biogénesis mitocondrial y mecanismos epigenéticos (Pani, 2015).

Otro tipo de dietas restrictivas son: la restricción calórica (RC) y la restricción alimentaria (RA). La RC consiste en una disminución de la ingesta de calorías (Speakman y Mitchell, 2011) sin restricción en los grupos de alimentos ni en el tiempo de consumo. Mientras que la RA es una dieta en la cual se limita la disponibilidad de la comida en un tiempo corto (Bellet y Sassone, 2010), sin restringir el aporte calórico ni los grupos de alimentos.

Algunos protocolos de RA han propuesto un ayuno por un periodo de 18 - 22 horas al día; en estas publicaciones, los resultados obtenidos han demostrado una adaptación de la función metabólica aumentando la liberación de ácidos grasos y por consecuencia la producción de cuerpos cetónicos (Escobar et al., 1998) (Rivera et al., 2011). También se ha documentado que la RA mantiene el equilibrio energético preservando los niveles de glucosa a través de hidrólisis de glucógeno y utilizando combustibles alternos como los cuerpos cetónicos (Escobar et al., 1998).

Hay evidencias del efecto antiepiléptico de la RA; Landgrave y cols. (2016) encontraron un aumento significativo de la concentración de β -hidroxibutirato, en plasma de ratas Wistar que fueron sometidas durante 21 días a un modelo de RA. Estas concentraciones parecen estar relacionadas con una disminución en la severidad de las crisis así como con un aumento en el periodo de latencia (ausencia de convulsiones). De forma interesante, la concentración de glucosa en

el grupo de RA no presentó cambios significativos. Al realizar un ensayo de tolerancia a la glucosa se encontró que, los animales con alimentación *ad libitum* en los días 15 y 20 presentaron un aumento significativo de la glucosa. En el grupo con RA no hubo diferencia alguna en la misma prueba; lo que sugiere que los animales bajo RA no presentan hipoglucemia.

Las dietas restrictivas como la RC y la RA caracterizadas por producir una gran cantidad de cuerpos cetónicos, representan una opción que permite evitar las complicaciones de la DC pero preservar el efecto anti-convulsivante y la neuroprotección. Tanto la DC, como la RC y la RA comparten mecanismos fisiológicos como, el aumento de CC y el mantenimiento de los niveles de glucosa.

En estudios publicados, la DC y la RC han mostrado un efecto antiepiléptico que posiblemente se debe a modificaciones en el metabolismo de los AA; sin embargo, en la RA se desconoce el efecto en el metabolismo de amino ácidos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la RA sobre los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma en un modelo animal de SE inducido por pilocarpina.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la epilepsia es una enfermedad con alta prevalencia en países en desarrollo y con alta incidencia de pacientes refractarios al tratamiento, es necesario buscar alternativas terapéuticas viables. Uno de estos tratamientos puede ser la restricción alimentaria, debido a la similitud metabólica que comparte con otras terapias dietéticas (dieta cetogénica, restricción calórica).

En la dieta cetogénica y la restricción calórica, la evidencia experimental apunta a que la cetosis altera el metabolismo de los AA y produce cambios en los sistemas de neurotransmisión que pueden ser responsables del efecto antiepiléptico.

Por lo tanto, en este trabajo se estudiaron ratas Wistar bajo un régimen de restricción alimentaria y sometidas a un modelo de SE inducido por litio-pilocarpina con el propósito de cuantificar niveles de: aspartato, glutamato, glutamina y GABA en tejido cerebral (hipocampo y bulbo olfatorio); a diferencia de la bibliografía donde comúnmente se reportan cambios en el espacio extracelular mediante la técnica de microdiálisis (Carlson et al., 1992, During y Spencer, 1993, Wilson et al., 1996). Es importante señalar que no existe evidencia de reportes de la cuantificación de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en bulbo olfatorio. También se cuantificaron los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en plasma, con la finalidad de saber si los cambios que ocurren en tejido cerebral se reflejan a nivel periférico.

Estos resultados aportarán información acerca del efecto de la restricción alimentaria sobre los cambios en los sistemas de neurotransmisión en las estructuras: hipocampo y bulbo olfatorio; mientras que las mediciones en plasma podrían ser indicadores de los cambios que podrían ocurrir en dichas estructuras.

4. OBJETIVO

Objetivo general

En ratas Wistar sometidas a restricción alimentaria e inducidas a un *status epilepticus* por litio pilocarpina evaluar la severidad de las crisis epilépticas y cuantificar los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma, para conocer si la restricción alimentaria modifica el metabolismo de amino ácidos y si estos cambios son responsables de la disminución en la severidad de las crisis.

Objetivos particulares:

- Formar grupos de restricción alimentaria y de alimentación *ad libitum* durante 21 días.
- Realizar el modelo de litio-pilocarpina en los grupos: *ad libitum* y restricción alimentaria.
- Evaluar la severidad de las crisis mediante la escala de Racine.
- Hacer una curva de calibración de amino ácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Estandarizar la técnica de cuantificación de amino ácidos en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma.

5. HIPÓTESIS

Si la restricción alimentaria produce cuerpos cetónicos capaces de alterar el metabolismo de los amino ácidos modificando los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma de ratas Wistar entonces estos cambios podrían causar una disminución en la severidad de las crisis de ratas en restricción alimentaria con *status epilepticus* inducido con litio pilocarpina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

El proyecto de restricción alimentaria fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para minimizar el número de animales utilizado y su sufrimiento. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar entre 250 y 300 gramos (adultos jóvenes), las cuales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina. Durante el experimento, los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad y con temperatura controlada de 22-23°C. Los animales se habituaron a las condiciones del bioterio del laboratorio, durante una semana después de ser recibidos del bioterio central.

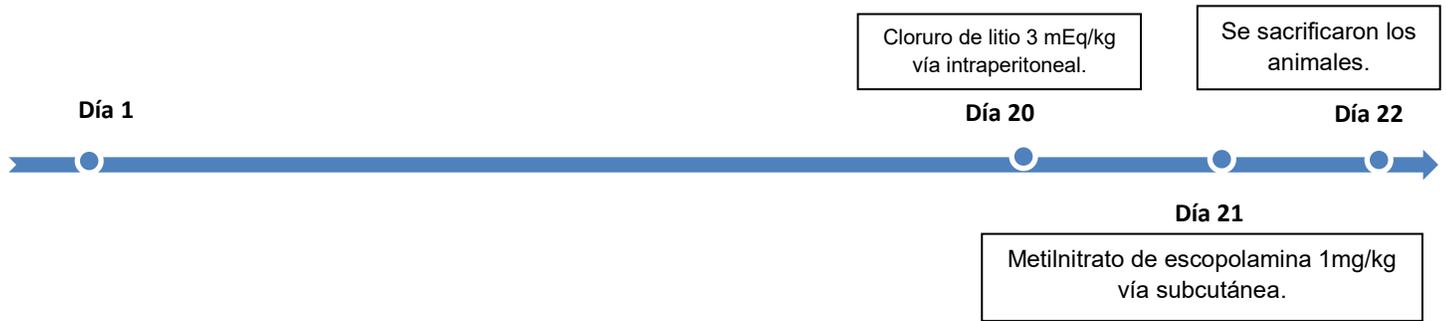
6.2 Diseño experimental

Se emplearon cuatro grupos de estudio con un número de cinco ratas por grupo:

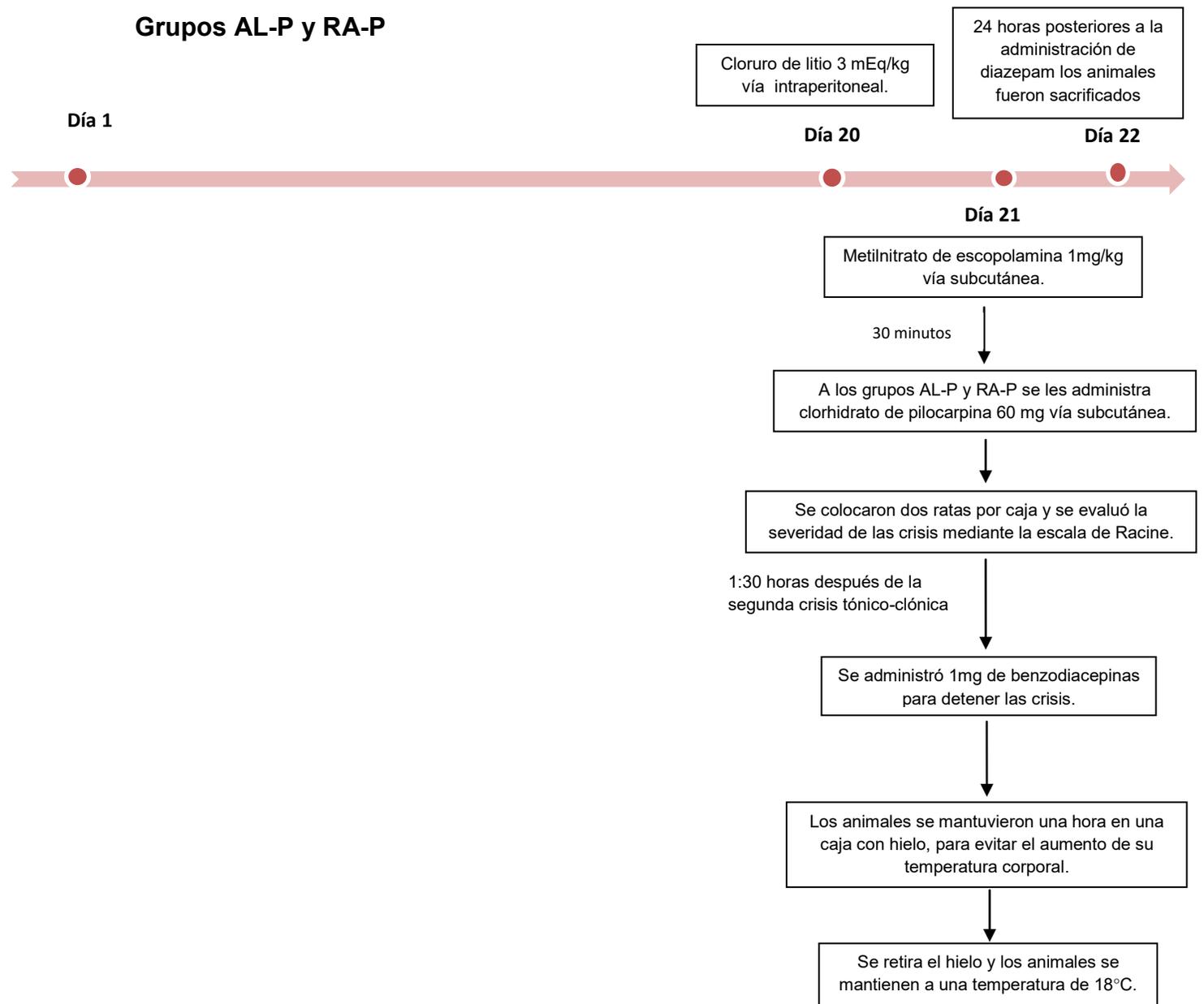
1. *Ad libitum* (AL)
2. *Ad libitum*- pilocarpina (AL-P)
3. Restricción alimentaria (RA)
4. Restricción alimentaria-pilocarpina (RA-P)

Los grupos AL y AL-P se alimentaron con croquetas rat chow y agua *ad libitum* durante todo el tiempo en el que se realizó el experimento. Los grupos RA y RA-P se sometieron a un régimen de restricción alimentaria por un periodo de 21 días. Estos animales tuvieron únicamente agua *ad libitum*; el acceso a la comida (rat chow) se restringió a un periodo de dos horas una vez al día (ayuno de 22 horas); en un horario de 9:00 a 11:00 am. A continuación se describe la metodología empleada para los grupos AL y RA, así como el modelo de litio-pilocarpina realizado en los grupos AL-P y RA-P.

Grupos AL y RA



Grupos AL-P y RA-P



6.3 Escala de Racine

En 1971 R. Racine propuso que la estimulación eléctrica (kindling) diaria en la amígdala y en el hipocampo era suficiente para provocar post-descargas a determinada intensidad dando lugar al desarrollo de convulsiones motoras espontáneas que inicialmente no podían ser evocadas por estos estímulos.

Racine describió una escala que relaciona los cambios EEG con los cambios en el comportamiento durante las crisis motoras en el modelo de kindling. Clasificó los cambios motores y la conducta en una escala de cinco etapas, ver tabla 2 (Racine, 1971).

Tabla 2. Escala de Racine. Se describen las etapas y sus cambios conductuales.

Etapas	Cambios conductuales
I	Movimientos de boca y faciales
II	Movimientos de cabeza
III	Clonus de miembros anteriores
IV	Levantamiento (posición de canguro)
V	Levantamiento y pérdida de la postura

La escala de Racine se utilizó para evaluar la intensidad de las crisis en el modelo de litio-pilocarpina y evaluar el inicio del SE. A partir de la inyección de pilocarpina se registró la latencia, es decir el tiempo que transcurrió para que los animales presentaran los cambios conductuales que corresponden a las etapas II y III de la escala de Racine como son: movimientos masticatorios, salivación y asentamiento de cabeza.

Luego se registró el número de veces que los animales manifestaron algún comportamiento de las etapas IV y V de la escala de Racine; que corresponden a las crisis límbicas. En estas etapas se pueden observar crisis tónicas, clónicas y tónico-clónicas. Los cambios conductuales que los animales presentan son sacudidas como de *perro mojado*, *clonus* de miembros anteriores, posición de *canguro* y pérdida de la postura corporal. Los animales fueron observados y cuando presentaron crisis continuas y repetidas se consideró que entraron a SE,

solo los animales que presentaron SE fueron considerados para la cuantificación de AA.

6.4 Obtención de las muestras

A las 24 horas posteriores al SE, las ratas se anestesiaron con 0.5 ml de pentobarbital, cuando ya no presentaron reflejos se abrió la cavidad torácica. Se obtuvo sangre por punción directa de la aurícula derecha. La sangre se traspasó a tubos con 300 μ l de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.11M. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm, a temperatura de 4°C durante 15 minutos; se recuperó el plasma y se congeló a -70°C.

Después de la obtención de la sangre; se perfundieron los animales con un buffer de fosfatos (0.1M) para retirar la sangre de los tejidos (lavado). Para ello se utiliza una bomba peristáltica que genera un flujo en una manguera con la presión suficiente para que el buffer de fosfatos pase a través del sistema circulatorio. El procedimiento se describe a continuación: una aguja de diámetro 18G se inserta en el ventrículo izquierdo del corazón de manera que la solución de buffer de fosfatos (0.1M) pasa a la aorta y de ahí se distribuye a todos los tejidos, se realiza un corte en la aurícula derecha para que la solución salga del circuito y continúe el lavado. De esta manera se retira la sangre de todos los tejidos, incluyendo el cerebro; el lavado se realiza durante 12-15 minutos.

Después de la perfusión, la rata se decapitó y se extrajo el cerebro; éste se depositó en el buffer de fosfatos frío, luego se separaron ambos bulbos olfatorios y se depositaron en un microtubo (previamente etiquetado) que contenía 1ml de solución Krebs Ringer acidificada (pH=3), el cerebro se cortó sagitalmente para separar los hemisferios y se disecó el hipocampo de cada lado. Ambos lados del hipocampo se depositaron en un microtubo (previamente etiquetado) que contenía 1ml de solución Krebs Ringer acidificada. Las muestras fueron congeladas a -70°C.

Una vez colectadas todas las muestras de tejido para realizar la medición de los AA por sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography),

se descongelaron lentamente y se homogenizaron; luego fueron centrifugadas a 14 000 rpm durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante en microtubos previamente marcados.

6.5 Cuantificación de proteínas totales

Se empleó un Kit de ensayo (Micro BCA Thermo Scientific) para cuantificar las proteínas totales en los homogenados de hipocampo y bulbo olfatorio mediante el ácido bicinconínico (BCA).

Se preparó una curva estándar de la siguiente manera: se tomaron 30 μl de un stock de albumina ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se aforó con agua a un volumen de 300 μl (concentración 20 μg de proteína/ μl). A partir de esta concentración se realizaron diluciones 1:2, misma que se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Curva estándar de BCA.

μg de proteína/μl
20.000
10.000
5.000
2.500
1.250
0.625
0.000

Para la cuantificación de las muestras de hipocampo se colocó 1 μl de muestra y 99 μl de BCA mientras que para las muestras de bulbo olfatorio se utilizaron 3 μl de muestra y 97 μl de BCA.

En una placa de 96 pozos se preparó la curva estándar por duplicado y las muestras. Posteriormente se midió la densidad óptica de la reacción a una longitud de onda de 563 nm en un espectrofotómetro (Epoch). Mediante la curva estándar se obtuvo la regresión lineal y se calculó la cantidad de proteínas totales, en cada una de las muestras en μg de proteína/ μl .

6.6 Generalidades sobre el uso del equipo Agilent 1100

El equipo utilizado es cromatógrafo de líquidos de alta resolución, por HPLC de la marca Agilent, modelo 1100. El cromatógrafo cuenta con los diferentes módulos como se muestra en la figura 7 (figura tomada de Agilent Technologies Inc, 2007).

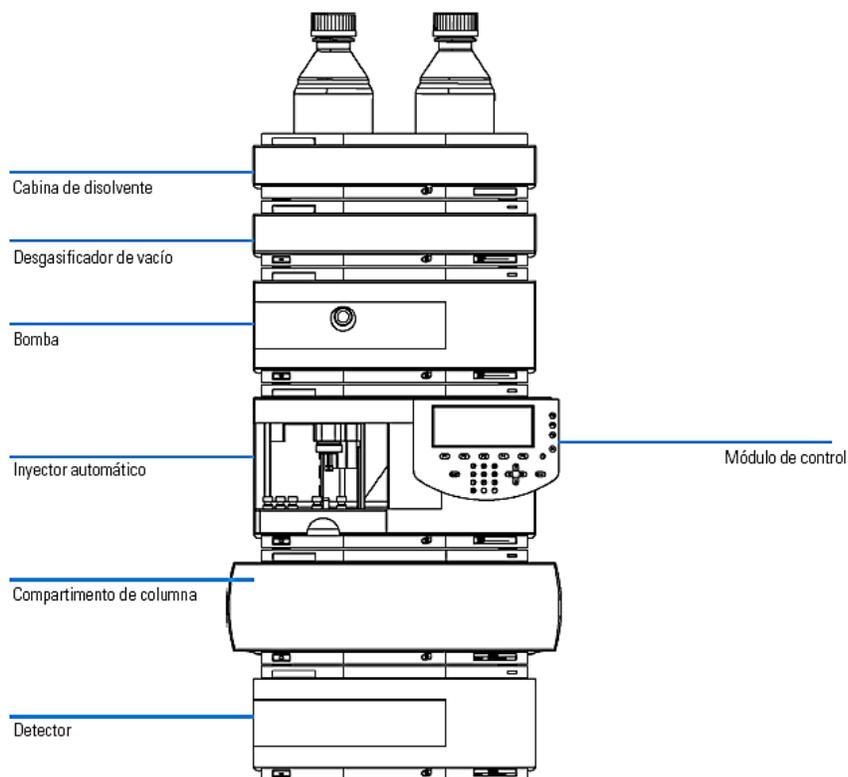


Figura 7. Componentes de un HPLC Agilent 1100.

6.7 Condiciones cromatográficas

Para la cuantificación de AA se utilizó una columna de fase reversa marca Agilent (ZORBAX Eclipse AAA 3.5 μ m 3.0 x 150 mm) y la temperatura de la columna se estableció a 40 °C. Para la detección se programó al detector para excitar a una longitud de onda de 350 nm y medir la energía emitida a 450 nm. El flujo y aceleración de la bomba fue de 1.0 ml/min y 100.0 ml/min², respectivamente.

Para la cuantificación de los AA es necesaria una derivatización pre-columna que utiliza o-ftalaldehído (OPA); este reactivo reacciona con el grupo amino de los AA (ver figura 8) formando compuestos fluorescentes que se detectan, por diferencia de excitación y emisión, mediante una lámpara de fluorescencia (M. Buha, et al., 2011).

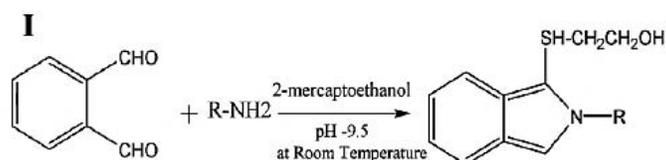


Figura 8. Derivatización pre-columna. Reacción de un aminoácido con OPA en ácido 3-mercaptopropionico y buffer de boratos.

Se utilizaron los siguientes viales de reacción y se colocaron en el plato del cromatógrafo en el siguiente orden:

- 1 Buffer de boratos
- 2 Agua de lavados
- 3 OPA
- 4 Agua de inyección
- 5 Acetonitrilo
- 8 Krebs Ringer
- F8 Estándar
- F9 Control interno

*El estándar y el control interno se utilizan siempre que se procesan muestras.

El método se basa en el recomendado por el fabricante: análisis de AA usando una columna Zorbax Eclipse-AAA y HPLC Agilent 1100 con algunas modificaciones.

El método se llama AA AGILENT-INTEGRACION, utiliza dos fases móviles: fase móvil A (40mM Na₂HPO₄ pH 7.8) y fase móvil B (40:45:10 acetonitrilo: metanol: agua; el tiempo de análisis de cada corrida es de 33 minutos. El gradiente de elución se muestra en la tabla 4:

Tabla 4. Composición del gradiente de la fase móvil.

Tiempo (min)	%B	%A
0.0	0.0	100.0
0.5	0.0	100.0
1.0	10.0	90.0
8.0	10.0	90.0
22.0	35.0	65.0
22.5	100.0	0.0
26.2	100.0	0.0
27.1	0.0	0.0
30.0	0.0	0.0

6.8 Control interno y estándar

La solución **estándar** corresponde a la concentración de 1.9 μM de la curva de calibración. El estándar de concentración conocida nos permite realizar un análisis cualitativo, es decir, permite comparar los cromatogramas del estándar con los cromatogramas de las muestras, de esta manera se establece qué picos corresponden al tiempo de retención de cada AA.

También se preparó un **control interno** de la siguiente manera. Se colocó 200 μl de plasma de una rata normal (sin tratamiento alguno) en un microtubo, y al mismo microtubo se agregaron 200 μl de acetonitrilo (dilución 1:2); posteriormente se filtró con un microfiltro de 0.45 μm para HPLC. De esta dilución se tomaron 40 μl y se agregaron 760 μl de solución Krebs Ringer acidificada (dilución final 1:40). El control interno contiene 500 μl de la dilución 1:40 de plasma de rata y 500 μl del estándar 1.9 μM . La separación cromatográfica del control interno (medio biológico) se compara con el estándar para comprobar que el patrón de la separación y los tiempos de retención coincidan en los AA de interés; la diferencia se ve sólo en el tamaño de los picos (ver figura 9). Además, permite diferenciar señales de otros compuestos del plasma que no corresponden a los AA evitando la integración de ruidos.

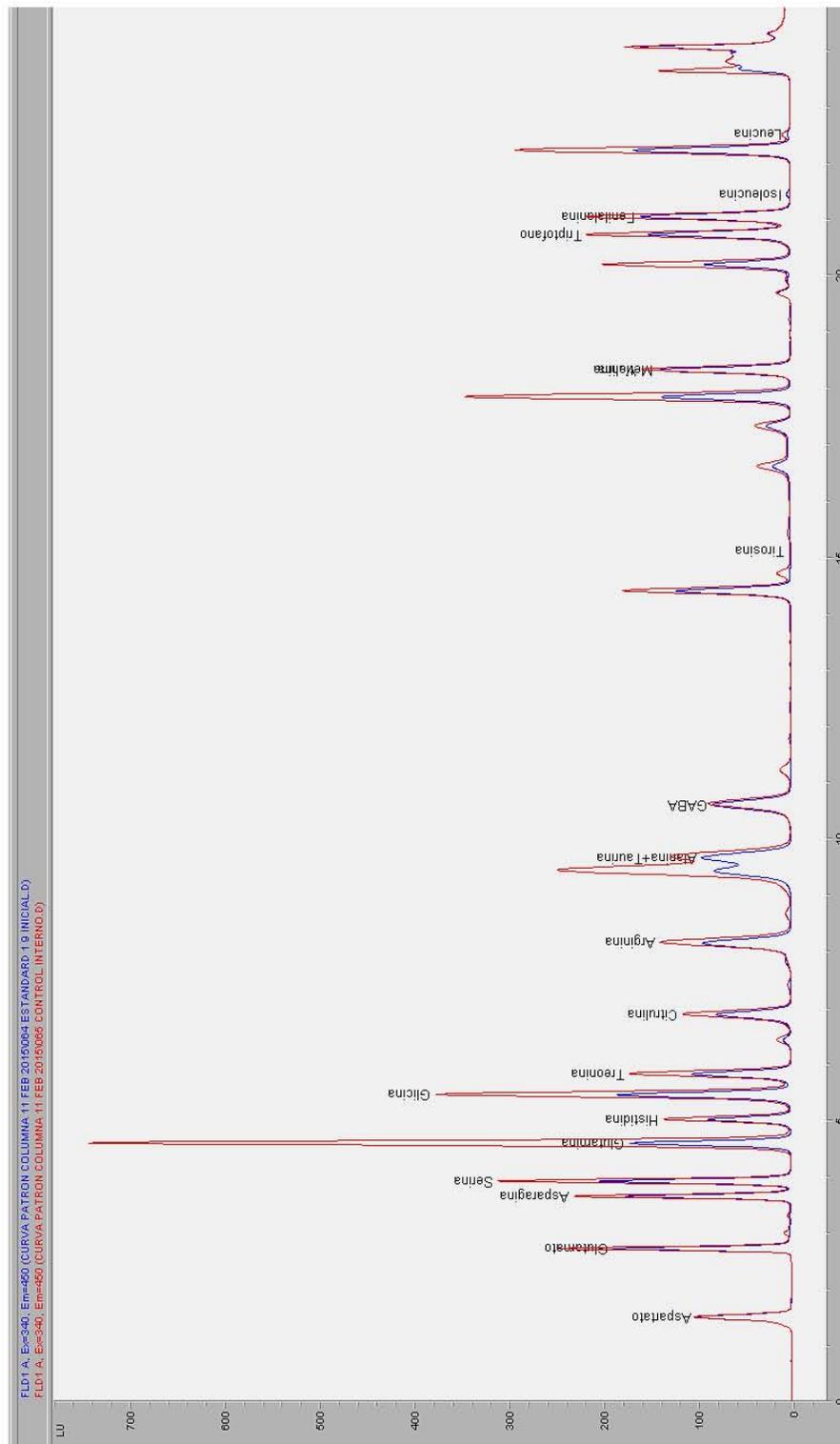


Figura 9. Se muestran los cromatogramas del estándar (color azul) y del control interno (color rojo).

6.9 Curva de calibración

Para cuantificar los AA se utilizó un método de estándar externo, para ello se realizó la curva de calibración, ver tabla 5.

Tabla 5. Masa pesada de AA para la curva de calibración.

	Aminoácido	MM(g/mol)	Masa calculada (g)	Masa pesada(g)
1	L-Aspartato	133.1	0.0133	0.0132
2	L-Glutamato	147.13	0.0147	0.0157
3	L-Asparagina	132.12	0.0132	0.0142
4	L-Serina	105.1	0.0105	0.0108
5	L-Glutamina	146.15	0.0146	0.0147
6	Histidina	155.16	0.0155	0.0162
7	Glicina	75.07	0.0075	0.0075
8	L-Threonina	119.12	0.0119	0.0125
9	L-Citrulina	175.19	0.0175	0.0174
10	L-Arginina	174.2	0.0174	0.0184
11	L-Alanina	89.09	0.0089	0.0098
12	L-Tirosina	181.19	0.0181	0.0184
13	L-Valina	117.15	0.0117	0.0125
14	L-Metionina	149.21	0.0149	0.0162
15	L-Triptófano	204.23	0.0204	0.0211
16	L-Fenilalanina	165.19	0.0165	0.0167
17	L-Isoleucina	131.18	0.0131	0.0146
18	L-Leucina	131.18	0.0131	0.0140
19	GABA	103.12	0.0103	0.0105
20	Taurina	125.15	0.0125	0.0138

Se transfirió cada AA a un matraz aforado de 10 ml y se aforó con ácido clorhídrico 0.1M, excepto la Glutamina que se aforó con agua destilada.

Se preparó una solución madre 0.1 M de la siguiente manera: en un matraz de 10 ml se depositaron 4 ml de solución de Krebs Ringer acidificada y se agregaron 200 µl de cada una de las soluciones de los AA; finalmente se aforó con solución Krebs Ringer acidificada. La solución de Krebs Ringer acidificada mantiene el balance osmótico y el pH mantiene estables a los AA.

A partir de la solución madre se realizaron varias diluciones, como se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Diluciones de la curva de calibración.

Dilución	Concentración
800 µl de solución madre + 80 µl Krebs Ringer	181.800 µM
600 µl de 181.8 µM + 300 µl Krebs Ringer	121.200 µM
500 µl de 121.2 µM + 500 µl Krebs Ringer	60.600 µM
500 µl de 60.6 µM + 500 µl Krebs Ringer	30.300 µM
500 µl de 30.3 µM + 500 µl Krebs Ringer	15.100 µM
500 µl de 15.1 µM + 500 µl Krebs Ringer	7.600 µM
500 µl de 7.6 µM + 500 µl Krebs Ringer	3.800 µM
500 µl de 3.8 µM + 500 µl Krebs Ringer	1.900 µM
500 µl de 1.9 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.950 µM
500 µl de 0.95 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.470 µM
500 µl de 0.47 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.240 µM
500 µl de 0.24 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.120 µM
500 µl de 0.12 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.059 µM
500 µl de 0.059 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.030 µM
500 µl de 0.030 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.015 µM
500 µl de 0.015 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.0075 µM
500 µl de 0.0075 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.0037 µM
500 µl de 0.0037 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.0018 µM
500 µl de 0.0018 µM + 500 µl Krebs Ringer	0.0009 µM

De la concentración 60.6 µM hasta la concentración 0.0009 µM son los puntos considerados para la curva de calibración. Estas diluciones se filtraron y del filtrado de cada una se depositó 25 µl en un inserto y cada uno se colocó en un vial ámbar para su cuantificación.

6.10 Estandarización de la técnica de cuantificación de amino ácidos

La estandarización de la cuantificación de AA en muestras de plasma ya se había realizado; sin embargo, se tuvo que estandarizar la cuantificación de AA en tejido. Para ello se realizó un ensayo en bulbo olfatorio e hipocampo de ratas Wistar que no pertenecían al protocolo de investigación para definir qué dilución permitía la obtención de un cromatograma que pudiera ser cuantificado. Se estableció usar una dilución 1:40 para la determinación de AA en las muestras de bulbo olfatorio y una dilución 1:100 para las muestras de hipocampo.

6.11 Tratamiento de las muestras

1. Las muestras se descongelaron y se mantuvieron a 4°C.
2. Se homogenizaron en un buffer de Krebs Ringer acidificado.
3. En un microtubo previamente marcado se adicionaron 200 µl de acetonitrilo, luego se adicionaron 50 µl de hipocampo; en el caso de bulbo olfatorio y de plasma se utilizaron 200 µl. La mezcla se homogenizó con un vortex por un minuto.
4. Se incubó a 4°C durante 10 minutos.
5. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 8 minutos.
6. Posteriormente se tomó el total del sobrenadante y se filtró (microfiltro de 0.45µm) a un microtubo previamente marcado.
7. En otro microtubo marcado se colocó 190 µl de solución de Krebs Ringer acidificada y 10 µl de la muestra filtrada (dilución 1:20).
8. Se depositó 20 µl de la dilución en un inserto y éste se colocó en un vial ámbar con el código de la muestra.

Los viales se pusieron en un orden previamente asignado en el programa del cromatógrafo en el plato del HPLC junto con los viales de reacción, así como el estándar y control interno.

En este punto se escribió la tabla de secuencia en la cual se programó al equipo para que procesara: tres blancos, el control interno, se escribió el código de las muestras de acuerdo con su posición en el plato, y se corrieron tres estándares; uno inicial, uno intermedio y uno final, por corrida.

Previamente se realizó el lavado diario del cromatógrafo (ver apéndice), mediante el *software instrument 1 (online)*; se cargó el método AA AGILENT-INTEGRACION y se procesaron las muestras en lotes de 12 muestras por día para minimizar errores y para no saturar la columna.

6.12 Obtención de los cromatogramas

Para analizar los cromatogramas se utilizó el programa *Agilent 1 (offline)*. Este programa nos permite visualizar el cromatograma; partimos del estándar para ajustar los tiempos de retención (tiempo al cual se detectó la señal del compuesto en su máxima intensidad) que corresponden a cada AA. El programa nos presenta una tabla para definir el tiempo de retención y el nombre del AA correspondiente.

Al calibrar se definen las señales que se van a integrar para el resto de los cromatogramas y se excluyen aquéllas que no están relacionadas con los AA que estamos evaluando. De esta forma, sólo se seleccionaron las señales de los AA de interés: aspartato, glutamato, glutamina y GABA. Una vez que se realiza la tabla de calibración y se seleccionan los tiempos de retención, automáticamente en los siguientes cromatogramas aparece en cada señal el tiempo de retención y el nombre del AA correspondiente y, por ende, este paso no se vuelve a repetir.

Después se integraron los cromatogramas de cada muestra; de manera manual se selecciona la línea base de los picos para cada AA y se usa el mismo criterio en todos los cromatogramas. Una vez que se integró, el programa calcula el área bajo la curva y muestra el valor del área en el cromatograma.

Para cada cromatograma se obtuvo el reporte; éste contiene el cromatograma y una tabla que indica para cada AA el tiempo de retención y el área bajo la curva correspondiente. El cromatograma nos muestra en el eje de las “y” la intensidad de la emisión lumínica que se grafica como uLu (unidades luminiscentes) y en el eje de las “x” se muestran los tiempos de retención (minutos) de la señal lumínica. Posteriormente en una hoja de Excel se capturaron todas las áreas de los AA en: cada concentración de la curva de calibración, cada muestra evaluada, así como los controles internos y los estándares.

En la figura 10 se muestra el ejemplo de un cromatograma que corresponde a la concentración del estándar interno 1.9 μM .

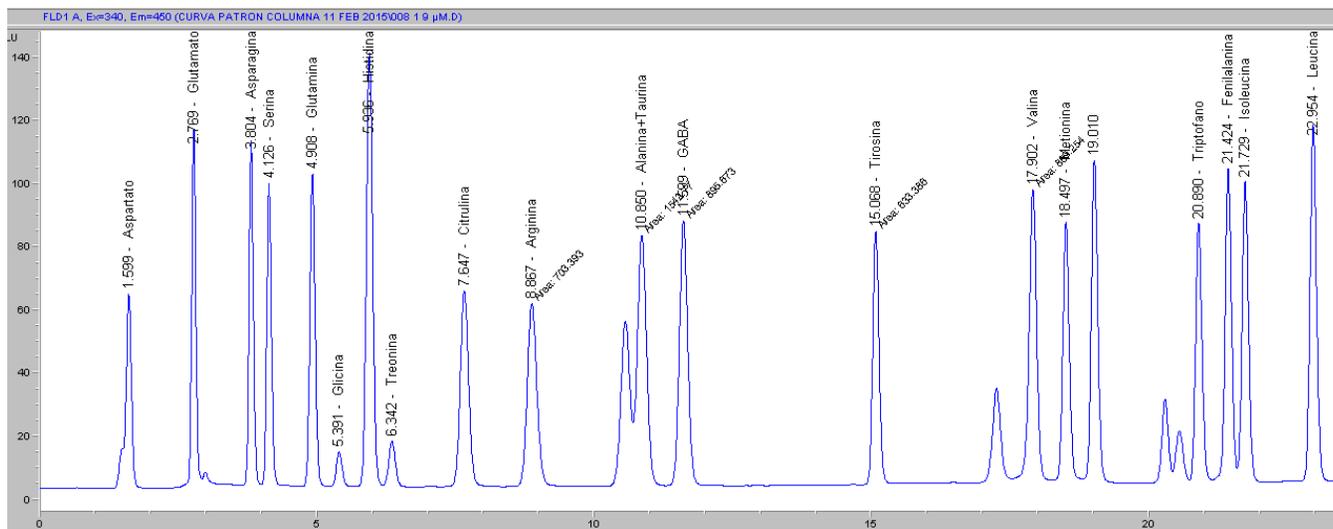


Figura 10. Cromatograma del estándar interno (1.9 μM).

6.13 Cálculo de los niveles de amino ácidos

Con el registro de la masa pesada de cada AA, su peso molecular, su pureza y el volumen de aforo, se calculó la concentración real de cada AA en cada dilución en unidades de $\mu\text{mol/Litro}$ (μM).

Ejemplo para calcular la concentración de aspartato:

Masa pesada: 0.0132 g
 Pureza: 99%
 Masa molar: 133.1 g/mol

$$\text{Masa real} = 0.0132 \text{ g} \left(\frac{99}{100} \right) = 0.0131 \text{ g}$$

Posteriormente se calculó la concentración de las diluciones en μM . Continuando con el ejemplo de aspartato a continuación se muestra un ejemplo:

$$(0.0131 \text{ g}) \left(\frac{1 \text{ mol}}{133.1 \text{ g}} \right) = 9.9173 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$\left(\frac{9.9173 \times 10^{-5} \text{ mol}}{10 \text{ ml}} \right) \left(\frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \right) = 0.0098 \text{ mol/L}$$

$$\left(\frac{0.0098 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 9842.224 \mu\text{mol/L}$$

Considerando que se tomaron 200µl de la solución de aspartato para preparar la solución stock con volumen final de 10 ml:

$$\left(\frac{9842.224 \mu\text{mol}}{1 L}\right) \left(\frac{200 \mu l}{10\ 000 \mu l}\right) = 196.84 \mu\text{mol/L}$$

Posteriormente se calculó la concentración de aspartato en la primera dilución:

$$(196.84 \mu M) \left(\frac{800}{880}\right) = 178.94 \mu\text{mol/L}$$

Consecutivamente se calcularon las demás diluciones de aspartato.

También en la misma hoja de Excel se transcribieron para cada AA las áreas que se obtuvieron en cada concentración de la curva de calibración. Para cada AA se establece un máximo y mínimo de áreas, considerando que en ese rango se encuentran las áreas de las muestras (tejidos y plasma).

A partir de las concentraciones conocidas en cada dilución (µM) y su área correspondiente se realizan modelos matemáticos. Debido a que cada AA presenta un comportamiento diferente que no necesariamente es lineal, se utiliza el modelo matemático que mejor describe su comportamiento. Para cada AA se realizaron los modelos matemáticos necesarios que cumplieran con un coeficiente lineal cercano a 1 y un error estándar cercano a 0.

Se utilizó el programa *Curve Expert 1.5* para determinar los modelos matemáticos necesarios (uno, dos o incluso tres modelos para un AA) para describir el comportamiento de cada AA. Para obtener una continuidad en la gráfica es necesario que entre un modelo y otro se traslape un mismo punto. Los modelos matemáticos utilizados fueron los siguientes: Linear Fit y Weibull. El programa nos proporciona la ecuación del modelo matemático, el valor de los coeficientes de la ecuación, coeficiente de correlación lineal, el error estándar y la gráfica del modelo.

De la ecuación del modelo matemático se despejó a la variable x, para calcular la concentración de las diluciones de la curva estándar. Para corroborar la eficiencia

del cálculo de la concentración con los modelos matemáticos se calculó el % error de la siguiente manera:

$$\%error = (concentración\ real - concentración\ calculada) / concentración\ real$$

Los modelos utilizados cumplen con la condición % error < 10.0.

En la figura 11 se muestra un ejemplo de los modelos matemáticos utilizados para la interpolación del AA L-Glutamina.

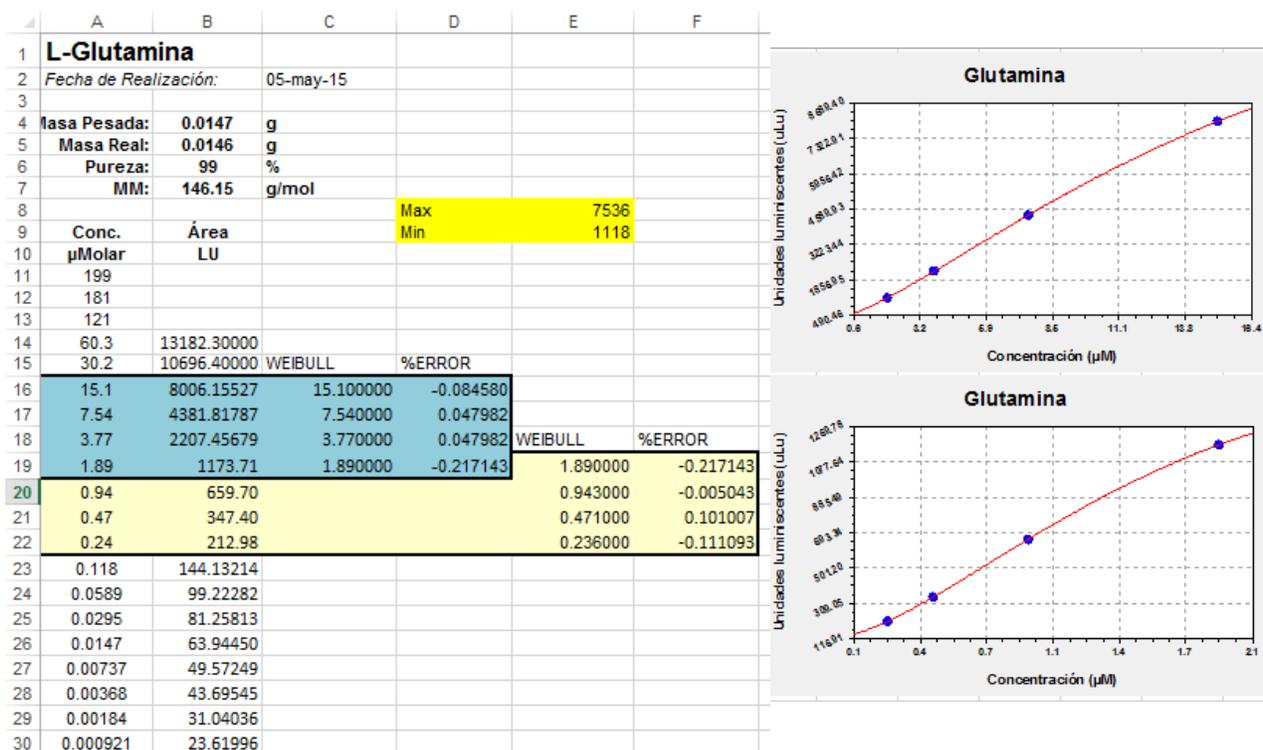


Figura 11. Modelos matemáticos de glutamina.

En una hoja de *Excel* se programó para cada AA una ecuación que contiene las fórmulas de los respectivos modelos matemáticos y se establecen los límites de las áreas y de las concentraciones para cada uno. A continuación se muestra un ejemplo: **Glutamina**

$$=SI(ESNUMERO(D561)=VERDADERO, SI(D561 < \$C\$581, "<0.24", SI(D561 <= \$D\$581, ((L(\$J\$581) - LN(\$I\$581 - D561)) / (\$K\$581)) ^ (1 / \$L\$581), SI(D561 <= \$D\$582, ((LN(\$J\$582) LN(\$I\$582 * D561)) / (\$K\$582)) ^ (1 / \$L\$582), ">15.1000")), SI(ESBLANCO(D561)=VERDADERO, "", D561))$$

La ecuación está ligada a una celda en donde, al insertar las áreas de las muestras problema, se calcula la concentración de cada AA porque utiliza el modelo matemático que mejor se ajusta al área dada.

Las concentraciones se obtuvieron en unidad μM y se hace un ajuste considerando las diluciones que se realizaron para la preparación de la muestra. Las concentraciones en plasma se reportan en unidad μM y para reportar las concentraciones en tejido (hipocampo y bulbo olfatorio) se ajustaron los μmol presentes en cada muestra entre los μg de proteína de la misma.

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo de la cuantificación en nmol de aspartato / mg de proteína en bulbo olfatorio, para la muestra que corresponde a la rata 1 del grupo AL.

Cantidad de proteína: $11.662 \mu\text{g}$ de proteína/ μl

Concentración: $182.7172 \mu\text{M}$

Puesto que para la cuantificación de proteínas se emplearon $3 \mu\text{l}$ de muestra y $97 \mu\text{l}$ de BCA.

$$\frac{11.662 \mu\text{g}/\mu\text{l}}{3\mu\text{l}} = 3.8873 \mu\text{g}$$

$$\left(\frac{3.8873 \mu\text{g}}{1 \mu\text{l}}\right) \left(\frac{10000 \mu\text{l}}{1 \text{ml}}\right) = 3887.33 \mu\text{g}/ \text{ml}$$

A partir de la curva de calibración se obtuvieron concentraciones μM , y como los bulbos olfatorios se almacenaron en 1ml de solución de Krebs Ringer, se hicieron los cálculos de la siguiente manera:

$$\left(\frac{182.7172 \mu\text{mol}}{1 \text{L}}\right) \left(\frac{1 \text{L}}{1000 \text{ml}}\right) = 0.18271 \mu\text{mol}/ \text{ml}$$

Por lo tanto hay $0.18271 \mu\text{mol}$ de aspartato / ml en la muestra AL-1.

Las muestras de tejido fueron normalizadas con su cantidad de proteína y para visualizar las gráficas, éstas se convirtieron a unidades de $\text{nmol}/ \mu\text{g}$.

$$\left(\frac{0.18271 \mu\text{mol}}{1 \text{ml}}\right) \left(\frac{1 \text{ml}}{3887.33 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000 \text{nmol}}{1 \mu\text{mol}}\right) = 47.0032 \text{nmol}/ \mu\text{g}$$

6.14 Validación del método analítico

La especificidad del método se comprobó por el análisis de tres blancos comparados contra el estándar inicial (ver figura 12), siguiendo el método de cuantificación AA AGILENT-INTEGRACION. Puesto que no se encontró interferencia de los cromatogramas de los blancos con ninguno de los picos de los AA del estándar, el método demostró ser específico para la identificación y la cuantificación simultánea de los AA.

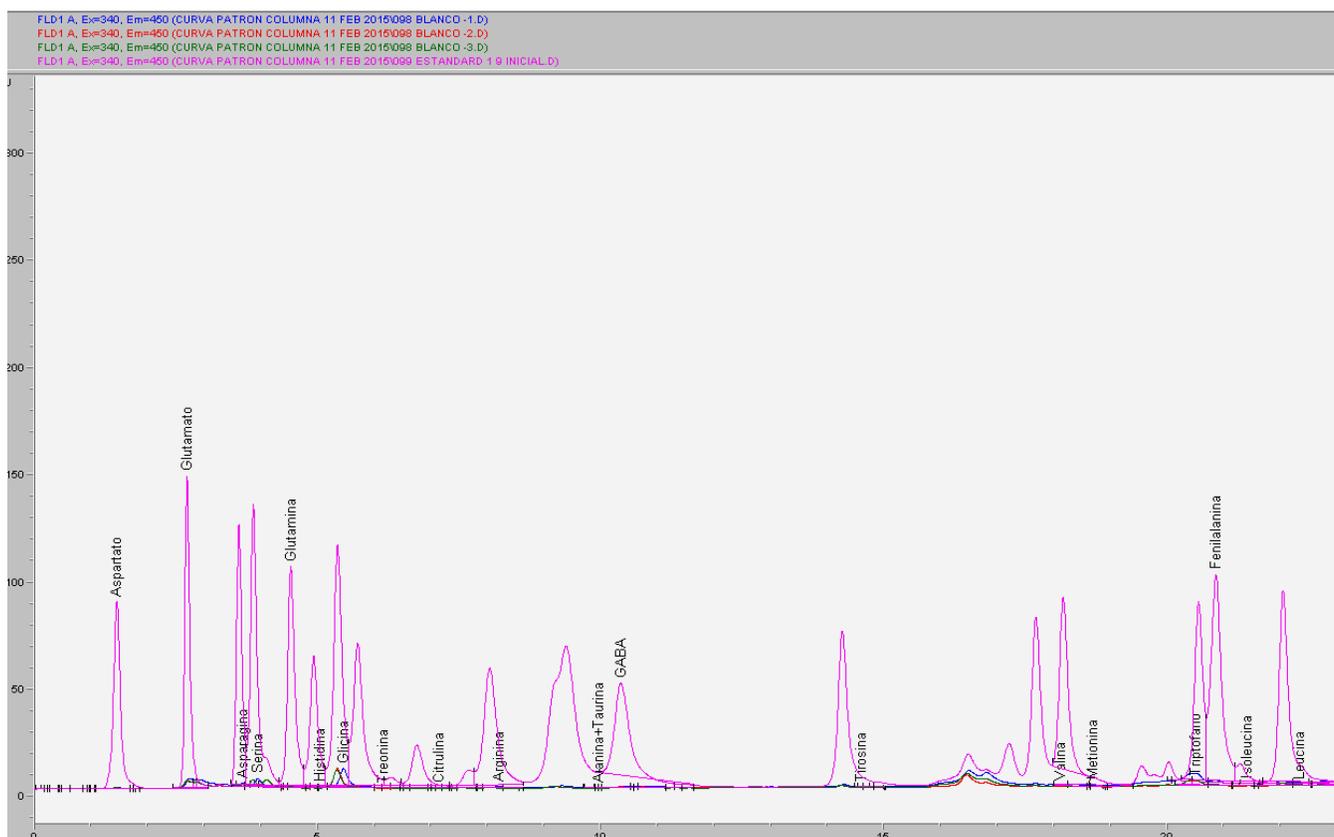


Figura 12. Cromatograma de los tres blancos y del estándar. Estándar (color rosa), blanco 1(color azul), blanco 2 (color rojo) y blanco 3 (color verde).

La linealidad del método se determinó mediante los modelos matemáticos que describen la curva de calibración para los amino ácidos: aspartato, glutamato, glutamina y GABA (ver tabla 7) con un coeficiente de correlación >0.90 . Para cada

modelo se consideró aceptable un % error < 10 (como se describió en la sección: cálculo de los niveles de amino ácidos).

Tabla 7. Modelos matemáticos con su coeficiente de correlación y error estándar.

Amino ácido	Modelos	Coeficiente de correlación	Error estándar
Ácido aspártico	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000
	MMF Model	1.0000	0.0000
Ácido glutámico	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000
Glutamina	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000
GABA	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Linear Fit	0.9999	4.3663
	Weibull Model	1.0000	0.0000
	Weibull Model	1.0000	0.0000

Mediante el análisis del estándar (1.9 μM) por triplicado, se evaluó la repetibilidad del método y se calculó el porcentaje del coeficiente de variación (% CV). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana-177 SSA1-1998, se consideró apropiado un CV < 3 % por ser una matriz biológica. A continuación se muestra el ejemplo de una corrida:

Tabla 8. Repetibilidad del método analítico. Se muestran la media (\bar{x}), la desviación típica (σ) y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV).

Amino ácido	Tiempo de retención	\bar{x}	σ	%CV
Aspartato	1.497	1.4986	2.0816x10 ³	0.1389
	1.501			
	1.498			
Glutamato	2.702	2.7043	2.0816x10 ³	0.0769
	2.706			
	2.705			
Glutamina	4.630	4.632	4.3588x10 ³	0.0941
	4.637			
	4.629			
GABA	10.801	10.7976	0.0123	0.1139
	10.808			
	10.784			

6.15 Análisis estadístico

Los datos se organizaron por grupo y las gráficas se presentan con \pm error medio. Utilizando el programa *GraphPad Prism 5* se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los resultados y compararlos con una distribución normal (tipo gaussiana). Para las muestras de hipocampo y bulbo olfatorio, el resultado de la prueba fue mayor a 0.05; es decir, los datos presentan un comportamiento normal. Por lo tanto, se realizó un análisis de varianza de una vía y adicionalmente se realizó un post test de Tukey para comparar todos los grupos, considerando una significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Algunas muestras de plasma no cumplieron la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, por esta razón se realizó el análisis de varianza de una vía, test Kruskal Wallis (no paramétrico) y un test de comparación múltiple de Dunn's, considerando una significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

7. RESULTADOS

7.1 Gráfica del peso de los animales

Para verificar si la restricción alimentaria podría tener un efecto en el peso corporal, se registró el peso de los grupos durante el tratamiento. A cada grupo se le midió su peso desde el día inicial (día 0) y cada 5 días hasta el día 20, que fue el periodo de tiempo que duró el modelo de RA (ver figura 13). En el día inicial, ambos grupos iniciaron con un peso similar sin presentar diferencia significativa entre sí. En el día 5, los animales sometidos a RA redujeron significativamente su peso corporal, siguiendo con esta tendencia para el día diez se observó que los animales sometidos con RA bajaron considerablemente su peso respecto al control, lo mismo sucede en el día 15 y 20.

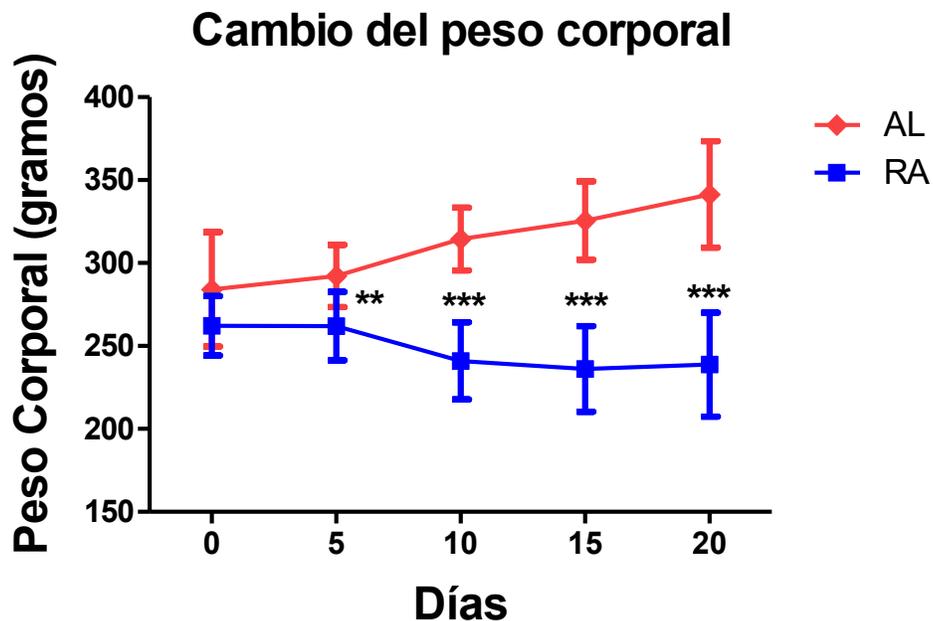


Figura 13. Efecto de la restricción alimentaria en el peso corporal de ratas Wistar. En el día 0, se inició el tratamiento; a partir de los días 5, 10 y 20 los pesos corporales en el grupo AL fueron significativamente superiores al grupo con RA. Los valores se muestran con promedio \pm desviación estándar ($n = 12$ ratas) prueba de t no pareada (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

7.2 Escala de Racine

Para identificar que los animales efectivamente entraron a un SE después de la administración de pilocarpina, los animales fueron observados continuamente, evaluando y registrando el tiempo en el que ocurrieron los cambios conductuales característicos de acuerdo con la escala de Racine. Se analizaron los datos mediante un test de t pareado, pero no hubo diferencias significativas (n=6).

A partir de la inyección de pilocarpina se registró la latencia, es decir el tiempo que transcurrió para que los animales presentaran los cambios conductuales que corresponden a las etapas II y III como son: movimientos masticatorios, salivación y asiente de cabeza (ver figura 14).

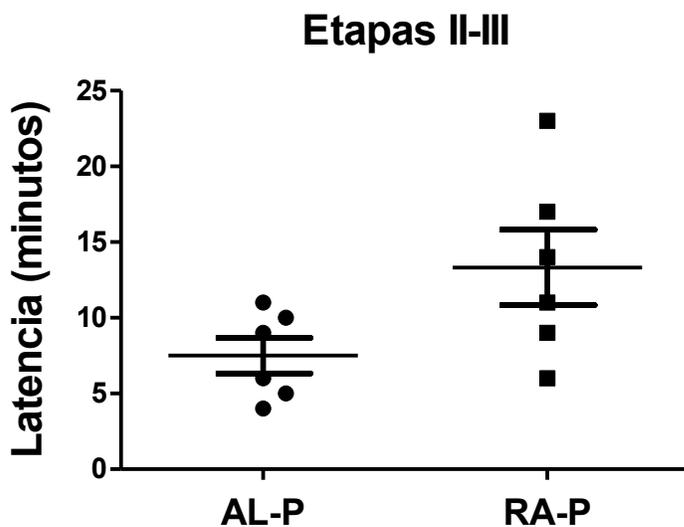


Figura 14. Minutos transcurridos a partir de la inyección de pilocarpina para que se presentaran los cambios conductuales de las etapas II y III de la escala de Racine. Se muestra la media \pm error medio, en ratas Wistar con dieta Ad libitum-pilocarpina (AL-P) y en restricción alimentaria-pilocarpina (RA-P).

Posteriormente se contó el número de veces que los animales manifestaron algún comportamiento de las etapas IV y V que son resultado de las crisis límbicas (ver figura 15). En estas etapas podemos observar crisis tónicas, clónicas y tónico-clónicas. Los cambios conductuales que los animales presentaron son sacudidas como perro mojado, clonus de miembros anteriores, posición de canguro y pérdida de postura corporal.

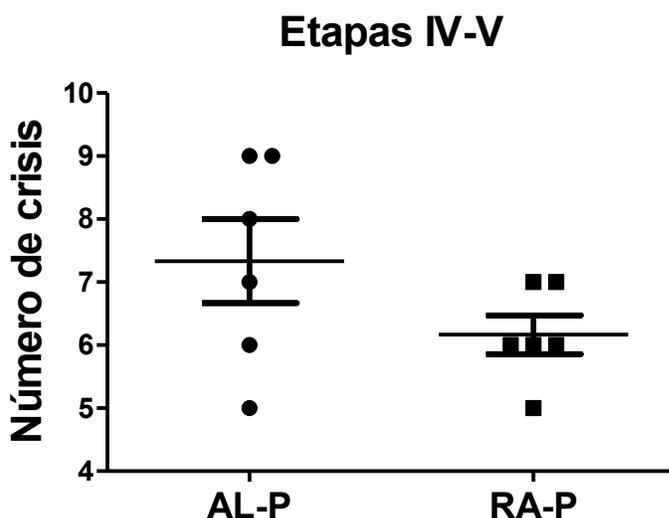


Figura 15. Número de veces que los animales expresaron cierto comportamiento de las etapas IV y V de la escala de Racine. Se muestra la media \pm error medio, los grupos Ad libitum- pilocarpina (AL-P) y restricción alimentaria- pilocarpina RA-P.

La pérdida de equilibrio de los animales representa una convulsión completa; sin embargo, para establecer que los animales entraron a un SE, se monitoreo que presentaran crisis continuas. Solo los animales que entraron en SE fueron considerados para la cuantificación de AA.

7.3 Curva estándar para la cuantificación de proteínas

Para reportar la cantidad de amino ácidos en las muestras de tejido cerebral fue necesario normalizar en función de la cantidad proteínas totales. Por esta razón, se realizó una curva de calibración (ver figura 16) para cuantificar proteínas totales mediante el método de ácido bicinónico, en la tabla 9 se muestra la regresión lineal y en la tabla 10 se presentan los parámetros A y B, error estándar e intervalos de confianza al 95%.

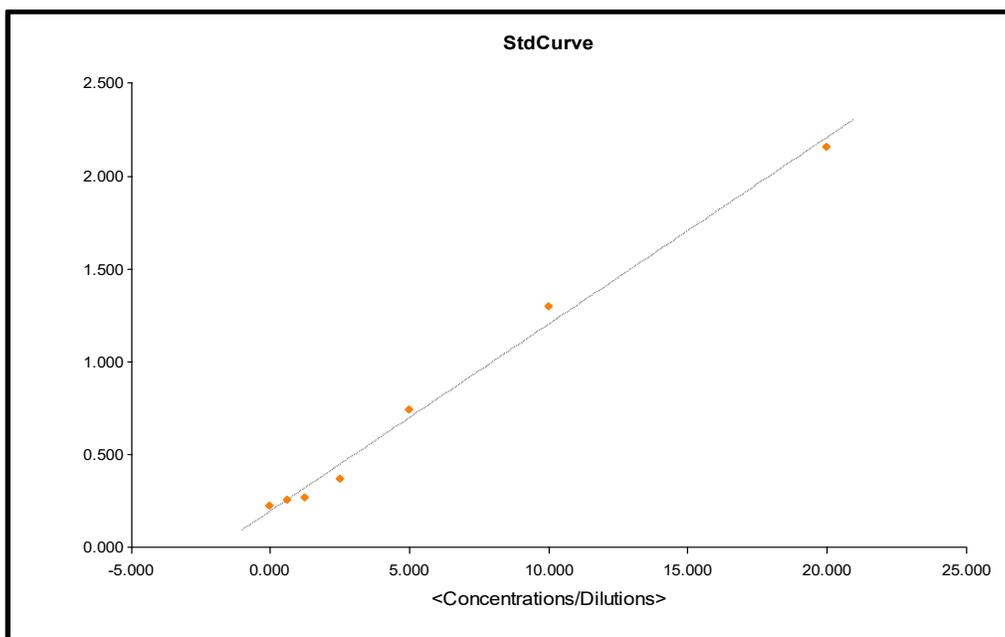


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas.

Tabla 9. Regresión lineal. Valor de A, B y de R^2 .

Curve Name	Curve Formula	A	B	R2
StdCurve	$Y=A*X+B$	0.101	0.193	0.993

Tabla 10. Valor de los parámetros A y B, error estándar e intervalos de confianza al 95%.

Curve Name	Curve Formula	Parameter	Value	Std. Error	95% CI min	95% CI max
StdCurve	$Y=A*X+B$	A	0.101	0.00381	0.0908	0.11
		B	0.193	0.0332	0.108	0.279

7.4 Hipocampo

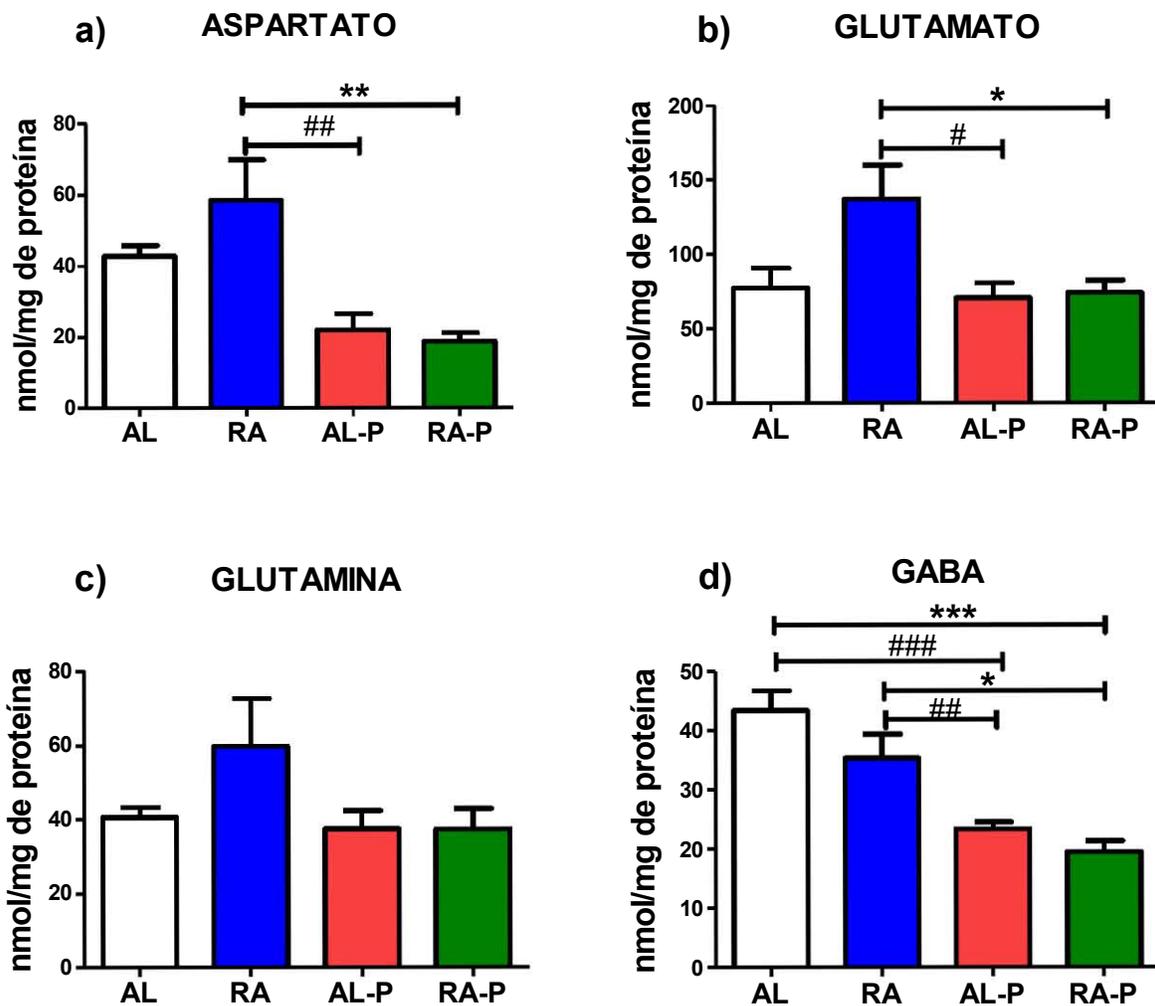
En homogenados de hipocampo se cuantificaron los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en los grupos experimentales: AL, RA, AL-P y RA-P. Aunque no se hallaron diferencias significativas entre los grupos AL y RA en ningún AA, en la Tabla 11 se observa una tendencia al incremento de los niveles de aspartato, glutamato y glutamina en los animales que fueron tratados con la dieta restrictiva (RA). En la gráfica del aminoácido aspartato (17a), el grupo de RA mostró un aumento significativo con respecto a la de los grupos AL-P y RA-P; este mismo comportamiento se puede ver en la gráfica de glutamato (17b) donde el nivel se elevó significativamente en el grupo RA en comparación con el de los grupos AL-P y RA-P. En el caso del aminoácido glutamina (gráfica 17c), no hubo diferencias significativas entre los grupos; sin embargo, se puede observar una tendencia a incrementar en el grupo RA, mientras que los grupos AL-P y RA-P muestran concentraciones semejantes al nivel del grupo AL. En la gráfica de GABA (17d), se encontró una disminución significativa de la concentración en los grupos AL-P y RA-P respecto a la del grupo AL y RA.

Tabla 11. Niveles de amino ácidos (nmol/mg de proteína) en homogenados de hipocampo.

	AL	RA	AL P	RA P
Aspartato	42.8225	58.4963	22.1091**	18.8192**
Glutamato	77.2315	137.0130	70.5938*	73.8660*
Glutamina	40.6239	59.8515	37.5134	37.4419
GABA	43.4494	35.3640	23.3936**, ###	19.5332*, ###

Significancia * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo RA; y ### $p < 0.001$ en comparación con el grupo AL.

Figura 17. Se muestran los niveles de a) aspartato, b) glutamato, c) glutamina y d) GABA en homogenados de hipocampo 24 horas después del *status epilepticus*. Los valores muestran \pm error medio (n=5), ANOVA de una vía y post hoc de Tukey (* p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001 respecto al grupo RA-P y # p<0.05, ## p<0.01 y ###p<0.001 respecto al grupo AL-P).



7.5 Bulbo olfatorio

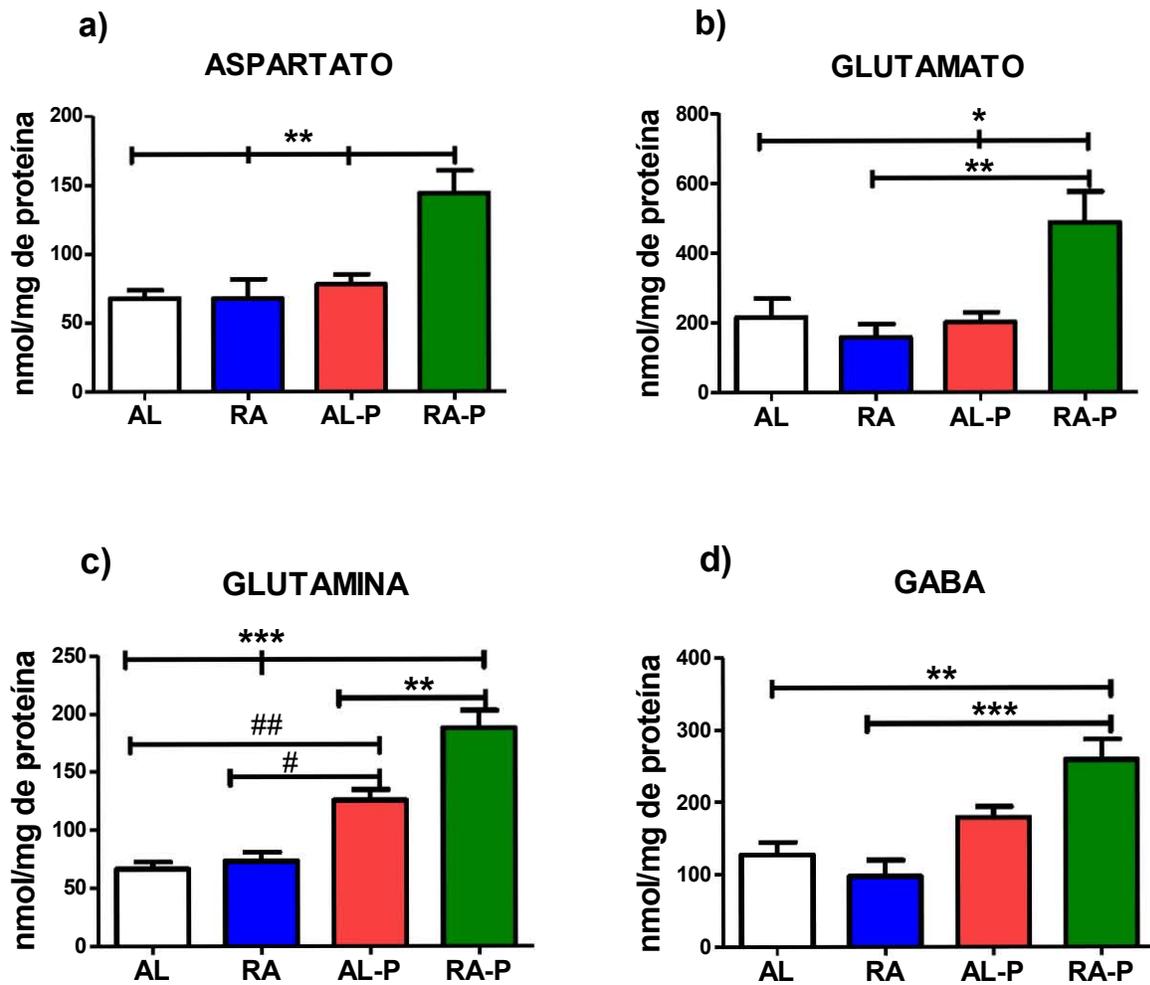
En homogenados de bulbo olfatorio se cuantificaron los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en los grupos experimentales: AL, RA, AL-P y RA-P. Como se observa en la tabla 12 no se hallaron diferencias significativas en los niveles de AA y GABA entre los grupos AL y RA. En la gráfica del aminoácido aspartato (18a), el grupo RA-P tuvo un aumento significativo respecto a los grupos AL, RA y AL-P. Los resultados de glutamato fueron similares a los de aspartato; en las gráficas 18a y 18b se observa un aumento significativo en el grupo de RA-P en comparación con el de los grupos AL, RA y ALP. En la gráfica del aminoácido glutamina (18c) hay incremento significativo en el grupo de RA-P respecto a los grupos AL, RA y ALP; el grupo AL-P también se encontró aumentado significativamente en comparación con el de los grupos AL y RA. Como se puede apreciar en la gráfica de GABA (18d), el nivel aumentó significativamente en el grupo de RA-P respecto a los grupos AL y RA.

Tabla 12. Niveles de amino ácidos (nmol/mg de proteína) en homogenados de bulbo olfatorio.

	AL	RA	AL P	RA P
Aspartato	68.0789	67.5032	78.0932	144.0210 **
Glutamato	215.6380	156.8450	200.7930	486.7480 *, **
Glutamina	66.5997	73.3690	125.8120 ##, ###	187.7590 *, **
GABA	127.9720	97.3554	179.0370	258.7920 **, ***

Significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo RA-P, y ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ en comparación con el grupo AL-P.

Figura 18. Se muestran los niveles de a) aspartato, b) glutamato, c) glutamina y d) GABA en homogenados de bulbo olfatorio 24 horas después del *status epilepticus*. Los valores muestran \pm error medio (n=5), ANOVA de una vía y pos hoc de Tukey (* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 respecto al grupo RA-P, y ## p<0.01, ###p<0.001 respecto al grupo AL-P).



7.6 Plasma

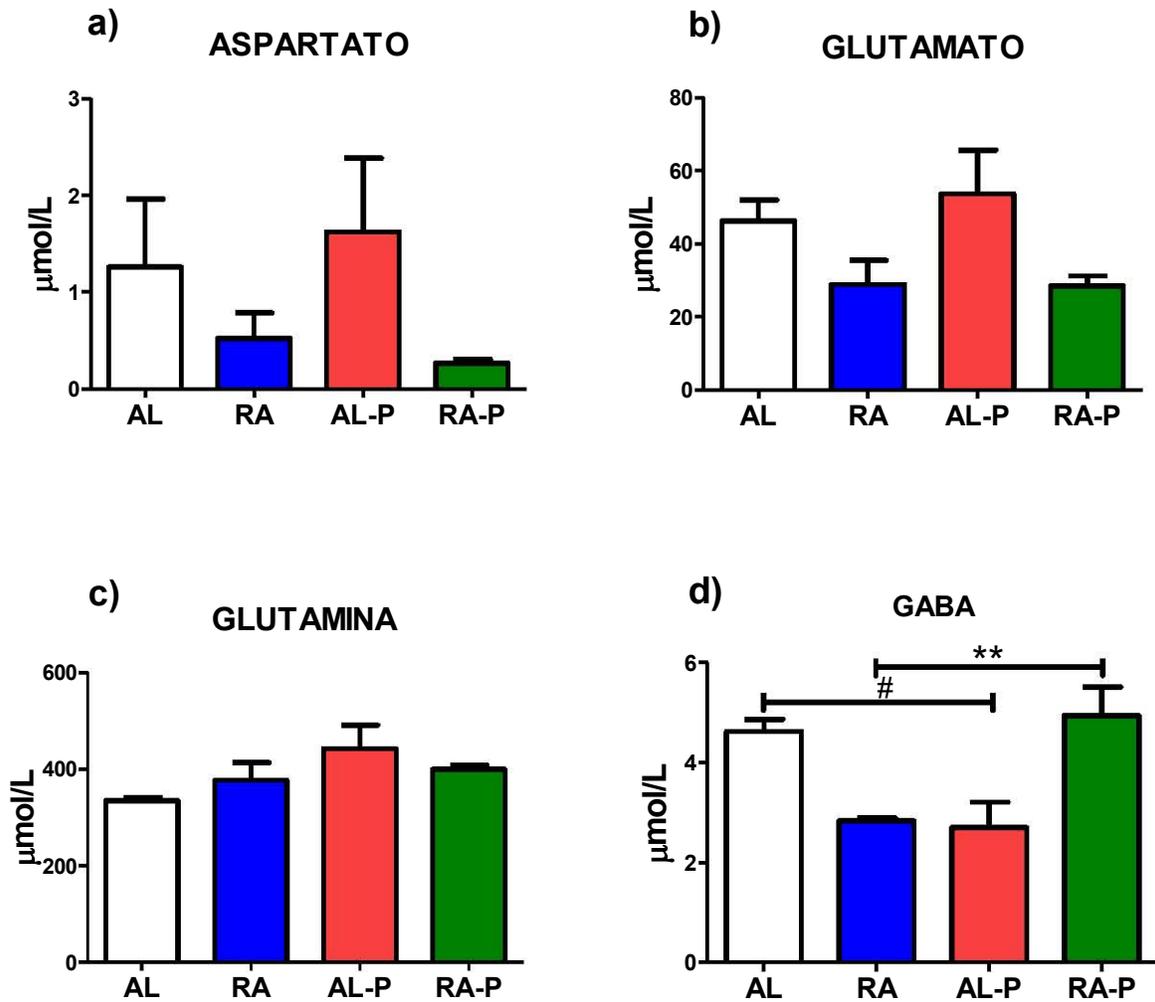
Se cuantificaron los niveles de GABA y de los amino ácidos: aspartato, glutamato y glutamina en plasma de los grupos experimentales: AL, RA, AL-P y RA-P. A pesar de que no se encontró ninguna diferencia significativa, en la tabla 13 se resumen los resultados, en donde se observa una tendencia de la dieta restrictiva (RA) *per se* a disminuir los niveles de Asp, Glu y GABA respecto al grupo con alimentación *Ad libitum*. De forma interesante se observa que el grupo RA-P también muestra una marcada disminución en aspartato, glutamato y GABA. En la gráfica del aminoácido aspartato (19a) se muestra la clara disminución en los grupos RA y RA-P respecto a la de los grupos AL y AL-P. En el caso del aminoácido glutamato (19b) se puede observar una disminución en el grupo RA respecto a la de los grupos AL y AL-P; en cambio, los niveles de glutamato no varían entre los grupos RA y RA-P. Para el AA glutamina en la gráfica (19c), se aprecia un ligero aumento en el grupo AL-P respecto a los grupos RAP; así como un incremento de glutamina en el grupo RA-P en comparación con el de los grupos AL y RA. En la gráfica (19d) se observa una disminución de GABA en AL-P respecto al grupo AL, en tanto que GABA incrementa en RA-P respecto al grupo RA.

Tabla 13. Niveles de amino ácidos ($\mu\text{mol/L}$) en plasma.

	AL	RA	AL P	RA P
Aspartato	1.2577	0.5222	1.6217	0.2640
Glutamato	46.2890	28.8513	53.6455	28.5078
Glutamina	334.6750	377.2960	443.4350	399.5540
GABA	4.6278	2.8314	2.6961 [#]	4.9366 ^{**}

Significancia [#]p<0.05 respecto a AL y ^{**}p<0.001 en comparación con RA-P.

Figura 19. Se muestran los niveles de a) aspartato, b) glutamato, c) glutamina y d) GABA en plasma 24 horas después del *status epilepticus*. Los valores muestran \pm error medio (n=5), ANOVA no paramétrica, test Kruskal Wallis y test de comparación múltiple de Dunn's, # p<0.05 y ** p<0.01.



8. DISCUSIÓN

Peso de los animales

En la figura 1 se observa el cambio en el peso de los animales durante el tiempo que se llevó a cabo la dieta restrictiva. En la gráfica se observa que al principio del protocolo no hay diferencia significativa, y a lo largo del experimento los animales del grupo AL muestran un aumento significativo de peso. Por su parte, los animales en RA, pierden peso significativamente en el día 5 y en los días posteriores comienzan a recuperarlo hasta mantener su peso. Registrar el peso de los animales de forma constante fue importante porque permitió saber que los animales en RA no pierden peso durante la dieta; la pérdida de peso sólo se observa al inicio de la restricción alimentaria, mientras se habitúan al ayuno. Estos resultados parecen concordar con los reportes de Landgrave y cols. (2016), quienes observaron que los animales en RA mantienen su peso; en contraste con otras dietas, como la DC (Gómez, et al.2016) y la RC (Redman, et al.2009) en las cuales el peso corporal tiende a disminuir.

Escala de Racine

El día 21 cuando se realizó el modelo de pilocarpina, también se evaluaron los cambios conductuales de los animales mediante la escala de Racine.

Después de la inyección de pilocarpina se evaluó la latencia es decir, los minutos transcurridos para que los animales presentaran cambios conductuales de las etapas II y III de la escala de Racine. A pesar de que no hubo diferencias significativas, en la gráfica 2 se puede observar que al grupo AL-P le tomó menos tiempo presentar cambios conductuales (7.5 minutos) en comparación con el grupo RA-P (13.3 minutos); éste grupo tardó casi el doble de tiempo. Posteriormente se contó el número de veces que los animales presentaron comportamientos de las etapas IV y V. A pesar de que no hubo diferencias significativas, en la gráfica 3 se puede observar que el grupo RA-P tiende a presentar un menor número de crisis mientras que el grupo AL-P presentó más crisis límbicas.

Estos resultados nos permiten suponer que la RA tiene un efecto en la disminución de la severidad de las crisis ya que los animales del grupo de RA-P presentan un aumento en la latencia de los cambios conductuales de la etapa II y III de la escala de Racine, también presentaron un menor número de veces cambios conductuales característicos de las etapas IV y V que corresponden a crisis límbicas.

En el modelo de litio-pilocarpina que está estandarizado en el laboratorio donde se realizó este trabajo, se considera que los animales entraron a un SE cuando el animal mantiene crisis recurrentes o continuas, por esta razón los animales fueron monitoreados después de la administración de la pilocarpina. Pareciera que la RA confiriera una resistencia tanto al inicio de las crisis como a la severidad de las mismas en el modelo de litio-pilocarpina. Al respecto, hay evidencia de que en la RA ocurren mecanismos como: la disminución de estrés oxidativo, alteraciones en el metabolismo energético que aumentan la concentración de metabolitos como el β -hidroxiacetato, que puede disminuir la actividad de proteínas capaces de alterar la estructura de la cromatina (HDACs) y de esta manera contribuir a un efecto antiepiléptico (Landgrave, et al., 2016).

Niveles de amino ácidos

De manera reciente, se ha descrito el comportamiento de algunos AA en diferentes regiones cerebrales durante el SE (duración aproximada de 5 a 6 horas) usando la técnica de microdiálisis (Walton et al., 1990). Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue realizar una cuantificación en tejido fresco total y conocer los posibles efectos de la RA, así como su repercusión en una fase aguda, tras inducir un SE con el modelo de litio-pilocarpina. Es importante resaltar el origen de la muestra ya que al hablar de homogenados de tejido total, se está incluyendo tanto el espacio extra celular así como el intra celular. Por lo que las comparaciones que se realizarán con estudios previos deben ser tomadas con precaución, ya que generalmente las mediciones de AA se han realizado en LCR y

en muestras de microdiálisis, generalmente en cursos temporales; cuando la epilepsia ya está bien establecida.

Hipocampo

En los homogenados de hipocampo de animales que se sometieron a la restricción alimentaria (RA), el nivel de aspartato (Asp) aumentó con respecto al grupo AL aunque no se observa una diferencia significativa. En un artículo publicado por Erecinska, et al., 1996, los autores sugieren que en una condición elevada de cetosis (5 mM) disminuyen los niveles de Asp a nivel intrasinaptosomal. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que Asp, glutamato y glutamina, aumentan en la RA. Este resultado podría explicarse en parte a: 1) que las cuantificaciones se están realizando en homogenados de tejido total, lo que representa las concentraciones tanto del espacio intracelular como del extracelular; 2) que en el modelo de RA, si bien no se alcanzan las mismas concentraciones de β -hidroxibutirato (0.88 mM, Landgrave, et al., 2016) que los niveles reportados en la dieta cetogénica (DC) (1.9 mM en la dieta cetogénica normocalórica y 2.6 mM en dieta cetogénica hipocalórica, Linard et al., 2010), una concentración sostenida de β -hidroxibutirato provee una cantidad suficiente para aumentar el metabolismo mitocondrial y el flujo de CAT incrementando los niveles de Glu y Gln; pero sin limitar la transaminación de glutamato a aspartato la cual depende de la cantidad de oxalacetato disponible, y por consiguiente, el nivel de Asp aumenta.

En el caso de GABA se observa una disminución en los grupos con pilocarpina respecto a los grupos AL y RA. El grupo de Soukupová y cols. en 2014, cuantificaron los niveles de GABA por microdiálisis durante el modelo de pilocarpina y observaron que GABA disminuye posterior al estado agudo del modelo. La disminución del contenido de GABA en tejido en los grupos AL-P y RA-P puede ser producto del daño que el insulto epileptogénico tiene sobre las neuronas gabaérgicas desde una fase aguda.

La cuantificación de Asp y GABA es muy similar entre los grupos. Se sabe que las concentraciones de aspartato son mayores en el citosol de neuronas gabaérgicas pero aún se desconoce cómo es liberado de este compartimento bajo condiciones fisiológicas y menos aún en condiciones patológicas (Brady, et al., 2012). Para el caso de glutamina (Gln), en el grupo de RA, se observa una mayor cantidad (59.8515 nmol/mg de proteína) en comparación con el grupo AL (40.6239 nmol/mg de proteína); este incremento podría deberse a un aumento de su síntesis en las células gliales, en especial en los astrocitos. Estudios recientes utilizando la RC, sugieren que esta dieta es capaz de modular funciones astrocíticas mediante el aumento en la recaptura de Glu y el incremento de la actividad de la glutamina sintasa (GS) (Ribeiro et al., 2009). Dado que la Gln es un precursor eficiente de GABA, su aumento podría tener un efecto benéfico; sin embargo, para discernir este resultado se necesitaría aumentar el número de animales y evaluar la actividad de GS.

En la actualidad, es controversial si el aumento de los cuerpos cetónicos produce un incremento de GABA. Estudios en sinaptosomas han demostrado un incremento en las concentraciones de GABA después de una exposición a acetoacetato (5mM) (Erecinska et al., 1996), pero no observamos esta respuesta en la cuantificación de GABA en este trabajo. Yudkoff y cols. (2005) describieron el metabolismo de AA en ratones sometidos a DC por tres días: la medición se llevó a cabo en homogenados de cerebro total, y aunque no se encontraron cambios significativos en los niveles de Glu, Gln y GABA sí hallaron una disminución significativa de Asp en el corteza frontal. En el mismo estudio, cuando administraron acetato marcado con Carbono¹³ se observó un incremento de los niveles de Glu y Gln; este comportamiento es similar a nuestros resultados aunque el aumento en la RA no es significativo. En un tercer experimento, al administrar de manera conjunta acetato con leucina observaron que los niveles de Gln y GABA aumentaron. Los estudios sobre el metabolismo del ciclo de CAT de Waagepetersen y cols. (2000) sugieren que altas concentraciones de oxalacetato en presencia de altos niveles circulantes de ciertos amino ácidos como la leucina y la alanina, elevan las concentraciones de glutamato, glutamina y GABA en el

cerebro; en cambio durante la cetosis no solo se requiere una alta disposición de acetato sino también una disposición de donadores de grupos amino, para incrementar la síntesis de glutamato, glutamina y GABA (Hartman y Stafstrom, 2013, Yudkoff, et al., 2005).

Además, un estudio utilizando RC en animales durante siete días describió un aumento del mRNA de GAD67 significativamente mayor en la corteza cerebelosa y en estructuras del cerebro medio, en comparación con las del control (Cheng et al., 2004). Estas regiones cerebrales están poco relacionadas con la generación de las crisis; sin embargo, se podría medir la actividad de GAD67 en nuestro modelo para evidenciar cambios relacionados con la síntesis de GABA en el modelo de RA.

Los resultados de la presente tesis no sugieren que la RA eleve los niveles de GABA en hipocampo; no obstante, quizá el efecto antiepiléptico no se deba a un aumento en el nivel de GABA o al incremento en su síntesis sino que puede estar relacionado con otros mecanismos. Hay que considerar que la cuantificación de AA en tejido total no es un índice de la actividad sináptica, lo que tampoco permite conocer si los cambios se deben a la actividad glial o neuronal, por esta razón, estos resultados deben tomarse con cautela

La hipótesis de que la DC, RC y RA tengan mecanismos similares no debe asumirse. Existen estudios que demuestran que dependiendo del régimen de alimentación se obtiene una respuesta diferente a diversos tests de crisis epilépticas, lo que indica que éstas podrían actuar por mecanismos diferentes y tener similitudes en otros procesos (Hartman, et al., 2010).

Bulbo olfatorio

Se han descrito las alteraciones neuroconductuales de ratas macho Wistar durante las fases avanzadas en el modelo de pilocarpina, las cuales probaron que

se presenta una interrupción en la capacidad de la discriminación olfativa a los siete días post-SE y se conserva después de 55 días (Lopes et al., 2016).

En el modelo de pilocarpina también se reportó daño en la corteza olfativa 24h posterior al SE (post-SE) (Tursky et al., 1983), que puede estar asociado al deterioro olfativo. Al respecto, no se ha evaluado el daño en el bulbo olfatorio (BO) post-SE para conocer si existe alguna alteración neuronal.

Apelbaum y Chaput (2003) demostraron que una RA durante 15 días indujo una disminución drástica y no específica en la reactividad de células mitrales/tufted (M/T) en BO. En este estudio, el grupo de ratas con alimentación AL durante 14 días más un único ayuno de 22 horas, presentó una reactividad mayor que la del grupo en RA durante 15 días y a su vez, la reactividad en el grupo de RA fue mayor respecto al grupo *Ad Libitum*. Estos resultados pueden asociarse con la plasticidad del BO a generar cambios del estado interno debido a un cambio ambiental prolongado; en este caso la restricción alimentaria (RA). También el sistema olfativo está relacionado con el sistema endocrino: puede servir como un sensor interno del estado químico o del equilibrio nutricional (Paulignan, et al., 2012), el segundo influye en la detección de un olor. En los resultados de la presente tesis se observa que la RA tiende a reducir los niveles de Glu un 27.26% y los de GABA un 23.92%, en comparación con los del grupo AL en BO; este descenso puede ser producto de un cambio en la reactividad de células M/T que altere el metabolismo de Glu y GABA en el BO.

Como se observa en los resultados de la presente tesis, en el grupo AL-P se elevaron significativamente los niveles de Gln en un 88.9%; es probable que en consecuencia se incremente ligeramente el nivel de GABA en un 39.9% sin significancia en el grupo AL-P. Este aumento de Gln puede deberse a un incremento en la síntesis glial; es decir, el exceso de Glu capturado es convertido a Gln y posteriormente se libera pasivamente. Otra hipótesis sería que el BO tenga una respuesta más lenta en comparación con la del hipocampo, debido a que en el BO exista una menor cantidad de células gliales (particularmente los astrocitos) que contribuyen a mantener la homeostasis. En este sentido se podrían

realizar cortes histológicos para comparar la cantidad de astrocitos en BO e hipocampo.

Los resultados de la presente tesis, muestran un aumento de los niveles de Asp, Glu, Gln y GABA en el grupo de RAP que sugieren una regulación ineficiente y/o una síntesis exagerada del metabolismo de GABA-Glu. Este fenómeno no se observa en las cuantificaciones de los grupos RA y AL-P, solo cuando la RA se asocia a la inducción del SE (RA-P). Debido a que no existen reportes del efecto de dietas restrictivas en el BO, no es posible hacer una discusión objetiva de los resultados obtenidos en el mismo. Tampoco existen reportes de la cuantificación de AA en el BO en un modelo animal de SE, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser el antecedente para investigar más a fondo esta estructura y su relación con las crisis epilépticas.

Plasma

La ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) se ha observado en humanos y en estudios animales posterior a la aparición de crisis agudas (van Vliet et al., 2007). Al afectarse la permeabilidad de la BHE, la cuantificación de AA en plasma puede ser un indicador de los cambios neuroquímicos que ocurren en el cerebro.

En los grupos RA-P se puede observar que los niveles de Asp, Glu y Gln se mantienen en niveles similares a los de la RA; es decir, que la RA en un insulto agudo (SE) podría modular los niveles periféricos de estos AA. Los resultados de plasma muestran un comportamiento similar del Asp y el Glu entre el grupo AL con el grupo AL-P; asimismo, entre el grupo RA con RA-P, con la diferencia que en los grupos con restricción, las cuantificaciones se reducen aproximadamente a la mitad respecto a los grupos *ad libitum*.

El grupo de RA presentó ligeros cambios en las concentraciones de AA libres en comparación con los del grupo AL; las diferencias pueden ser el resultado de la ingesta de alimentos bajo la RA. Asp, Glu y Gln son amino ácidos no esenciales

cuya síntesis depende de los amino ácidos esenciales que provienen de la dieta; puesto que sus concentraciones no se ven afectadas significativamente podemos decir que la RA no altera sus concentraciones a nivel periférico.

En este sentido, en el laboratorio se investiga la cuantificación de AA en pacientes con ELT donde se demostró un aumento significativo de Asp y Glu mientras que las concentraciones de Gln disminuyeron (datos sin publicar). Los resultados en el modelo animal mostraron en el grupo AL-P un ligero aumento de Asp, Glu y Gln que puede asociarse a la inducción del SE. Los resultados de los pacientes con ELT correlacionan con la tendencia al aumento de Asp y Glu en el modelo animal, mientras que los resultados de Gln en el modelo animal no presentan cambios durante la fase aguda. Es probable que los cambios observados en el modelo animal (fase aguda) sean significativos en la fase crónica, puesto que conforme la enfermedad transcurre el deterioro de la permeabilidad de la BHE se incrementa (van Vliet et al., 2007). Respecto a la Gln no se ven cambios entre los cuatro grupos; la principal función de la Gln es mantener la homeostasis de nitrógeno, por lo cual su nivel es más estable.

En el grupo AL-P disminuyó el nivel de GABA en comparación con el grupo AL; de forma contraria, GABA aumentó en RA-P respecto a la RA; este resultado podría estar asociado al efecto de la RA y la respuesta a un insulto agudo. En la epilepsia hay presencia de inflamación y en consecuencia activación del sistema inmune innato que posteriormente contribuye al daño celular (Walker y J.Sills, 2012). Actualmente se sabe que GABA a nivel periférico tiene una función fisiológica en la inflamación; al respecto se ha descrito que las células del sistema inmune pueden sintetizar y metabolizar GABA, expresar transportadores, canales GABA-A y el receptor GABA-B (Jin et al., 2013). Por otra parte, estudios han demostrado que la RC inhibe la respuesta inflamatoria y mejora la respuesta inmune mediada por células T, tanto en modelos animales como en humanos (Wang et al., 2013; Ahmed et al., 2009). Es posible que también en la RA la respuesta al SE induzca una rápida activación de las células del sistema inmune y por esta razón se incrementa la concentración de GABA en plasma. Por lo que es necesario

investigar más sobre el efecto de la RA en los mecanismos de la inflamación y su asociación a la respuesta inmune.

Los resultados de este trabajo muestran diferencias en los niveles de Asp, Glu, Gln y GABA, así como en su comportamiento entre el hipocampo y el bulbo olfatorio. Las diferencias encontradas pueden deberse a que el hipocampo posee una neurotransmisión principalmente colinérgica, mientras que el bulbo olfatorio tiene una neurotransmisión glutamatérgica-gabaérgica. Además, se desconoce si la RA modifica otros neurotransmisores involucrados en la sinapsis del hipocampo y el bulbo olfatorio que podrían estar relacionados con los cambios observados. El comportamiento de los AA parece ser compartimentalizado; ya que no se observa un comportamiento semejante entre el hipocampo y el bulbo olfatorio, a su vez, sus resultados son diferentes a los del plasma. Es posible que los cambios bioquímicos que la RA genera a nivel central y periférico sean diferentes; por ejemplo, se ha descrito que los cuerpos cetónicos tienen un efecto diferente de acuerdo al tejido en que actúan (cerebro, hígado y músculo) (Paoli, et al., 2015).

9. CONCLUSIONES

En el hipocampo del grupo bajo restricción alimentaria mostró una tendencia a aumento en los niveles de aspartato, glutamato y glutamina con respecto al grupo *ad libitum*, contrario a lo esperado, no se observó un incremento en el nivel de GABA; mientras que en el grupo de restricción alimentaria con pilocarpina, se encontró una disminución de GABA similar al descenso de GABA observado en el grupo *ad libitum* con pilocarpina.

En el bulbo olfatorio del grupo con restricción alimentaria, se observó una tendencia en la disminución de los niveles de glutamato y GABA con respecto al grupo *ad libitum*, en tanto que la restricción alimentaria con pilocarpina mostró un aumento significativo de los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA 24 horas posteriores al SE, comparado con los grupos de restricción alimentaria y *ad libitum*. Esta respuesta no se encontró en el grupo *ad libitum* con pilocarpina por lo cual, es necesario investigar más sobre los efectos metabólicos de la restricción alimentaria en el bulbo olfatorio.

En el plasma, los animales con restricción alimentaria presentaron una tendencia a disminuir los niveles de aspartato, glutamato y GABA comparados con el grupo *ad libitum*, y para el caso del grupo con restricción alimentaria con pilocarpina, se mantuvieron bajos los niveles de aspartato y glutamato. Estos resultados nos hacen suponer que el insulto agudo causado por la pilocarpina no parece modificar estos niveles a diferencia del grupo *ad libitum* con pilocarpina en el cual aspartato y glutamato tienden a aumentar, ambos grupos comparados con el grupo de restricción alimentaria.

En el grupo *ad libitum* con pilocarpina, el nivel de GABA disminuyó comparado al grupo *ad libitum*, mientras que en el grupo de restricción alimentaria con pilocarpina el nivel de GABA incrementó comparado con el grupo de restricción alimentaria. Este es un resultado opuesto al de aspartato, glutamato y glutamina en plasma en el grupo con restricción alimentaria con pilocarpina; además este cambio es diferente a lo esperado y a lo publicado, por lo que podría estar

relacionado a un posible efecto de la restricción alimentaria que se potencia posterior al insulto agudo generado por la administración de la pilocarpina.

La evaluación de la severidad de las crisis mostró en el grupo de restricción alimentaria con pilocarpina, una tendencia a incrementar la latencia y a disminuir el número de crisis límbicas en comparación con el grupo *ad libitum*; no obstante, debido a que el comportamiento de los amino ácidos fue diferente en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma, no fue posible correlacionar la severidad de la crisis con los niveles de amino ácidos de las ratas Wistar en restricción alimentaria con pilocarpina.

10.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos no permiten concluir que la disminución de la severidad de las crisis en los animales con restricción alimentaria esté relacionada a cambios en los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA. Es importante investigar los cambios de la restricción alimentaria con pilocarpina en un curso temporal, por ejemplo a las 3, 8 y 12 horas posteriores al SE para explicar los cambios en los niveles de aspartato, glutamato, glutamina y GABA en hipocampo, bulbo olfatorio y plasma, durante la fase aguda. Para poder indagar sobre el posible efecto benéfico de la glutamina y de GABA en la restricción alimentaria es necesario medir la actividad de GAD67 y GS, en hipocampo y bulbo olfatorio.

En cuanto a los resultados de plasma para explicar el incremento del nivel de GABA en la restricción alimentaria con pilocarpina se necesita diseñar un protocolo que compruebe la repetitividad de éste resultado y posteriormente indagar un posible mecanismo. También hay que cuantificar otros AA libres como la leucina y alanina que participan de forma indirecta en el metabolismo neuronal de los amino ácidos, para conocer su contribución en el ciclo de glutamato/GABA-glutamina en la restricción alimentaria. En el contexto de las dietas restrictivas los niveles de amino ácidos libres como la glutamina y la leucina, pueden modular la actividad de la autofagia en el cerebro; éste es otro posible mecanismo donde los niveles de amino ácidos podrían estar involucrados con un efecto benéfico en la RA.

11. BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies Inc, (2007). Manual de operaciones, Estados Unidos de América, p. 20.

Ahmed, T., Das, S. K., Golden, J. K., et al., (2009). Calorie restriction enhances T-cell-mediated immune response in adult overweight men and women. *Journal of Gerontology*, 1107-1113.

Apelbaum, A., y Chaput, M. (2003). Rats Habituated to Chronic Feeding Restriction Show a Smaller Increase in Olfactory Bulb Reactivity Compared to Newly Fasted Rats. *Chemistry Senses*, 28: 389–395.

Bak, L., Schousboe, A. y Waagepetersen, H. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 641-653.

Bellet, M. y Sassone, C. (2010). Mammalian circadian clock and metabolism—the epigenetic link. *Journal of Cell Science*, 123, 3837-3848.

Berg, T., Berkovic, F. y Brodie, J. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, 51(4):676–685.

Boeree, G. (2002). Ilustración del sistema límbico. (Figura 1). Obtenido de <http://webpace.ship.edu/cgboer/limbicsystem.html>

Bradford, H. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in Neurobiology*, 477-511.

Brady, S., Siegel, G., Albers, R. y Price, D. (2012). Intercellular Signaling. In B. Hassel, & R. Dingledine, *Basic Neurochemistry, Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology* (8 ed., p. 346). Elsevier Inc.

Cabo-de la Vega, C., Villanueva, P., Prieto, A. et al., (2006). Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Revista de neurología*, 159-168.

Carlson, H., Ronne-Engstrom, E., Ungersted, U. et al., (1992). Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. Elsevier, 30-32.

Carroll, B., Richardson, J., Thompson, P. et al., (1993). Olfactory information processing and temporal lobe epilepsy. Brain and cognition, 230-243.

Cavalheiro, E. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. The Italian journal of neurological sciences, 33-37.

Cheng, C. M., Hicks, K. y Wang, J. (2004). Caloric Restriction Augments Brain Glutamic Acid Decarboxylase-65 and -67 Expression. Journal of Neuroscience Research, 77:270–276.

Contestabile, A., Ciani, E. y Contestabile, A. (2004). Dietary restriction differentially protects from neurodegeneration in animal models of excitotoxicity. Brain Research, 162–166.

Daikhin, Y. y Yudkoff, M. (1998). Ketone Bodies and Brain Glutamate and GABA Metabolism. Developmental Neuroscience, 20:358–364.

Dalby, N. y Mody, I. (2001). The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. Current Opinion in Neurology, 187-192.

Desai, M., Agadi, J., Karthik, N. et al. (2015). Olfactory abnormalities in temporal lobe epilepsy. Journal of Clinical Neuroscience, 1-5.

Didier, A., Carleton, A., Bjaalie, J. et al., (2001). A dendrodendritic reciprocal synapse provides a recurrent excitatory connection in the olfactory bulb. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 6441-6446.

During, M. y Spencer, D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. The Lancet, 1607-1610.

Epilepsy, International League Against. (1993). Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Epilepsia, 34(4):592-596.

Erecinska, M., Nelson, D. y Daikhin, Y. (1996). Regulation of GABA Level in Rat Brain Synaptosomes: Fluxes Through Enzymes of the GABA Shunt and Effects of Glutamate, Calcium, and Ketone Bodies. *Journal of Neurochemistry*, 2325-2334.

Erecinska, M., Nelson, D., Daikhin, Y. y Yudkoff, M. (1996). Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium and ketone bodies. *J Neurochem*, 67:2325–2334.

Escobar, C., Díaz, M., Encinas, F. et al., (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Regulatory, integrative and comparative physiology*, 1309-1316.

Falconer, M. (1974). Mesial temporal (Ammon's Horn) sclerosis as a common cause of epilepsy: etiology, treatment, and prevention. *The Lancet*, 767-770.

Fisher, R., Acevedo, C., Arzimanoglou, A. et al., (2014). A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 475-482.

Fisher, R., Emde, W., Blume, W. et al., (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 470-472.

Fleck, M., Henze, D., Barrionuevo, G. et al., (1993). Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience*, 3944-3955.

Freeman M, J., Vining, P. E., Pillas, J. D. et al., (1998). The efficacy of the ketogenic diet—1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*, 1358-1363.

Freeman, J. M., Freeman, J. y Kelly, M. (2000). *The ketogenic diet: a treatment for epilepsy*. Demos, New York., 3rd Edition, p. 236.

French, J. (2007). Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia*, 3-7.

Garcia, G., Garcia, M. y Matías, G. (2010). Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología*, 181-188.

Gomez, D., Bellido, D., Castro, A.I, et al. (2016). Body composition changes after very low-calorie-ketogenic diet in obesity evaluated by three standardized methods. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1-12.

Hartman, AL., Zheng, X. y Bergbower, E. (2010). Seizure tests distinguish intermittent fasting from the ketogenic diet. *Epilepsia*, 51(8):1395–1402.

Hartman, AL. y Stafstrom, CE. (2013). Harnessing the power of metabolism for seizure prevention: Focus on dietary treatments. *Epilepsy & Behavior*, 266–272.

Hummel, T., Henkel, S., Negoias, S. et al., (2013). Olfactory bulb volume in patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurology*, 1004-1008.

Huxtable, R., Laird, H., Lippincott, S. et. al. (1983). Epilepsy and the concentrations of plasma. *Neurochemistry International*, 125-135.

Ingmar, B., Thom, M., Aronica, E. et al., (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 1-15.

International League Against Epilepsy. International League Against Epilepsy. Consultado el 13-11-2015, en <http://www.ilae.org/commission/medther/keto-basics.cfm>

Jin, Z., Kumar, S. y Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids*, 87-94.

Kiernan, J. (2012). Anatomy of the temporal lobe. *Epilepsy Research and Treatment*, 1-12.

Koehler-Stec, E., Simpson, I., Vannucci, S. et al., (1998). Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *Endocrinology and metabolism*, 516-524.

Kohler, C., Moberg, J., Gur, E. et al., (2001). Olfactory Dysfunction in Schizophrenia and Temporal Lobe Epilepsy. *Neuropsychiatry, Neuropsychology, and Behavioral Neurology*, 83-88.

Kozák, N. y Csiba, L. (2007). Dietary aspects of epilepsy. *europemc.org*, 60(5-6):234-8.

Kumar, S., Rani, E., Waheed, A. et al., (2015). Pharmacoresistant epilepsy: a current update on non-conventional pharmacological and non-pharmacological interventions. *Journal of Epilepsy Research*, 1-8.

Kwan, P., Schachter, S. y Brodie, M. (2011). Drug resistant epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 919-26.

Landgrave, J., Mercado, O., Vázquez M., et al., (2016). Anticonvulsant effect of time-restricted feeding in a pilocarpine-induced seizure model: metabolic and epigenetic implications. *Frontiers in cellular neuroscience*, 1-12.

Linard, B., Ferrandon, A., Koning, E., Nehlig, A. y Raffo, E. (2010). Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsy*, 1829-1836.

Lopes, M. W., Lopes, S. C., y I Santos, D. B. (2016). Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 92–100.

López-Meraz, M. L., Rocha, L. y Miquel, M. (2009). Conceptos básicos de la epilepsia. *Revista Médica de la Universidad de Veracruz*, 31-37.

M. Buha, S., Panchal, A. y Panchal, H. (Vol. 49, February 2011). HPLC–FLD for the Simultaneous Determination of Primary and Secondary Amino Acids from Complex Biological Sample by Pre-column Derivatization. *Journal of Chromatographic Science*, 119-123.

Majoresa, M., Eils, J., Wiestlera, O. et al., (2004). Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data from human tissue samples and animal models. *Epilepsy Research*, 173–178.

Marinhoa, M., Sousab, F., Bruinc, V. et al., (1998). Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochemistry International*, 299-306.

Meldrum, B. (1991). Neurochemical substrates of ictal behavior. *Advances in Neurology*, 35-45.

Meldrum, B. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The journal of nutrition*, 1007-1015.

Melo TM, N. A. (2005). Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a 13 C NMR study of neuronal-glia interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25: 1254-12.

Organization, World Health. (2005). Atlas epilepsy care in the world. In World Health Organization, Executive summary (p. 8). Switzerland: World Health Organization.

Oroquieta, J., Arellano, J., Alonso, L. et al., (2002). Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales. Simposio I: Avances en la fisiopatología de la epileptogénesis (pp. 401-408). Bilbao: Revista de Neurología.

Pablos S, T., Oliveros L, L., Núñez E, N. et al., (2014). Experiencia en el tratamiento con dieta cetogénica de la epilepsia refractaria en la edad pediátrica. *Revista Neurología*, 58 (2): 55-62.

Pani, G. (2015). Neuroprotective effects of dietary restriction: evidence and mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 106-114.

Paoli, A., Bosco, G., M. Camporesi, E. y Mangar, D. (2015). Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. *Frontiers in Psychology*, 1-9.

Paulignan, B. P., Lacroix, M.-C. y Aimé, P. (2012). Olfaction Under Metabolic Influences. *Chemistry Senses*, 37: 769–797.

Pedrón, G. C. (2009). Epilepsia y alimentación. Dietas cetogénicas. *Nutrición Hospitalaria, Suplementos*, 79-88.

Petroff, O. A. (2002). GABA and Glutamate in the Human Brain. *The Neuroscientist*, 562-573.

Petroff, O., Rothman, D., Behar, K. et al., (1996). Low brain GABA level is associated with poor seizure control. *American Neurological Association*, 908-911.

Pitkänen, A. (2010). Therapeutic approaches to epileptogenesis—Hope on. *Epilepsia*, 2-17.

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D. et al., (2001). *Neuroscience* (segunda edición ed.) Sunderland: Sinauer Associates.

Racine, R. (1971). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 281-294.

Rainesalo, S., Keränen, T., Palmio, J. et al., (2004). Plasma and cerebrospinal fluid amino acids. *Neurochemical Research*, 319-324.

Ratnakumari, L. y Murthy, R. (1998). Activities of pyruvate dehydrogenase, enzymes of citric acid cycle, and aminotransferases in the subcellular fractions of cerebral cortex in normal and hyperammonemic rats. *Neurochemical Research*, 221-228.

Rausch, R., Serafetinides, E. et al., (1975). Specific alterations of olfactory function in humans with temporal lobe lesions. *Nature*, 557-558.

Redman, L., Heilbronn, L., Martin, C. et al. (2009). Metabolic and Behavioral Compensations in Response to Caloric Restriction: Implications for the Maintenance of Weight Loss. *PLoS ONE*, 1-9.

Rho, J. (2015). How does the ketogenic diet induce anti-seizure effects? *Neuroscience Letters*, 1-7.

Ribeiro, Carina L., Quincozes-Santos, A., Leite, M.C, et al., (2009). Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neuroscience Research*, 64, 330–334.

Rivera, Z., Báez, R. y Díaz, M. (2011). Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal. *PPAR Research*, 1-11.

Scorza, F., Arida, R., Naffah, M. et al., (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 345-365.

Segal, M. (1988). Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Research*, 79-82.

Soukupová, M., Binaschi, A., Falcicchia, C. et al., (2014). Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 257,39–49.

Soukupova, M., Binaschi, A., Falcicchia, C. et al., (2015). Increased extracellular levels of glutamate in the hippocampus of chronically epileptic rats. *Neuroscience*, 246–253.

Speakman, J. y Mitchell, S. (2011). Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine*, 159–221.

Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D. et al., (2015). A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status. *Epilepsia*, 1515-1523.

Tursky, W., Cavalheiro, E. y Schwarz, M. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, 315-335.

Ueda, Y. y Willmore, L. (2009). Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by valproic acid in rat hippocampus during epileptogenesis. *Experimental Brain Research*, 334-339.

van Vliet, E., da Costa Ara jo, . y Redeker, S. (2007). Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, 130, 521–534.

Voet, D. y Voet, J. (2004). *Bioquímica (tercera edición ed.)*. (P. Baldi, L. P. Blumeti, S. Fernández Castelo, O. Giovanniellio, D. Klajn, K. Mikkelsen, y otros, Traductores.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Waagepetersen, H., Sonnewald, U., Larsson, O. et al., (2000). A Possible Role of Alanine for Ammonia Transfer Between Astrocytes and Glutamatergic Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 471-479.

Walker, L. y J.Sills, G. (2012). Inflammation and Epilepsy: The foundations for a new therapeutic approach in Epilepsy? *Epilepsy Currents*, 8-12.

Walton, N., Gunawan, S. y Treiman, D. (1990). Brain amino acid concentration changes during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. *Experimental Neurology*, 61-70.

Wang, J., Vanegas, S. M., Du, X. et al., (2013). Caloric restriction favorably impacts metabolic and immune/inflammatory profiles in obese mice but curcumin/piperine consumption adds no further benefit. *Nutrition & Metabolism*, 10-29.

Wilson, C., Maidment, N., Shomer, M. et al. (1996). Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research*, 245-254.

Wood, H., Hare, T., Glaeser, B. et al., (1979). Low cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid content in seizure patients. *Neurology*, 1203-8.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Horyn, O. et al., (2008). Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia*, 73-75.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Melø, T. et al., (2007). The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. *Annual Review of Nutrition*, 415-431.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I. et al., (2005). Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochemistry International*, 119-128.

12. Apéndice

EDTA 0.11M

Se prepararon 25 ml de EDTA. Se pesaron 0.8036g de EDTA con peso molecular 372.24 g/mol y se disolvieron en PBS más 5 ml de NaOH concentrado, y se ajustó a pH 8. Se empleó 1 ml de EDTA 0.11M para 5 ml de sangre.

PBS para perfusión de tejidos

NaH ₂ PO ₄	2.04 g
Na ₂ HPO ₄	11.68 g
NaCl	9.00 g

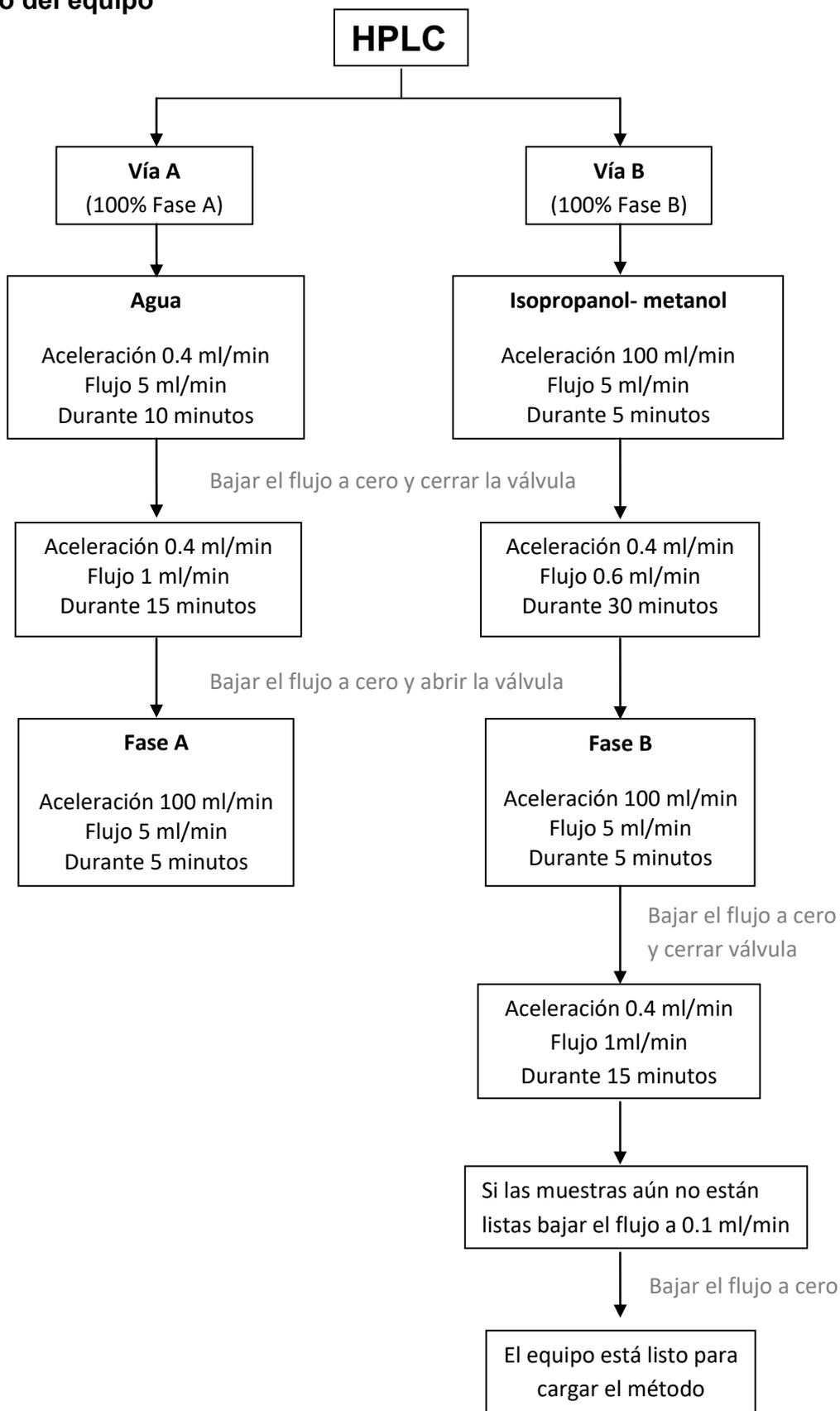
Se aforó a 1 litro con agua bidestilada, se ajustó a un pH 7.4 y finalmente se filtró el buffer.

Solución de Krebs Ringer

KCl	0.2050 g
NaHCO ₃	0.2310 g
MgCl ₂ *6 H ₂ O	0.0508 g
NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O	0.0390 g
NaCl	2.0162 g
CaCl ₂ *H ₂ O	0.0551 g

Se aforó a 250 ml y se ajustó a un pH 3.0 con HCl 0.1M.

Lavado diario del equipo



Fases móviles

Fase A

Para la preparación de dos litros se debe pesar 11.1745g de Na_2HPO_4 y se ajusta el pH a 7.8 con ácido fosfórico 10N, la solución se debe filtrar con bomba y se guarda en botellas ámbar con capacidad de un litro a 4°C.

Fase B

Para la preparación de dos litros de fase B se miden 800 ml de acetonitrilo, 900 ml de metanol y 100 ml de agua bidestilada, se filtra con bomba y la fase se guarda en botellas transparentes con capacidad de un litro a 4°C.

Soluciones que se utilizan en el mantenimiento y funcionamiento del equipo.

Para el mantenimiento del equipo se utiliza: isopropanol 10% para el lavado de los sellos y metanol al 50% para el lavado de la aguja. Estas soluciones se cambian cada semana con la finalidad de mantener la concentración adecuada para un buen mantenimiento y funcionamiento del equipo.