



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ISOENZIMAS DE
OXIDO NÍTRICO SINTASA EN HIPOCAMPO, AMÍGDALA Y
CORTEZA CEREBRAL DE GATOS SOMETIDOS A UNA
CONDICIÓN EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA

MARCELO ESTEBAN DÍAZ QUINTEROS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: CLAUDIO INFANTE

SANTIAGO, CHILE

2005



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ISOENZIMAS DE OXIDO NÍTRICO SINTASA EN HIPOCAMPO, AMÍGDALA Y CORTEZA CEREBRAL DE GATOS SOMETIDOS A UNA CONDICIÓN EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA

MARCELO ESTEBAN DÍAZ QUINTEROS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: CLAUDIO INFANTE
PROFESOR CONSEJERO	: MARCO GALLEGUILLOS
PROFESOR CONSEJERO	: ENZO BOSCO

SANTIAGO, CHILE

2005

*Dedico esta memoria a mis padres,
quienes han sido mi pilar durante todos estos años.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, Graciela y Alejandro por entregarme siempre todo su cariño, comprensión y apoyo incondicional . Gracias a ustedes soy una mejor persona. También a mis hermanos Alejandra y Daniel, quienes me acompañaron siempre en momento buenos y difíciles

Agradezco profunda y sinceramente, a mi profesor guía Dr. Claudio Infante, por todo su apoyo, por sus sabios consejos y por las gratas conversaciones de neurociencia en su laboratorio, las que recuerdo con mucho aprecio, y que continuamente me impulsan a formularme más preguntas.

También agradezco al Dr. Elías Motles y a todos los funcionarios del Departamento de Medicina Experimental, en especial a Jaime, quienes colaboraron estrechamente en este proyecto.

Al Dr. Marco Galleguillos a quién también considero como mi profesor guía, le agradezco toda su ayuda y conocimientos, a través de su sencillez trasciende su sabiduría, siendo para mí un modelo a seguir.

También agradezco a la Dra. Emma González y al Dr. Héctor Adarmes quienes me acogieron cariñosamente en su laboratorio y a todos los tesistas y funcionarios del Laboratorio de Bioquímica de la facultad, Fabiola, Juan Pablo, Álvaro, Jorge, Carlitos y Víctor, por compartir y alegrar mis días de trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos y compañeros de tantos y tantos momentos felices, Minda, Francisca, Fabiola, Viviana, Daniela M., Paula, Isabel, Daniela F., Andrea, Juan, Rodrigo, Alejo, Carlos, Juan Pablo, Francisco. Ustedes son lo más importante de mi paso por la universidad.

INDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	8
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ABREVIATURAS

- ACPD** : (1S, 3R)-1-amino-1-carboxi-ciclopentano-3-acetato.
- AMPA** : α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 -isoxazolpropionato.
- FAD** : Flavín adenina dinucleótido.
- FMN** : Flavín mononucleótido.
- sGC** : Guanilato ciclasa soluble.
- GABA** : Ácido γ -amino-butírico.
- GMP_C** : Guanosín monofosfato cíclico.
- IL-1 β** : Interleuquina 1 β .
- IL-2** : Interleuquina 2.
- IL-6** : Interleuquina 6.
- IFN- γ** : Interferón γ .
- LTD** : “Long term depression” (depresión de largo plazo).
- LTP** : “Long term potentiation” (potenciación de largo plazo).
- LPS** : Lipopolisacáridos
- NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
- NMDA** : N-metil-D-aspartato.
- NO** : Óxido nítrico.
- eNOS** : Óxido nítrico sintasa endotelial.
- iNOS** : Óxido nítrico sintasa inducible.
- nNOS** : Óxido nítrico sintasa neuronal.
- ONOO⁻** : Peroxinitrito.
- O₂^{•-}** : Anión superóxido.
- THB** : Tetra hidro biopterina
- TNF α** : Factor de necrosis tumoral α .

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso de vida media, el cual participa en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos. En el sistema nervioso en particular, actúa normalmente como un mensajero neuronal regulando la transmisión sináptica; sin embargo en condiciones patológicas como en la epilepsia su síntesis puede verse alterada, en términos tales que su aumento puede favorecer la aparición de otros radicales libres, entre ellos el peroxinitrito, el cual es un potente agente neurotóxico. No obstante, además de su acción proepiléptica, el NO de acuerdo con algunas investigaciones presentaría también efectos antiepilépticos. Debido a esta dualidad de efectos, resulta relevante conocer con exactitud en qué condiciones esta molécula puede tomar uno u otro camino.

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar en un modelo experimental de epilepsia en gatos, los niveles relativos de las tres isoformas de Oxido Nítrico Sintasa que producen NO, tanto nNOS, iNOS y eNOS en tres regiones cerebrales de bajo umbral a la epilepsia tales como el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral.

Para ello se trabajó con tres grupos de gatos adultos, a los cuales se les implantó bilateralmente electrodos en las tres estructuras estudiadas, además de una cánula en hipocampo derecho. En dos de los grupos experimentales, a través de la cánula implantada crónicamente en hipocampo derecho, se inyectó AMPA como agente epileptogénico y solución salina en el grupo control. Uno de los grupos con epilepsia inducida fue sacrificado a las 24 horas y el otro grupo experimental fue sacrificado a los 5 días después de la inyección de AMPA, al igual que el grupo control que también fue sacrificado a los 5 días.

Bajo anestesia profunda se extrajeron muestras bilaterales de tejido de las estructuras implantadas. Las muestras fueron procesadas para determinar la presencia de las isoformas nNOS, iNOS y eNOS, las cuales fueron identificadas por Dot Blot y cuantificadas por densitometría.

En los dos grupos de gatos con epilepsia se observaron variaciones temporales y regionales respecto de los controles en los niveles de NOS; eNOS se encontró elevada a las 24 horas en corteza cerebral izquierda ($p < 0,05$) y a los 5 días en hipocampo derecho ($p < 0,05$) e izquierdo ($p < 0,05$); por su parte nNOS aumentó a los 5 días tanto en hipocampo derecho ($p < 0,05$) como en corteza cerebral izquierda ($p < 0,05$); la iNOS se encontró elevada a los 5 días sólo en amígdala derecha ($p < 0,05$).

Los aumentos en los niveles de las diferentes isoformas de NOS, sugieren un compromiso y respuesta específica de las estructuras estudiadas en el proceso epiléptico, lo que plantea nuevas interrogantes a cerca de los tejidos y los lugares en que el NO actúa modulando los estados de hiperexcitabilidad neuronal.

SUMMARY

The nitric oxide (NO) is a short-life free radical gas, which is involved both in physiological and pathological processes. In the nervous system, NO acts normally as a neuronal messenger regulating the synaptic transmission; nevertheless in pathological conditions, as in the epilepsy, its increases can favor the appearance of others free radical, like the peroxynitrite, a powerful neurotoxic agent.. However, besides proepileptic actions, NO might present anti-epileptic effects. Due to this duality of effects, it should be interesting to know in what conditions NO has a beneficial or harmful effects.

The aim of the present work is to evaluate in a cat experimental model of epilepsy, the relative levels of the three isoenzymes of Nitric Oxide Synthase (nNOS, iNOS and eNOS) in hippocampus, amygdala and cerebral cortex, all structures with low epileptic treshold.

Three groups of adult cats were subjected to a surgical procedure, in order to implant a cannula in right hippocampus and electrodes in cerebral cortex, hippocampus and amygdala in both hemispheres. Into the experimental groups, AMPA, the epileptogenic agent, was injected through the implanted cannula in right hippocampus. In the control group, similar procedure was utilized with saline solution. One of the experimental groups was sacrificed at 24 hours after AMPA injection and the other group was sacrificed to 5 days after AMPA injection. The control group also was sacrificed to 5 days. Under deep anaesthesia, tissue samples from hippocampus, amygdala and cerebral cortex were bilaterally removed.

The isoenzymes nNOS, iNOS and eNOS present in the samples were identified by Dot Blot and quantified for densitometric analysis.

Related to the control group, cats with epilepsy presented the following results: eNOS increased at 24 hours in left cerebral cortex ($p < 0,05$) and to 5 days in both hippocampus ($p < 0,05$ and $p < 0,05$ respectively); on the other hand nNOS increased to 5 days in right hippocampus ($p < 0,05$) and in left cerebral cortex ($p < 0,05$); whereas the iNOS increased to 5 days only in right amygdala ($p < 0,05$).

Increases of the different isoforms of NOS, suggest a specific involvement of the structures studied in the epileptic process, which it raises new questioning on the way in which the NO acts modulating the different states of neuronal excitability.

INTRODUCCIÓN

La Epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes a nivel mundial, afectando alrededor de 200 millones de personas en todo el mundo, representando al 1,6% de toda la población. Esta patología es además motivo de consulta en clínicas veterinarias. Por otra parte este trastorno crónico tiene un fuerte impacto en la calidad de vida de quienes la padecen; es por ello que existe un gran interés por comprender los mecanismos fisiopatológicos que generan este trastorno, de modo de poder diseñar herramientas terapéuticas cada vez más eficaces.

Durante los últimos años se ha estudiado a un nuevo mensajero neuronal, el Oxido Nítrico (NO), un radical libre gaseoso de vida media implicado en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos en todo el organismo y que además ha ampliado la concepción de cómo las neuronas se comunican (Dawson y Dawson, 1996). La desregulación de su actividad enzimática tendría un importante rol en patologías cerebrales incluyendo la epilepsia. Sin embargo, aún no se sabe con exactitud las condiciones en que el NO participa en procesos fisiológicos y en las que se convierte en un potente agente tóxico. No obstante, algunos autores han señalado que variables como el tiempo, lugar y la frecuencia de producción de NO, determinarían uno u otro camino (Grisham *et al.*, 1999).

La presente memoria de título, pretende contribuir al entendimiento de la relación entre el óxido nítrico y la epilepsia, estudiando los cambios en la cantidad de las isoenzimas que lo producen, en un modelo experimental de epilepsia en gato.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Epilepsia es un trastorno de la excitabilidad del sistema nervioso central, que se presenta en forma crónica y repetitiva, afectando tanto a seres humanos como a otros mamíferos. Su sintomatología clínica es diversa, destacándose las crisis convulsivas, crisis de ausencia, y a una gran variedad de trastornos conductuales asociados a las crisis.

En un porcentaje de individuos la enfermedad aparece como complicación de una patología adquirida del sistema nervioso, ya sea como secuela de un traumatismo craneano, tumores, hemorragias, infartos, infecciones o procesos degenerativos; en otros casos el trastorno es de origen genético y en otros de origen idiopático. Todos los tipos de epilepsia presentan como fenómeno en común a un estado de hiperexcitabilidad de un grupo importante de neuronas, las cuales disparan potenciales de acción en forma repetitiva y sincrónicamente (Motles, 1993).

La adecuada funcionalidad del sistema nervioso se basa en el mantenimiento de procesos fisiológicos altamente regulados que trabajan armónicamente. El desequilibrio en uno o más de estos factores puede desencadenar una condición de hiperexcitabilidad la cual se asocia con una sincronización neuronal. Como condiciones fisiológicas susceptibles de iniciar un proceso epiléptico se puede señalar: (1) la capacidad intrínseca de las neuronas de disparar potenciales de acción, (2) el conjunto de señales excitatorias e inhibitorias que modulan a nivel sináptico la actividad bioeléctrica basal de las neuronas, a través de neurotransmisores excitatorios (por ejemplo: glutamato y aspartato) e inhibitorios (por ejemplo: GABA y glicina) y (3) la glía que es responsable del mantenimiento de la homeostasis del medio extraneuronal. Por

ello, cualquier condición patológica que lleve a una alteración en la regulación de la actividad excitatoria, se traducirá en un estado de hiperexcitabilidad neuronal.

Como causa de predominio excitatorio, se puede mencionar la sobreestimulación de receptores de glutamato o la falla en los sistemas inhibitorios, como ocurre cuando hay destrucción de neuronas gabaérgicas (Roberts, 1986) y alteraciones de la glía, cuya función entre otras, es la de mantener bajas concentraciones de potasio a nivel extracelular, por lo tanto la falla funcional o la destrucción de células gliales provocará una disminución del umbral de descarga neuronal y de ese modo las neuronas se pueden hacer más hiperexcitables (Motles, 1993).

El principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central es el glutamato, el cual es liberado en el espacio sináptico mediante la despolarización del terminal presináptico. Su acción se ejerce al unirse a receptores glutamatérgicos ubicados en la membrana pre-sináptica y post-sináptica, describiéndose dos familias principales: (1) Receptores ionotrópicos, (2) Receptores metabotrópicos. Dentro de los receptores ionotrópicos se describen tres tipos: (a) Receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), (b) Receptores Quisqualato o AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), (c) Receptores Kainato (Fagg *et al.*, 1986).

Tanto los receptores AMPA y Kainato permiten la entrada principalmente de sodio al interior de las neuronas, en cambio los receptores NMDA permiten la entrada de ión calcio (Fagg *et al.*, 1986).

La importancia de los receptores de glutamato en la fisiopatología de la epilepsia y de otras patologías nerviosas tanto agudas como crónicas, se evidencia a partir de varios estudios que señalan que una estimulación prolongada de receptores glutamatérgicos provoca muerte neuronal y que daños cerebrales asociados a isquemia, hipoglicemia y epilepsia son consecuencia de una excesiva

estimulación de receptores NMDA. Por otro lado, la administración de antagonistas de receptores NMDA, suprime la actividad epiléptica inducida en varios modelos animales de epilepsia (Fagg *et al.*, 1986).

En relación a lo anterior, durante los últimos años se ha estudiado a un nuevo mensajero neuronal, el óxido nítrico (NO), un gas radical libre de vida media en medios biológicos, implicado en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos tanto en los sistemas nervioso, cardiovascular, reproductivo e inmunológico y cuyo mecanismo de síntesis se asocia en el sistema nervioso a activación de receptores NMDA.

En el sistema nervioso, el NO ha sido involucrado en eventos tales como: regulación del flujo cerebral, plasticidad sináptica, liberación de neurotransmisores, LTP (“long-term potentiation”), LTD (“long-term depression”) ambos fenómenos asociados a memoria y aprendizaje, morfogénesis, eventos neuroprotectivos, conductas sexuales y de agresividad y bajo condiciones de excesiva formación, emerge como un potente agente neurotóxico (Dawson y Dawson, 1996).

Su síntesis es catalizada por la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS) a partir de arginina, describiéndose hasta la fecha tres isoenzimas: (1) Isoforma neuronal (nNOS o NOS tipo 1): presente en forma constitutiva en ciertas poblaciones neuronales y de otros tejidos, incluyendo células de la mácula densa del riñón, células β del páncreas, células del músculo esquelético, células epiteliales del pulmón, estómago y útero (Gross y Wolin, 1995). (2) Isoforma inducible (iNOS o NOS tipo 2): expresada en procesos inflamatorios e infecciosos por acción de endotoxinas como LPS (Lipopolisacáridos) y estímulos inmunológicos mediados por citoquinas, desde prácticamente todas las células nucleadas de los mamíferos, incluyendo macrófagos y células gliales (Licinio *et al.*, 1999). (3) Isoforma endotelial (eNOS o NOS tipo 3): presente en forma

constitutiva en células endoteliales vasculares y en una discreta población de neuronas en el hipocampo (Dawson y Dawson, 1996). Las tres isoenzimas requieren NADPH como cofactor donador de electrones y solamente la nNOS y la eNOS necesitan calcio para ser activadas (Gross y Wolin, 1995).

Bajo condiciones normales, la producción de NO a partir de la nNOS en el sistema nervioso, ocurre acoplada a dos tipos de señales: (1) Estimulación de receptores NMDA ubicados en la membrana postsináptica, conduciendo a una entrada de ión calcio que activará a la nNOS por intermedio de una calmodulina calcio-dependiente, catalizando la conversión de arginina a citrulina y NO en presencia de NADPH, oxígeno, FMN, FAD, grupo hemo y THB. (2) Potenciales de acción que depolarizan la terminal presináptica, provocan una entrada de calcio a través de canales de calcio sensibles a voltaje; éste ion en esta condición, también activará a la nNOS a través de calcio-calmodulinas, generándose citrulina y NO a partir de arginina en presencia de NADPH, oxígeno y los cofactores ya señalados (Garthwaite y Boulton, 1995). El NO generado por estas vías, puede actuar sobre la misma célula o difundir a otras neuronas, activando la forma soluble de la enzima guanilato ciclasa (sGC) que cataliza la conversión de GTP en GMP cíclico. Este segundo mensajero actúa acoplándose a importantes funciones intracelulares que pueden afectar la funcionalidad de canales iónicos, o activar proteínas quinasas, las cuales participan en subsecuentes eventos celulares, incluyendo regulación de la expresión génica (Krukoff, 1999).

El óxido nítrico también puede producirse en el endotelio de vasos sanguíneos del cerebro por acción de la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), cuya activación está acoplada a señales nerviosas no-adrenérgicas, no-colinérgicas. El NO generado por esta vía, activa a la enzima sGC, la cual cataliza la conversión de GTP en GMP cíclico; esta última molécula a su vez actúa como un agente vasodilatador (Dawson y Dawson, 1996). Debido a lo anterior, en

condiciones normales el NO jugaría un importante rol en la regulación de la circulación cerebral. Por otro lado, en las crisis epilépticas, el aumento de la actividad neuronal genera un incremento del flujo cerebral local; por ello se ha propuesto al NO como un mediador de vasodilatación observada en crisis epilépticas (González-Hernández *et al.*, 2000).

Una tercera fuente de NO en el cerebro proviene de la iNOS, la cual se expresa generalmente en respuesta a procesos patológicos, incluyendo traumas, infartos, enfermedades degenerativas como el Mal de Alzheimer, enfermedades infecciosas como meningitis y encefalitis y cuadros autoinmunes como la Esclerosis Múltiple. La iNOS también puede expresarse en el cerebro, en respuesta a eventos periféricos, particularmente en procesos inflamatorios sistémicos (Licinio *et al.*, 1999). Durante cuadros inflamatorios e infecciones, células del sistema inmune como monocitos y macrófagos producen una gran variedad de citoquinas tales como Interleuquina 1- β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-2 e Interferón- γ (IFN- γ). Estas citoquinas inducen la síntesis de iNOS en diferentes células animales o asociadas al sistema nervioso, incluyendo células de la glia, neuronas y células perivasculares del SNC (Licinio *et al.*, 1999). El NO generado por esta vía, participa en una gran variedad de procesos, que incluye formación de radicales libres, e interacciones con proteínas que contienen metales en su estructura, como la hemoglobina, receptores NMDA y proteínas mitocondriales (Licinio *et al.*, 1999).

Recientes investigaciones han revelado que una excesiva activación de receptores de glutamato asociado al fenómeno epiléptico, resulta en una sobreexpresión de la nNOS, ésto conduciría a un aumento de la síntesis y liberación de grandes cantidades de NO (González-Hernández *et al.*, 2000), sin embargo el efecto que tendría este aumento en el fenómeno epiléptico es todavía materia de discusión. Por un lado se describe que en altas concentraciones, el

NO interactúa con el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente agente oxidante que produce lipoperoxidación de membranas biológicas, daños en el DNA, e inhibición de la función mitocondrial, conduciendo a una mayor formación de radicales libres, que finalmente llevarán a una muerte neuronal (Dawson y Dawson, 1996). Sin embargo, otros estudios han revelado que la inhibición de la NOS, facilita la aparición de crisis epilépticas en diferentes modelos animales experimentales, dando cuenta de un rol neuroprotectivo y que la sobreexpresión de la nNOS, puede ser una respuesta adaptativa a un estado de hiperexcitabilidad sostenido del cerebro (Boda y Szente, 1996; Herberg *et al.*, 1995). En esta misma dirección, otros autores han propuesto que bajo una intensa activación de receptores NMDA, el NO producido ejercería un “feedback” negativo sobre este receptor, por medio de una S-nitrosilación del grupo tiol de una de las subunidades del receptor, modificando su estado funcional (Garthwaite y Boulton, 1995; González-Hernández *et al.*, 2000).

Teniendo presente los datos precedentes, cabe preguntarse cómo una misma molécula, puede participar en importantes procesos fisiológicos y al mismo tiempo ser causa de graves daños funcionales y estructurales tanto en el cerebro, como en otros sistemas. Una respuesta tentativa a esta paradoja, estaría dada por ciertas características de la acción del NO, en que tanto el momento, el lugar y la frecuencia de producción, serían factores claves en la comprensión de los diferentes efectos producidos (Grisham *et al.*, 1999).

La presente memoria de título, pretende contribuir a entender la relación del óxido nítrico con la epilepsia, estudiando de qué manera una determinada condición experimental de actividad epiléptica, afecta simultáneamente la expresión de las isoformas de NOS, en tres importantes estructuras cerebrales asociadas a este cuadro, como son el hipocampo, la amígdala y la corteza frontal.

Para ello se trabajó en un modelo experimental desarrollado en el gato, en el cual la administración intracerebral del agonista de glutamato AMPA en dosis umbrales, permite la generación de un foco epiléptico controlado y circunscrito a estructuras del sistema límbico, y cuyas manifestaciones externas se restringen a cambios conductuales.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Comparar los niveles relativos de las isoenzimas Oxido Nítrico Sintasa en hipocampo, amígdala y corteza cerebral, de gatos adultos con actividad epiléptica.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Inducir una actividad epiléptica en gatos adultos, a través de una inyección del agonista de glutamato AMPA en hipocampo derecho.
- Detectar la presencia de las tres isoformas de oxido nítrico sintasa en muestras de hipocampo, amígdala y corteza cerebral, en gatos normales y gatos con epilepsia, 24 horas y 5 días después de la inyección de AMPA.
- Cuantificar por densitometría las 3 isoformas de NOS, en muestras de hipocampo, amígdala y corteza cerebral de gatos sometidos a la condición experimental señalada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron 15 gatos adultos mestizos de ambos sexos. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron cumpliendo las recomendaciones establecidas en el Protocolo Bioético para la Investigación Experimental del Dolor en Animales Conscientes (Zimmermann, 1983) y con aprobación del Comité de Bioética del Campus Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Procedimiento Quirúrgico:

Los animales fueron sometidos al siguiente procedimiento: bajo anestesia general con Nembutal® (30 mg/kg intraperitoneal) y en condiciones de asepsia, los gatos fueron ubicados en un instrumento estereotáxico con la finalidad de realizar un implante de una cánula adosada a un electrodo en hipocampo derecho; a través de la cual posteriormente se inyectaría el AMPA. Además se implantaron electrodos en amígdala derecha e izquierda e hipocampo izquierdo, para registrar su actividad eléctrica subcortical y electrodos en el hueso del cráneo para el registro de corteza cerebral. La localización de las diferentes estructuras cerebrales se realizó empleando un Atlas Estereotáxico para gatos (Reinoso-Suárez, 1961). Todos los electrodos fueron fijados al cráneo con acrílico dental y soldados a una base de conexión, la cual fue cementada sobre el cráneo.

Como medida profiláctica se inyectó 30.000 U.I./kg de Penicilina Benzatína intramuscular, suero fisiológico (60 ml intraperitoneal), además aplicación tópica de antibióticos en herida operatoria y conjuntiva ocular. Una vez recuperados de la cirugía, los animales fueron sometidos al siguiente protocolo experimental.

Modelo Experimental de Epilepsia:

Los animales fueron divididos en 3 grupos de 5 gatos cada uno y sometidos a diferentes procedimientos:

Grupo 1: Se inyectó AMPA 40 mM (Sigma®), diluïdos en 5 µL de suero fisiológico en hipocampo derecho, mediante cánula intracerebral, con el propósito de generar un foco epiléptico; 24 horas después de la inyección de AMPA. bajo anestesia profunda (Nembutal® 60mg/kg i.p.), los animales fueron sacrificados obteniéndose muestras de hipocampo, amígdala y corteza cerebral, de ambos hemisferios, las cuales fueron etiquetadas, congeladas en nitrógeno líquido y luego almacenadas a - 80° C.

Grupo 2: Se realizó el mismo protocolo anterior, pero los animales fueron sacrificados a los 5 días.

Grupo 3: Corresponde a un grupo control, en donde a cada animal se inyectó 5 µL de suero fisiológico en hipocampo derecho, vía cánula intracerebral y cinco días después bajo anestesia profunda, se sacrificaron y se obtuvieron muestras de hipocampo, amígdala, y corteza cerebral de ambos hemisferios, las cuales fueron etiquetadas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a - 80°C.

Inmediatamente después de cada microinyección intracerebral, cada animal contó con un estudio electroencefalográfico simultáneo de todas las estructuras implantadas, que fue acompañado de un registro conductual. El registro permitió detectar la zona de aparición de la actividad epiléptica, y las estructuras a las que difunde.

Preparación de muestras:

Las muestras fueron descongeladas, y en presencia de inhibidores de proteasas (Tris-HCl 50mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1mM, 2-β-

Mercaptoetanol 12 mM, Leupeptin 2mM, Pepstatin 1mM y Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM), fueron homogeneizadas utilizando un Ultraturrax a 13.000 r.p.m. 3 veces durante 15 segundos. Posteriormente fueron centrifugadas a 1000xg por 15 minutos. Luego la fracción sobrenadante fue alicuotada y almacenada a – 20°C, para su posterior análisis.

Determinación de proteína:

Se determinó la concentración de proteínas totales de cada muestra de tejido cerebral, por el método espectrofotométrico de Lowry, usando como estándar albúmina sérica bovina (Lowry *et al.*, 1951).

Dot Blot:

Con el propósito de identificar a las tres isoformas de NOS, se procedió a cargar 2,5 µg de proteína de cada uno de los homogeneizados del tejido, en membranas de PVDF (Inmobilon® Millipore, Marlborough, MA, USA) utilizando una cámara de Dot Blot (BIO-RAD®). Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C, en una solución de bloqueo elaborada con leche descremada al 6% en buffer TBS-T (20mM Tris-HCl, 137 mM NaCl y Tween 20 al 0,05%, pH 7,6), con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos. A continuación las membranas fueron sometidas a un procedimiento de lavado, el cual consistió en 3 lavados en agitación en una solución de TBS-T durante 10 minutos cada uno. Luego las membranas fueron incubadas durante 2 horas en agitación con anticuerpos monoclonales anti-nNOS (número de catálogo N31020-50, Transduction Laboratories®, Kentucky, USA), anti-iNOS (número de catálogo N39120-050, Transduction Laboratories®, Kentucky, USA) o anti-eNOS (número de catálogo N30020-050, Transduction Laboratories®, Kentucky, USA), en una solución de leche

descremada al 6% en buffer TBS-T; cuya dilución fue de 1:4000 para los anticuerpos anti-nNOS y anti-iNOS y de 1:1000 para el anticuerpo anti-eNOS. Posteriormente se realizó una segunda etapa de lavado de las mismas características del anterior y se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con un segundo anticuerpo anti-IgG de Ratón (anticuerpo InmunoPore®, número de catálogo 31430, Pierce®), conjugado con peroxidasa de rabanito, en solución de leche descremada al 6% en buffer TBS-T, cuya dilución fue de 1:15000. Finalmente se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con un sustrato que genera un producto quimioluminiscente por acción de la peroxidasa (Super Signal®, número de catálogo 34080, Pierce®). La reacción positiva se evidenció a partir de puntos luminosos, cuya intensidad de luz está en directa relación a la cantidad de enzima. Luego, las membranas fueron expuestas durante 5 a 10 minutos a películas fotosensibles (CL-X Posure®, número de catálogo 34090, Pierce®) donde quedó registrada las diferencias de intensidad de luz de cada muestra, para realizar posteriormente determinaciones cuantitativas mediante un análisis densitométrico.

Western Blot:

En forma adicional, se realizó un Western Blot a muestras correspondientes a corteza frontal derecha e hipocampo derecho, con el propósito de corroborar si las isoformas de NOS detectadas en el tejido cerebral de gato mediante Dot Blot, corresponden a las descritas en la literatura, mediante la determinación de sus Masas Moleculares.

En una primera etapa, muestras de corteza frontal derecha y de hipocampo derecho de los 3 grupos experimentales, fueron sometidas a una electroforesis en condiciones reductoras y desnaturantes. Para ello, cada muestra fue diluida en una proporción 1:4 en una solución que contiene Tris-HCl 1,5 M

pH 6,8, SDS al 10%, glicerol al 1%, azul de bromofenol al 0,5% y β -Mercaptoetanol 700 mM. La electroforesis se realizó en un gel separador de poliacrilamida al 8% y en un gel concentrador de poliacrilamida al 5%, a un voltaje constante de 100 volt durante 120 minutos, utilizando una cámara vertical Mini-Protean III Cell (BIO-RAD®), con capacidad para 2 geles (Tsang, *et al.*, 1983). Cada peineta tiene 10 carriles, y cada gel fue cargado de la siguiente forma: en un carril se incluyó una mezcla de marcadores de masa molecular comercial estándar de 14.2 a 220 kDa (rango de pesos que incluyen a las isoenzimas de NOS) (BIO-RAD®) y en los carriles restantes se cargaron 50 μ g de proteína total del homogeneizado de cada muestra.

A continuación, las proteínas presentes en los geles fueron transferidas a membranas PVDF (Inmobilon® Millipore, Marlborough, MA, USA) por medio de una Electrotransferencia, realizada en una cámara vertical Mini-Protean III Cell (BIO-RAD®) a 0.35 A por 2 horas. Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C, en una solución de bloqueo elaborada con leche descremada al 6% en buffer TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl y Tween 20 al 0,05%, pH 7,6) con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos con proteínas contaminantes.

Las membranas fueron sometidas a tres lavados consecutivos en agitación, cada uno de 10 minutos de duración en una solución TBS-T; las membranas que contienen muestras de corteza derecha fueron incubadas durante 2 horas en agitación con un primer anticuerpo monoclonal anti-nNOS (Transduction Laboratories®, Kentucky, USA) diluído 1:4000 en una solución de leche descremada al 6% en buffer TBS-T; en cambio las membranas con muestras de hipocampo derecho, fueron incubadas con anticuerpos anti-eNOS (Transduction Laboratories®, Kentucky, USA) en una dilución 1:1000 también en una solución de leche descremada al 6% en buffer TBS-T. Posteriormente se

realizó una segunda etapa de lavado de las mismas características del anterior, e incubación de las membranas durante 1 hora en agitación con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Pierce®), marcado con peroxidasa de Rabanito, diluido 1:15000 en solución de leche descremada al 6% en buffer TBS-T. Finalmente se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con un sustrato que generan producto quimioluminiscente (Super Signal®, número de catálogo 34080, Pierce®). La reacción positiva se evidenció a partir de bandas luminosas, cuya intensidad de luz está en directa relación a la cantidad de enzima. Luego, las membranas fueron expuestas durante 5 minutos a películas fotosensibles, donde quedó registrada las diferencias de intensidad de luz de cada muestra.

Una vez obtenidos los registros correspondientes a la enzima nNOS, las membranas de PVDF con homogeneizados de corteza derecha fueron sometidas a un proceso de Deshibridización, el cual permitió eliminar todos los anticuerpos que se encontraban adheridos a las membranas, con el propósito de incubar con nuevos anticuerpos. Para ello, las membranas fueron sumergidas durante 30 minutos a 50°C, en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,7, SDS al 2% y β -Mercaptoetanol 100 mM. A continuación se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno en “buffer” TBS-T, a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C en una solución de bloqueo elaborada con leche descremada al 6% en “buffer” TBS-T. Luego las membranas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-iNOS (Transduction Laboratories®, Kentucky, USA) en una dilución 1:4000, siguiendo los mismos pasos señalados con anterioridad, hasta la obtención de películas fotosensibles donde quedó registrada las diferencias de intensidad de luminosidad de cada muestra.

Densitometría:

La densitometría permitió realizar una estimación de la cantidad relativa de las 3 isoenzimas de NOS presente en las estructuras estudiadas, en los tres grupos experimentales. Para ello cada “film” fotosensible fue escaneado y analizado mediante el programa computacional UNI-SCAN-IT Gel versión 4,1 (Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile) el cual cuantifica el número de Píxeles (unidades densitométricas) de cada punto o banda correspondiente a cada muestra.

Con el objeto de minimizar posibles variaciones entre cada experimento, se estableció una razón entre los valores en unidades densitométricas (U.D.) de cada muestra con los valores densitométricos de un patrón interno, el cual corresponde a una muestra de tejido que presenta las isoformas de NOS y que se cargó junto a las demás muestras, siempre con una misma cantidad de proteína total en cada uno de los Dot Blot. El patrón interno para la nNOS fue un homogeneizado de corteza de gato, para la eNOS fue un homogeneizado de hipocampo de gato y para la iNOS corresponde a un homogeneizado de membrana sinovial de equino. De esta forma, las comparaciones entre el grupo control y los grupos experimentales para un tejido cerebral y para una determinada isoforma, se realizó en base al valor obtenido de la razón entre las U.D. de cada muestra y las U.D. del patrón interno específico para cada isoforma de NOS.

Análisis de los datos:

Para las comparaciones entre los grupos experimentales y control se utilizó la prueba no paramétrica de Man-Whitney (Taucher, 1999).

RESULTADOS

1. Experimento control:

Inyecciones intracerebrales del vehículo (NaCl 0,9 %), en un volumen equivalente al utilizado en la inyección intracerebral de AMPA, no provocó modificaciones en el registro electroencefalográfico (fig. 1), ni cambios conductuales en ninguno de los animales estudiados.

2. Caracterización de las postdescargas, obtenidas por inyección intracerebral de AMPA en Hipocampo Derecho:

La inyección intracerebral de AMPA en hipocampo derecho generó postdescargas, siendo visualizadas en registros electroencefalográficos (figura 2) y a partir de los cuales se analizaron los siguientes parámetros: (1) Latencia de primera postdescarga, que corresponde al tiempo que transcurre desde la microinyección de AMPA hasta la aparición de la primera postdescarga, (2) Duración promedio de primera postdescarga. (3) Momento de máxima intensidad de postdescarga, que corresponde al tiempo transcurrido desde la microinyección de AMPA hasta la aparición de la postdescarga de mayor duración e intensidad. Los valores de estas tres variables para corteza cerebral derecha, hipocampo derecho e izquierdo y amígdala derecha e izquierda, se muestran en la tabla 1.

El parámetro latencia de primera postdescarga muestra que en promedio la amígdala izquierda fue la primera estructura en presentar una postdescarga (15 ± 12 minutos), y la corteza derecha fue la última zona en presentar una postdescarga (39 ± 42 minutos). Sin embargo las diferencias de latencia entre las cinco estructuras no fueron estadísticamente significativas.

El parámetro duración de primera postdescarga muestra valores similares entre las 5 estructuras, con 18 ± 11 segundos para hipocampo derecho, 21 ± 13 segundos para hipocampo izquierdo, 22 ± 9 segundos para amígdala izquierda, 22 ± 11 segundos para amígdala derecha y 22 ± 13 segundos para corteza derecha, no estableciéndose entre ellas diferencias estadísticamente significativas.

El momento de máxima intensidad de postdescargas en promedio ocurrió primero en corteza derecha (60 ± 49 minutos), luego en las amígdalas derecha e izquierda (66 ± 58 y 70 ± 59 minutos respectivamente), y finalmente en hipocampo derecho e izquierdo (72 ± 58 y 71 ± 52 respectivamente), no obstante estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 1. – Promedio y desviación estándar de corteza cerebral e hipocampo y amígdala de ambos hemisferios, para los tres parámetros analizados.

Parámetros	Corteza Derecha	Hipocampo Derecho	Hipocampo izquierdo	Amígdala derecha	Amígdala izquierda
	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.
Latencia de primera postdescarga (min.)	39 ± 42	31 ± 31	30 ± 30	21 ± 33	15 ± 12
Duración promedio de primera postdescarga (seg.)	22 ± 13	18 ± 11	21 ± 13	22 ± 11	22 ± 9
Momento de máxima intensidad de postdescarga (min.)	60 ± 49	72 ± 58	71 ± 52	66 ± 58	70 ± 59

Procedimiento estadístico: Prueba de Mann–Whitney. Nivel de significancia $p < 0,05$, $n=10$.

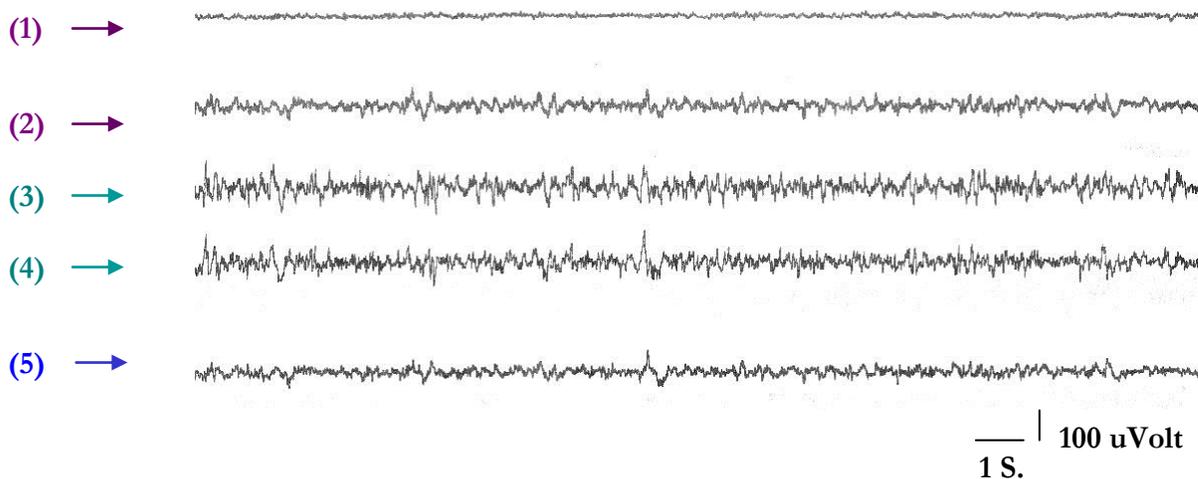


Fig. 1- Registro electroencefalográfico control, el cual presenta un trazado normal con ausencia de postdescargas en todos los canales, después de una microinyección de 5 μ l de suero fisiológico en hipocampo derecho. Los canales de registro son los siguientes: (1) amígdala derecha; (2) amígdala izquierda; (3) hipocampo derecho; (4) hipocampo izquierdo; (5) corteza frontal derecha.

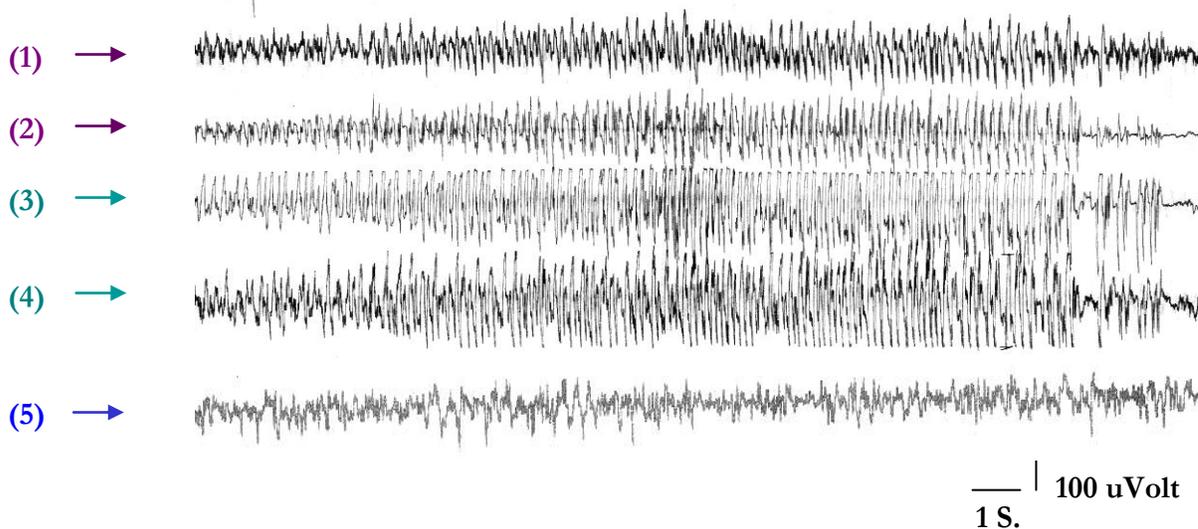


Fig. 2- Registro electroencefalográfico de grupo experimental. Se muestran típicas postdescargas las cuales comprometen a 4 estructuras implantadas con excepción de corteza (canal 5), producto de la microinyección de AMPA 40 mM en hipocampo derecho como agente epileptogénico (canal 3). Los canales de registro son los mismos descritos en fig.1.

3. Caracterización de postdescargas según su amplitud y frecuencia:

En forma adicional se analizaron otros 2 parámetros del EEG; éstos fueron la amplitud de postdescargas y la frecuencia de espigas de cada postdescarga, registradas en corteza frontal derecha, amígdala derecha e izquierda e hipocampo derecho e izquierdo, en el momento de mayor actividad epiléptica. Los valores de estas variables se muestran en la tabla 3.

La amplitud de postdescarga en el momento de mayor actividad epiléptica fue de 437 ± 255 μ volt en hipocampo derecho, 472 ± 252 μ volt en hipocampo izquierdo, 464 ± 263 μ volt en amígdala derecha, 525 ± 310 μ volt en amígdala izquierda y 232 ± 95 μ volt en corteza derecha, siendo esta última significativamente menor que el resto de las estructuras cerebrales ($p < 0,05$) (fig. 3a).

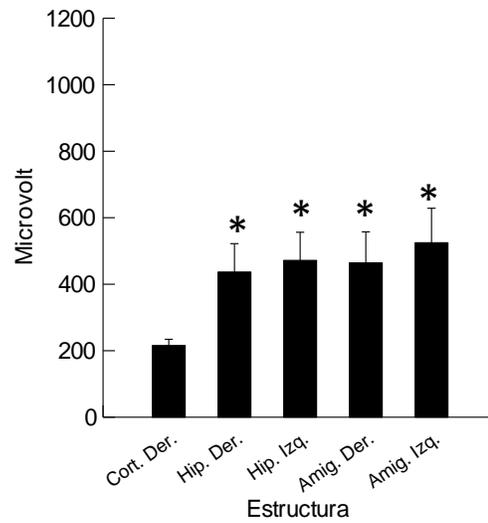
El otro indicador de actividad epiléptica fue la frecuencia de espigas de cada postdescarga en el momento de mayor intensidad, definida como el número de espigas por segundo; en este caso, la frecuencia de espigas de cada postdescarga fue de 14 ± 4 espigas por segundo en hipocampo derecho, 14 ± 3 espigas por segundo en hipocampo izquierdo, 11 ± 3 espigas por segundo en amígdala derecha, 9 ± 3 espigas por segundo en amígdala izquierda y 8 ± 4 espigas por segundo en corteza derecha, siendo esta última significativamente menor que en hipocampo derecho e izquierdo y amígdala derecha ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,05$ respectivamente), no así con amígdala izquierda en donde no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (fig. 3b).

Tabla 2. – Valores de amplitud y frecuencia de espigas en postdescarga de mayor intensidad, en registros electroencefalográficos de gatos con epilepsia.

Variables	Corteza derecha	Hipocampo derecho	Hipocampo izquierdo	Amígdala derecha	Amígdala Izquierda
	Prom. ± D.S.	Prom. ± D.S.	Prom. ± D.S.	Prom. ± D.S.	Prom. ± D.S.
Amplitud de postdescarga de mayor intensidad (μvolt)	216 ± 49	* 437 ± 255	* 472 ± 252	* 464 ± 263	* 525 ± 310
Frecuencia de espigas en postdescarga de mayor intensidad (espigas/seg.)	8 ± 4	* 14 ± 4	* 14 ± 3	* 11 ± 3	9 ± 3

Comparación de hipocampo derecho e izquierdo y amígdala derecha e izquierda con respecto a corteza derecha. Prueba de Mann–Whitney. Nivel de significancia * $p < 0,05$, n=10.

a) Amplitud de postdescarga



b) Frecuencia de espigas durante la postdescarga

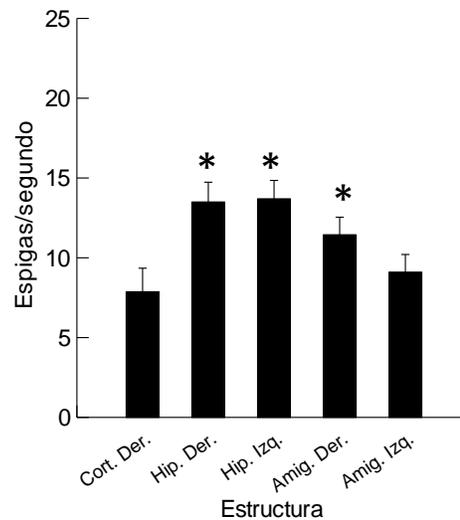


Fig. 3 (a) Comparación de la amplitud de postdescarga (promedio de microvolt \pm D.S.), medido durante el momento de mayor actividad epiléptica, entre corteza cerebral v/s el resto de estructuras cerebrales. **(b)** Comparación de la frecuencia de espigas de postdescargas (promedio de espigas por segundo \pm D.S.) durante el momento de mayor actividad epiléptica, entre corteza cerebral v/s el resto de estructuras cerebrales. Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) ($n=10$).

4. Actividad epiléptica 24 horas y 5 días después de microinyección intracerebral de AMPA:

Con la finalidad de evaluar el curso temporal del foco epiléptico, se tomaron nuevos registros electroencefalográficos, previo al sacrificio de los animales. Estos registros mostraron una disminución en el número de postdescargas tanto a las 24 horas, como a los 5 días después de iniciada la actividad epileptogénica. Las postdescargas fueron reemplazadas por espigas y poliespigas en ambos hipocampos y en ambas amígdalas; corteza cerebral no fue comprometida. (figuras 4 y 5)

5. Observaciones conductuales:

Inyecciones de AMPA 40 mM, diluidos en 5 μ L de suero fisiológico en hipocampo derecho, generaron postdescargas, las que al localizarse principalmente en estructuras subcorticales, desencadenaron conductas en los animales como: rotación persistente de la cabeza y del cuerpo, dilatación pupilar, salivación, y en algunos casos movimientos masticatorios y vocalizaciones repetitivas. Por otro lado, cuando la corteza cerebral fue involucrada, aparecieron síntomas como: clonía de músculos faciales, de párpados y labios. Sin embargo, cabe destacar que en la mayoría de los casos, las postdescargas registradas en hipocampo y amígdala no fueron acompañadas de cambios conductuales evidentes.



Fig. 4- Registro electroencefalográfico de gato 24 horas después de microinyección de AMPA en hipocampo derecho. Los canales de registro son los siguientes: (1) amígdala derecha, (2) amígdala izquierda, (3) hipocampo derecho, (4) hipocampo izquierdo, (5) corteza frontal derecha. Se observan espigas y poliespigas tanto en hipocampos como en ambas amígdalas, las cuales se manifiestan en forma sincronizada.



Fig. 5- Registro electroencefalográfico de gato a los 5 días después de microinyección de AMPA en hipocampo derecho. Se observan espigas y poliespigas de gran amplitud en ambas amígdalas, las cuales descargan en forma sincronizada.

6. Identificación de isoformas de NOS mediante Western Blot:

Se detectaron las tres isoformas de NOS en homogeneizados de cerebro de gato. Para la nNOS se realizó un western blot en homogeneizados de corteza frontal derecha, describiéndose una masa molecular de 160 KDa (fig. 6), para la iNOS también se utilizaron homogeneizados de corteza frontal derecha cuya masa molecular fue de 130 KDa (fig. 7); finalmente para la eNOS se utilizaron homogeneizados de hipocampo derecho, siendo su masa molecular de 140 KDa (fig. 8).

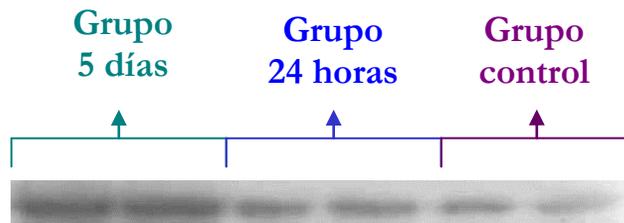


Figura 6. Westernblot de nNOS en homogeneizados de corteza frontal derecha de gatos, tanto del grupo control, como de los grupos de 24 horas y de 5 días de actividad epiléptica. La masa molecular de la nNOS corresponde a 160 kDa.

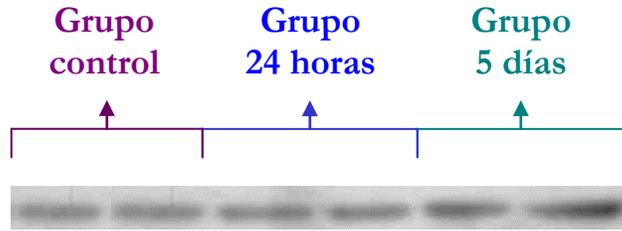


Figura 7. Westernblot de iNOS en homogeneizados de corteza frontal derecha de gatos, tanto del grupo control, como de los grupos de 24 horas y de 5 días de actividad epiléptica. La masa molecular de la iNOS corresponde a 130 kDa.



Figura 8. Westernblot de eNOS en homogeneizados de hipocampo derecho de gatos, tanto del grupo control, como de los grupos de 24 horas y de 5 días de actividad epiléptica. La masa molecular de la eNOS corresponde a 140 kDa.

6. Análisis de isoformas de Oxido Nítrico Sintasa mediante Dot Blot:

Mediante Dot Blot (fig. 9) se detectó la presencia de las tres isoformas de NOS tanto en muestras de corteza cerebral, hipocampo y amígdala, tanto en los grupos control, grupo con 24 horas de actividad epiléptica y grupo con 5 días de actividad epiléptica (previamente descritos). Posteriormente a través de un análisis densitométrico se comparó la cantidad relativa de cada isoenzima presente en cada muestra de tejido cerebral, correspondiente a cada grupo de animales. Las comparaciones se realizaron entre los grupos experimentales con epilepsia con respecto al grupo control, comparándose también por estructura cerebral y para cada isoforma de NOS.

Los datos correspondientes a la nNOS se muestran en la tabla 3, detectándose cambios en hipocampo derecho y corteza cerebral izquierda. En corteza cerebral izquierda, el valor de nNOS para el grupo control fue de $0,56 \pm 0,26$ U.D.; a las 24 horas de iniciada la actividad epiléptica, aumentó la cantidad de nNOS a $1,05 \pm 0,3$ U.D., pero este cambio no fue significativo; sin embargo en el grupo con 5 días de actividad epiléptica los niveles de nNOS aumentaron a $1,28 \pm 0,3$ U.D., estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p < 0,05$) (fig. 10b). Corteza cerebral derecha no mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales de epilepsia. (fig. 10a)

En el grupo control la cantidad relativa de nNOS en hipocampo derecho fue de $1,14 \pm 0,05$ U.D., mientras que en el grupo sacrificado a las 24 horas la cantidad de nNOS fue de $1,00 \pm 0,14$ U.D., esta diferencia no fue significativa. Por su parte en el grupo sacrificado a los 5 días la cantidad relativa de nNOS fue de $2,02 \pm 0,13$ U.D., estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa respecto a los controles ($p < 0,05$) (Fig. 11a). Hipocampo izquierdo en cambio no

presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales y control (fig. 11b).

La amígdala izquierda de gatos sacrificados tanto a las 24 horas como a los 5 días, mostró una tendencia al aumento en la cantidad de iNOS (grupo control: $0,41 \pm 0,19$ U.D., grupo: 24 horas $0,42 \pm 0,25$ U.D., grupo 5 días: $0,53 \pm 0,16$ U.D.), pero esta tendencia no alcanzó significación estadística (tabla 4, fig. 12b). Sólo la amígdala derecha experimentó un aumento estadísticamente significativo respecto a los controles, en el grupo sacrificado a los 5 días ($p < 0,05$), (grupo control: $0,50 \pm 0,30$ U.D., grupo 24 horas: $0,74 \pm 0,13$ U.D., grupo 5 días: $1,13 \pm 0,26$ U.D.), (tabla 4 y fig. 12a).

Finalmente, los principales cambios de la eNOS, ocurrieron en hipocampo derecho e izquierdo y corteza cerebral izquierda (los datos se muestran en la tabla 5). La cantidad relativa de eNOS para hipocampo derecho en el grupo control fue de $0,85 \pm 0,26$ U.D.; en el grupo 24 horas fue de $0,83 \pm 0,56$ U.D.; sin embargo en el grupo 5 días, se registró un aumento estadísticamente significativo con respecto al grupo control de $1,78 \pm 0,3$ U.D. ($p < 0,05$) (fig. 13a). En hipocampo izquierdo, la cantidad relativa de eNOS en el grupo control fue de $1,10 \pm 0,29$ U.D.; en el grupo con 24 horas fue de $1,08 \pm 0,24$ U.D.; en cambio en el grupo de 5 días, los niveles de eNOS aumentaron significativamente con respecto al grupo control ($1,83 \pm 0,36$ U.D.) (fig. 13b).

La eNOS registró cambios también en corteza cerebral izquierda, cuya cantidad relativa en el grupo control fue de $0,71 \pm 0,14$ U.D., estableciéndose un aumento significativo en el grupo con 24 horas de actividad epiléptica ($1,38 \pm 0,63$ U.D.; $p < 0,05$); sin embargo en el grupo con 5 días de actividad epiléptica, no se registró cambios en la cantidad relativa de eNOS con respecto al grupo control ($0,4 \pm 0,08$ U.D.; $p > 0,05$) (fig. 14b). Corteza derecha no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y control (fig. 14a).

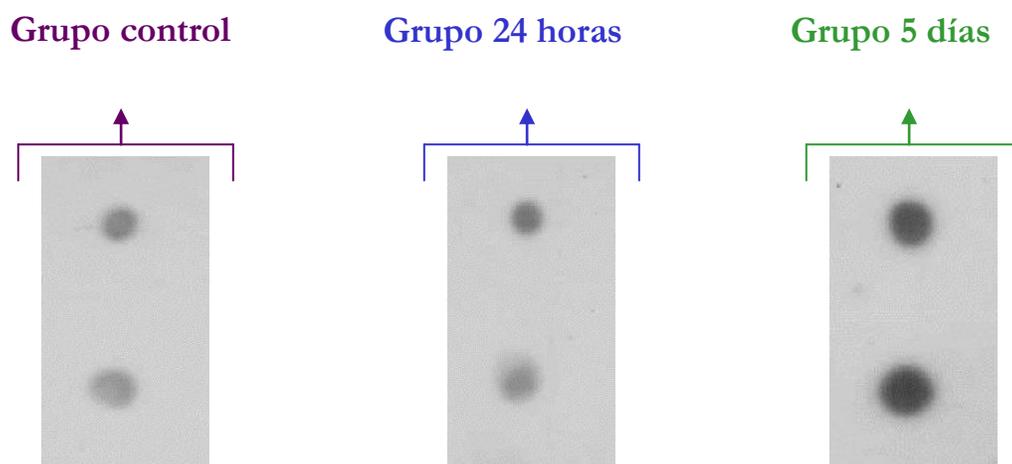


Figura 9. Dot blot de nNOS en homogeneizados de hipocampo derecho de gatos, tanto del grupo control, como de los grupos 24 horas y 5 días de actividad epiléptica.

Tabla 3 – Promedio y desviación estándar de la cantidad relativa de nNOS medido en unidades densitométricas en corteza cerebral, hipocampo y amígdala de ambos hemisferios.

Grupos	Corteza Derecha	Corteza izquierda	Hipocampo derecho	Hipocampo izquierdo	Amígdala derecha	Amígdala izquierda
	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.
Control (n=5)	0,82 \pm 0,24	0,56 \pm 0,26	1,14 \pm 0,05	0,8 \pm 0,37	0,41 \pm 0,22	0,63 \pm 0,19
24 horas (n=5)	0,80 \pm 0,29	1,05 \pm 0,30	1,00 \pm 0,14	0,68 \pm 0,25	0,27 \pm 0,06	0,63 \pm 0,24
5 días (n=5)	1,04 \pm 0,21	1,28 \pm 0,30 *	2,02 \pm 0,13 *	0,88 \pm 0,08	0,43 \pm 0,16	0,51 \pm 0,09

Procedimiento estadístico: Prueba de Mann–Whitney. Nivel de significancia * ($p < 0,05$).

Tabla 4 - Promedio y desviación estándar de la cantidad relativa de iNOS medido en unidades densitométricas en corteza cerebral, hipocampo y amígdala de ambos hemisferios.

Grupos	Corteza derecha	Corteza izquierda	Hipocampo derecho	Hipocampo izquierdo	Amígdala derecha	Amígdala izquierda
	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.
Control (n=5)	0,70 \pm 0,08	0,64 \pm 0,34	1,03 \pm 0,39	1,05 \pm 0,25	0,50 \pm 0,30	0,41 \pm 0,19
24 horas (n=5)	0,62 \pm 0,18	1,26 \pm 0,29	1,38 \pm 0,22	1,18 \pm 0,13	0,74 \pm 0,13	0,42 \pm 0,25
5 días (n=5)	0,94 \pm 0,21	1,04 \pm 0,42	1,38 \pm 0,62	0,87 \pm 0,06	1,13 \pm 0,26 *	0,53 \pm 0,16

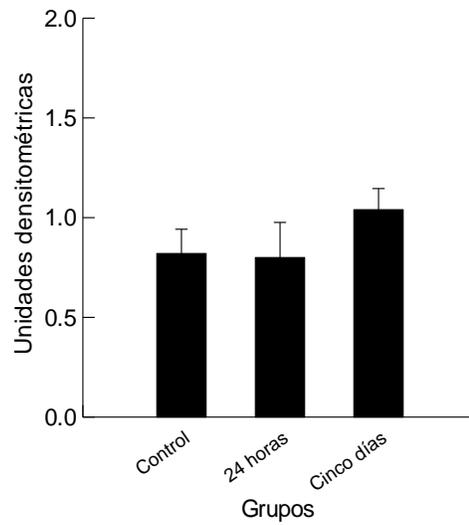
Mismo procedimiento estadístico señalado en tabla 3.

Tabla 5 - Promedio y desviación estándar de la cantidad relativa de eNOS medido en unidades densitométricas en corteza cerebral, hipocampo y amígdala de ambos hemisferios

Grupos	Corteza derecha	Corteza izquierda	Hipocampo derecho	Hipocampo izquierdo	Amígdala derecha	Amígdala Izquierda
Control (n=5)	Prom. ± D.S. 0,85 ± 0,14	Prom. ± D.S. 0,68 ± 0,13	Prom ± D.S. 0,85 ± 0,26	Prom. ± D.S. 1,10 ± 0,29	Prom. ± D.S. 0,22 ± 0,06	Prom. ± D.S. 0,28 ± 0,13
24 horas (n=5)	1,28 ± 0,54	0,93 ± 0,12 *	0,83 ± 0,56	1,08 ± 0,24	0,18 ± 0,06	0,35 ± 0,04
5 días (n=5)	0,98 ± 0,17	0,55 ± 0,24	1,78 ± 0,30 *	1,83 ± 0,36 *	0,20 ± 0,03	0,40 ± 0,13

Mismo procedimiento estadístico señalado en tabla 3.

a) Corteza derecha nNOS



b) Corteza izquierda nNOS

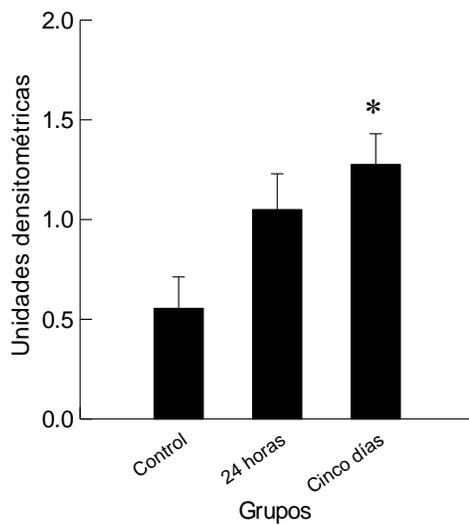
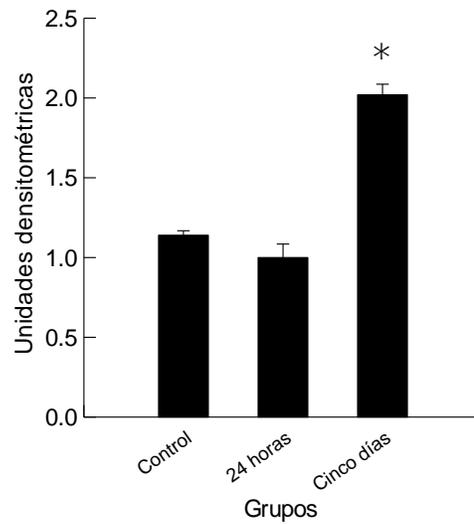


Fig. 10. Comparación del promedio \pm D.S. de unidades densitométricas de la nNOS, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días actividad epiléptica, en las siguientes estructuras: a) Corteza derecha (nNOS), b) Corteza izquierda (nNOS). Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) (n=15).

a) Hipocampo derecho nNOS



b) Hipocampo izquierdo nNOS

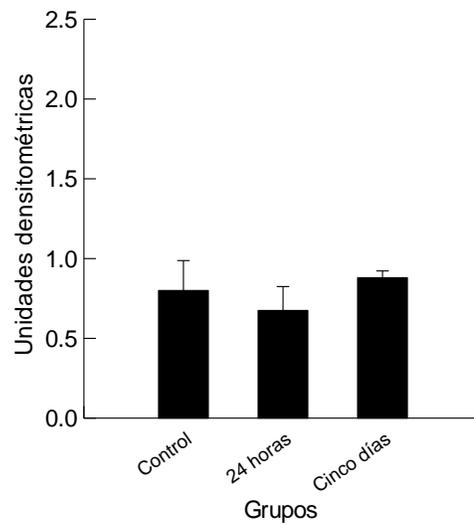
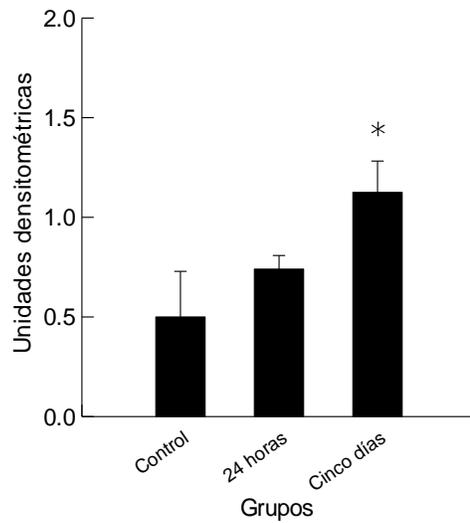


Fig. 11. Comparación del promedio \pm D.S. de unidades densitométricas de la nNOS, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días actividad epiléptica, en las siguientes estructuras: a) Hipocampo derecho (nNOS), b) Hipocampo izquierdo (nNOS). Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) (n=15).

a) Amígdala derecha iNOS



b) Amígdala izquierda iNOS

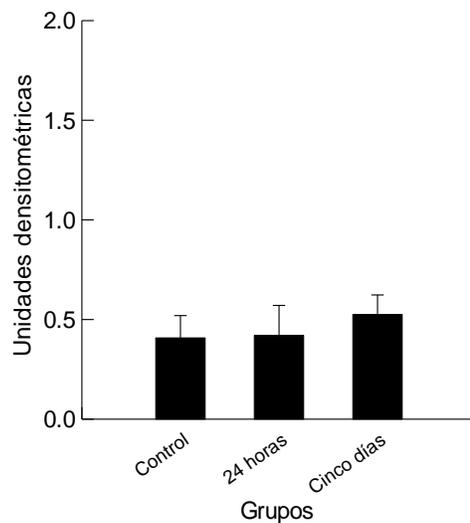
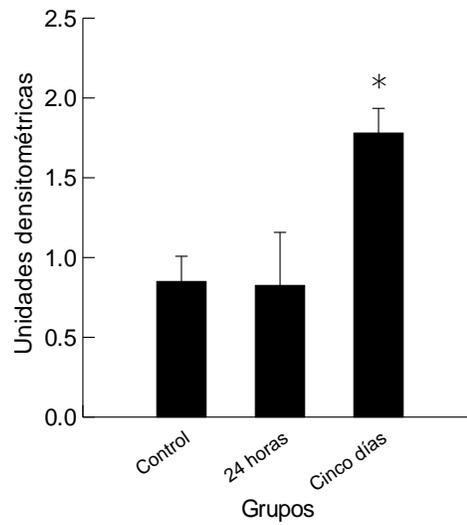


Fig. 12. Comparación del promedio \pm D.S. de unidades densitométricas de la iNOS, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días actividad epiléptica, en las siguientes estructuras: a) Amígdala derecha (iNOS), b) Amígdala izquierda (iNOS). Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) (n=15).

a) Hipocampo derecho eNOS



b) Hipocampo izquierdo eNOS

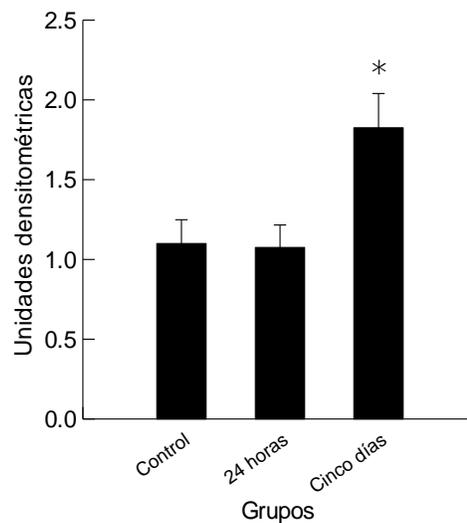
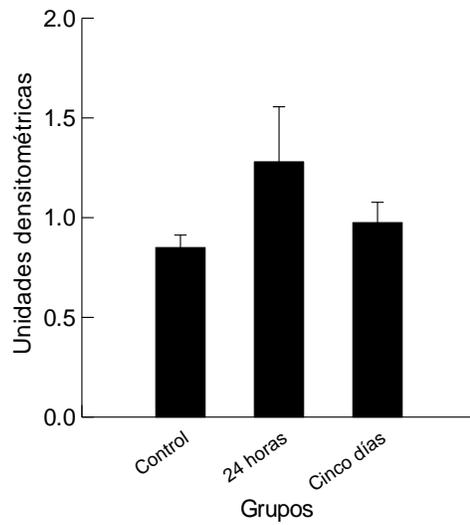


Fig. 13. Comparación del promedio \pm D.S. de unidades densitométricas de la eNOS, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días actividad epiléptica, en las siguientes estructuras: a) Hipocampo derecho (eNOS), b) Hipocampo izquierdo (iNOS). Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) (n=15).

a) Corteza derecha eNOS



b) Corteza izquierda eNOS

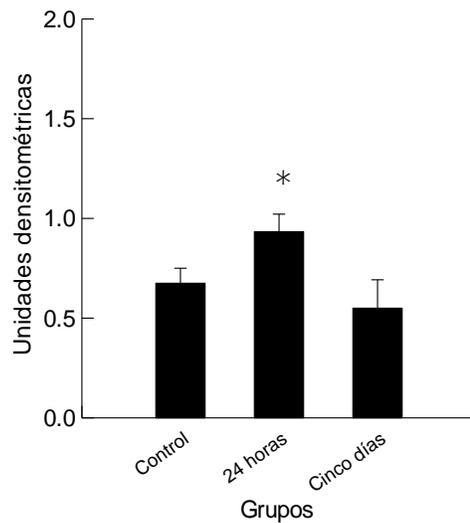


Fig. 14. Comparación del promedio \pm D.S. de unidades densitométricas de eNOS, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días de actividad epiléptica, en las siguientes estructuras: a) Corteza derecha (eNOS), b) Corteza izquierda (iNOS). Diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney ($* p < 0,05$) (n=15).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que AMPA 40 mM inyectado mediante cánula intracerebral en hipocampo derecho, fue efectivo en producir focos epilépticos crónicos, tanto en la zona de microinyección, como en estructuras relativamente distantes pero interconectadas, como son el hipocampo contralateral, amígdalas derecha e izquierda y la neocorteza asociativa. En relación a esto, cabe señalar que la capacidad tanto de corteza cerebral, amígdala e hipocampo de generar focos epilépticos, ha sido estudiada en varios modelos experimentales de epilepsia; en esta línea de investigación Infante, *et al.* (2002) encontró una mayor sensibilidad en la iniciación de un foco epiléptico en hipocampo, en comparación a amígdala y de ésta con respecto a corteza cerebral, al inyectar intracerebralmente ácido kaínico 4,6 mM en las estructuras mencionadas, en gatos adultos crónicamente implantados. Por otro lado Motles *et al.* (2002) demostró en gatos adultos crónicamente implantados una mayor capacidad de AMPA en generar focos epilépticos crónicos en amígdala e hipocampo, comparado con el efecto de NMDA y ACPD (todos agonistas de glutamato). Estos estudios junto con el presente trabajo, apoyan por lo tanto la importancia tanto de la corteza cerebral, amígdala e hipocampo, como estructuras susceptibles de generar focos epilépticos (Bernard *et al.* 1995).

Cabe destacar, que un requisito importante de este trabajo era el poder generar un fenómeno epiléptico restringido, en donde la hiperactividad excitatoria se localizara sólo en algunas estructuras subcorticales, sin comprometer a todo el cerebro; para ello el grado de hiperexcitabilidad neuronal debió ser lo más tenue posible. Por lo tanto fue necesario monitorear la actividad bioeléctrica en diferentes estructuras cerebrales, considerando algunas variables electroencefalográficas que describieran el fenómeno. En primer lugar la

comparación entre las diferentes estructuras estudiadas se realizó sobre la base de variables como: (a) promedio de latencia de primera postdescarga, (b) duración promedio de primera postdescarga, (c) tiempo promedio en alcanzar el momento de máxima intensidad de postdescarga; estas tres variables en conjunto mostraron que hipocampo, amígdala y corteza cerebral fueron similarmente sensibles en la generación de focos epilépticos y que su evolución en el tiempo fue similar. Sin embargo, cuando se analizaron las postdescargas considerando la amplitud de las espigas (el cual es un indicador de la intensidad de la hiperexcitabilidad que presenta un grupo de neuronas en un momento dado) y la frecuencia de espigas en cada postdescarga, (medido como el número de espigas por segundo y que a su vez es un indicador de las veces en que un grupo de neuronas modifica su estado de depolarización, visualizado en el EEG como una espiga-onda), los datos muestran que el tipo de actividad epiléptica desencadenada tuvo una mayor intensidad en hipocampo y amígdala, siendo significativamente menor en corteza cerebral. A su vez, la actividad epiléptica fue igualmente intensa entre hipocampos y amígdalas, con excepción de la amígdala izquierda que en el momento de mayor intensidad, tuvo una menor frecuencia de espigas. Los datos obtenidos permiten señalar en términos globales que el tipo de condición epiléptica generada en este estudio estuvo fundamentalmente circunscrito a estructuras subcorticales, con un menor compromiso de corteza cerebral, cumpliéndose el primer objetivo de este trabajo. Cabe señalar además, que la máxima actividad epiléptica se produjo durante las primeras 2 horas después de la inyección de AMPA; a partir de entonces comenzó a disminuir en forma progresiva, de tal forma que a las 24 horas y a los 5 días posterior a la inyección, sólo se detectaron espigas en el electroencefalograma.

Otro aspecto importante, fueron los cambios conductuales obtenidos en forma experimental, los cuales se asemejan a la llamada epilepsia psicomotora, en

donde lo central del cuadro son alteraciones de la conducta, sin la presencia de convulsiones. En este tipo de epilepsia, el fenómeno de hiperexcitabilidad y sincronización neuronal se encuentra también circunscrito a estructuras subcorticales, pudiendo comprometer en la especie humana además al lóbulo temporal, razón por la cual también se encuentra en la literatura como epilepsia del lóbulo temporal (Dow y Hoover, 1992). En el gato en particular, Kline (1998) describe una gran variedad de trastornos conductuales asociados a la etapa de aura o pre-ictus, que incluyen episodios de agresividad, inquietud, maullidos, dilatación pupilar, salivación, masticación, los cuales pueden durar desde segundos a días, dependiendo de la intensidad del fenómeno. Estos datos, resultan especialmente interesantes, si se considera que la gran mayoría de las epilepsias en el gato son de tipo focal y secundarias a alguna patología cerebral como tumores, infartos o enfermedades infecciosas (Kline, 1998). Estos resultados podrían sugerir que los cambios conductuales que ocurren en la etapa de aura (fase previa a la etapa de ictus) de algunos gatos, podrían ser consecuencia de un foco epiléptico en estructuras subcorticales, en particular del sistema límbico, que al propagarse al resto del cerebro, podrían desencadenar la etapa de ictus propiamente tal, caracterizada por crisis tónico-clónicas. No obstante, se necesitan nuevos estudios que comprueben dicha hipótesis.

Con respecto a la expresión de las isoformas de NOS, los resultados muestran que el tipo de condición epiléptica obtenida, fue suficiente para provocar cambios en la concentración relativa de esta enzima. La nNOS en homogeneizados de corteza cerebral izquierda e hipocampo derecho aumentó luego de 5 días de actividad epiléptica. La iNOS en homogeneizados de amígdala derecha aumentó también a los 5 días de inducido el cuadro. La eNOS aumentó tanto en homogeneizados de corteza derecha a las 24 horas de desencadenado el cuadro, como en hipocampos derecho e izquierdo a los 5 días de inducido el

cuadro. En esta misma dirección, estudios previos también han mostrado un incremento en la expresión de isoenzimas de NOS en varios modelos animales de epilepsia (Lumme *et al.* 2000; González-Hernández *et al.*, 2000), sin embargo éstos trabajos se han enfocado en estudiar una estructura cerebral en particular, la que corresponde al foco inicial de actividad epiléptica. El presente estudio extiende los conocimientos previos, al demostrar que pueden ocurrir aumentos en la expresión de NOS no sólo en el foco inicial, sino además en estructuras cerebrales distantes pero interconectadas, involucrando a más de una isoforma de NOS, situación que además se da asociada a un curso temporal definido y a un tipo de actividad epiléptica restringida y de baja intensidad.

Nuestros datos enriquecen la información de trabajos previamente citados, los cuales sólo han reportado aumentos de la nNOS; es así como González-Hernández *et al.* (2000) demostró que sólo la nNOS está sobre expresada en la corteza cerebral de pacientes humanos con epilepsia, con un largo historial de convulsiones y que éste incremento proviene de una subpoblación de neuronas gabaérgicas no-piramidales. En esta misma dirección, Lumme *et al.* (2000) utilizando un modelo animal de *status epilepticus* en rata, mediante estimulación de la vía perforante del hipocampo, encontró un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a nNOS, tanto en el stratum radiatum de las capas CA1 y CA3 del hipocampo, como en neuronas del hilus del gyrus dentado, correspondiendo en todos los casos a interneuronas.

A partir de la información presente en la literatura, era posible esperar una sobreexpresión de la nNOS en este modelo de epilepsia en gato, situación no del todo clara para las otras isoformas. En el caso de la iNOS, comúnmente asociada sólo a cuadros inflamatorios, en este estudio apareció en todos los tejidos, tanto en los grupos experimentales como control, lo que podría sugerir una condición inflamatoria basal en dichos tejidos. En este sentido, la respuesta de los tejidos a

la presencia de electrodos y de la cánula podría ser un factor a considerar; no obstante, en estudios anteriores en este mismo modelo de epilepsia, se ha demostrado mediante histología el bajo compromiso inflamatorio del tejido cerebral frente a implantes crónicos de electrodos; incluso el efecto del AMPA genera un daño neuronal muy bajo en relación a otros agonistas de glutamato, como el ácido kaínico (Motles *et al.*, 2002). No obstante, sólo en amígdala derecha a los 5 días después de la inyección de AMPA, este aumento fue significativo con respecto a los otros grupos, pudiendo ser atribuido a la condición de hiperexcitabilidad neuronal.

En el caso de la eNOS, llama la atención su sobreexpresión bilateral en hipocampo. La ubicación de esta isoforma fue inicialmente descrita en endotelios de vasos sanguíneos, en donde el NO tendría un rol como agente vasodilatador; no obstante Dinerman *et al.* (1994) demostró mediante inmunohistoquímica que la eNOS también se encuentra normalmente expresada en células piramidales del hipocampo de rata, junto con la nNOS, la cual se encuentra en interneuronas del hipocampo y en donde el NO jugaría un rol como modulador de la transmisión sináptica. Debido a lo anterior, cabe plantearse si en el gato también se repite dicha situación; siendo necesarios nuevos estudios para comprobarlo. En este mismo sentido, también cabe dilucidar si la sobreexpresión de eNOS en corteza izquierda, detectada a las 24 horas de inducido el cuadro, está circunscrita a endotelios o a células nerviosas.

Estas diferencias, tanto en la forma en que se da la expresión de las isoformas de NOS en el tiempo, como en las estructuras cerebrales involucradas, podrían explicarse por los diferentes tipos de actividad epiléptica generada. En relación a esto último, cabe preguntarse también sobre las consecuencias que acarrear los aumentos de NOS en cerebros epilépticos, sin embargo la literatura ha mostrado resultados contradictorios, describiéndose efectos tanto

proepilépticos (De Sarro *et al.* 1991; Osonoe *et al.* 1994) como antiepilépticos (Marangoz *et al.* 1994; Boda y Szente 1996). Estas diferencias se podrían atribuir a la evaluación de diferentes estructuras, a la falta de evaluaciones de curso temporal en las estructuras consideradas y a la diferentes aproximaciones experimentales, en donde podrían generarse variaciones tanto en el lugar en donde se produce NO, su concentración en un lugar determinado y las isoformas de NOS involucradas en el fenómeno. En esta misma línea, resulta interesante el trabajo de Nie *et al.* (1996), quien describe un aumento en la liberación de glutamato mediado por NO, a través de la activación de receptores NMDA ubicados en la terminal postsináptica en el gyrus dentado del hipocampo en cobayos; lo que estaría promoviendo un estado de hiperexcitabilidad en aquella zona. En oposición a este resultado, Sequeira *et al.* (2001) describe una inhibición en la liberación de glutamato mediado por NO, a través de la activación de receptores NMDA ubicados en la terminal presináptica en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo y no en el gyrus dentado, postulando un efecto neuroprotectivo en aquellas zonas, al limitar la liberación de glutamato a través de la activación de la NOS ubicada en las terminales presinápticas. Estos trabajos permitirían postular que los aumentos de las isoformas de NOS tendrán distintos efectos, dependiendo de la zona del cerebro en que ocurra este aumento y de su ubicación ya sea presináptica o postsináptica.

Es por ello, que a partir del presente trabajo resultaría de interés poder describir a futuro los tipos de neuronas comprometidas en la sobreexpresión de las isoformas de NOS en los tejidos estudiados; así como determinar la ubicación predominante en los terminales presinápticos o postsinápticos, a fin de intentar establecer como el NO modula tanto a favor como en contra los estados de hiperexcitabilidad neuronal en aquellas zonas del cerebro.

Finalmente, cabe mencionar que los cambios en la expresión de las isoformas de NOS descritos en este trabajo, fueron detectados en momentos en que la condición epiléptica inducida se encontraba en una disminución progresiva, como lo demuestran los registros EEG obtenidos tanto a las 24 horas como a los 5 días de iniciado el cuadro (fig. 4 y 5 respectivamente). Esta situación, podría sugerir una respuesta adaptativa del cerebro a la condición epiléptica inicial, pudiéndose plantear la hipótesis de que en este caso los cambios en la expresión de las isoformas de NOS, formarían parte del repertorio con que cuenta el cerebro para controlar los estados de hiperexcitabilidad neuronal. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios que corroboren dicha hipótesis.

CONCLUSIONES

1. La aplicación intracerebral de AMPA 40 mM en hipocampo derecho, generó una actividad epiléptica circunscrita a ambos hipocampos y amígdalas, con un mínimo compromiso de la corteza asociativa.
2. La actividad epiléptica generada de manera experimental, provocó cambios electroencefalográficos y conductuales con ausencia de convulsiones.
3. La aplicación intrahipocámpica unilateral de AMPA, generó cambios regionales y temporales en la expresión de las isoformas de NOS. La única estructura comprometida bilateralmente en estos casos fue hipocampo; por su parte amígdala y corteza cerebral sufrieron cambios unilaterales. Los cambios observados en amígdala fueron ipsilaterales al punto de inyección, mientras que los cambios en corteza cerebral fueron contralaterales.
4. Todos los cambios en la expresión de las isoformas de NOS ocurrieron a los 5 días, con excepción de la eNOS en corteza cerebral izquierda, cuyo aumento se observó a las 24 horas de iniciada la inyección intracerebral.
5. Las isoformas con mayores cambios en su expresión fueron la eNOS y la nNOS. La iNOS sólo alteró su expresión en amígdala derecha.

BIBLIOGRAFÍA

- **Bernard, C.L. y Wheal, H.V.** 1995. Plasticity of AMPA and NMDA receptor-mediated epileptiform activity in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 21:95-107.
- **Boda, B.; Szente M.** 1996. Nitric oxide inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neuroscience Letters* 209:37-40.
- **Dawson, T.M.; Dawson, V.L.** 1996. Nitric oxide synthase: Role as a Transmitter/Mediator in the Brain and Endocrine System. *Annual Review of Medicine* 47:219-227.
- **De Sarro, G. B.; Di Paola D.E.; De Sarro, A.; Vidal, M.J.** 1991. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 5:503-511.
- **Dinerman, J. L.; Dawson, T. M.; Schell, M. J.; Snowman, A.; Snyder, S. H.** 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 4214-4218.
- **Fagg, G.H.; Foster, A.C.; Ganong, A.H.** 1986. Excitatory aminoacid synaptic mechanisms and neurological function. *Trends in Pharmacological Sciences* 7:357-363.
- **Garthwaite, J.; Boulton, C.L.** 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology* 57:683-706.
- **Grisham, M.B.; Jourd'heuil, D.; Wink, D.A.** 1999. Nitric Oxide. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Annual Review of Physiology* 276:315-321.

- **González-Hernández, T.; García-Marín, V.; Pérez-Delgado M.; González-González, M.L.; Rancel-Torres, N.; González-Feria, L.** 2000. Nitric oxide synthase expression in the cerebral cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia* 41:1259-1268.
- **Gross, S.S.; Wolin, M.S.** 1995. Nitric Oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology* 57:737-769.
- **Herberg, L.T.; Grottick, A.; Rose, I.C.** 1995. Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. *Psychopharmacology* 119:115-123.
- **Infante, C.; Cartier, L.; Motles, E.** 2002. Comparative study of the epileptogenic effect of kainic acid injected into the cerebral cortex, hippocampus and amygdala in adult cats chronically implanted. *Archives Italiennes de Biologie* 140:31-40.
- **Kline, K.L.** 1998. Epilepsy Feline. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 13 (3):152-158.
- **Krukoff, T.L.** 1999. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Research Reviews* 30:52-56.
- **Licinio, J.; Prolo, P.; McCann, S.M.; Wong, M.** 1999. Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Molecular Medicine Today* 5:225-232.
- **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- **Lumme, A.; Soinila, S.; Sadeniemi, M.; Halonen, T.; Vanhatalo, S.** 2000. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat hippocampus after status epilepticus induced by perforant pathway stimulation. *Brain Research* 871:303-310.

- **Marangoz, C.; Ayyildiz, M.; Agar, E.** 1994. Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide. *NeuroReport* 5:2454-2456.
- **Motles, E.** 1993. *Fisiopatología del Sistema Nervioso. Publicaciones Técnicas Mediterráneas.* Santiago Pp: 218-230.
- **Motles, E.; Cartier, L.; Infante, C.** 2002. Induction and blockade of epileptic foci by intracerebral injection of glutamatergic agonists and antagonists in freely moving cats. *Archives Italiennes de Biologie* 140:40-41.
- **Nei, K.; Matsuyama, S.; Shuntoh, H.; Tanaka, C.** 1996. NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Research* 728:105-110.
- **Osonoe, K.; Mori, N.; Susuki, K.; Osonoe, M.** 1994. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Brain Research* 663:338-340.
- **Reinoso-Suárez, F.** 1961. *Topographische Hirnatlas der Katze.* Darmstadt, Merck. 57 Pp.
- **Roberts, E.** 1986. Failure of GABAergic Inhibition: A key to local and global seizures. *Advances in Neurology* 44:319-341.
- **Sequeira, S.M.; Malva, J.O.; Carvalho, A.P.; Carvalho, C.M.** 2001. Presynaptic N-methyl-d-aspartate receptor activation inhibits neurotransmitter release through nitric oxide formation in rat hippocampal nerve terminals. *Molecular Brain Research* 89:11-118.
- **Sorjonen, D. C.** 1992. *Psicomotor Seizures in Dogs.* Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Small Animals Practice. Philadelphia Pp: 992-995.
- **Taucher, E.** 1999. *Bioestadística.* Editorial Universitaria. Santiago. Pp: 191-194.

- **Zimmermann, M.** 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109-110.