



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DE LA GENERACIÓN DE UN FOCO
EPILÉPTICO POR AMPA SOBRE LA ACTIVIDAD ÓXIDO
NÍTRICO SINTASA EN HIPOCAMPO, AMÍGDALA Y
CORTEZA CEREBRAL DE GATOS.

MARIELA LIBERONA TOBAR

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

PROFESOR GUÍA: CLAUDIO INFANTE

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFEECTO DE LA GENERACIÓN DE UN FOCO EPILÉPTICO POR AMPA SOBRE LA ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN HIPOCAMPO, AMÍGDALA Y CORTEZA CEREBRAL DE GATOS.

MARIELA LIBERONA TOBAR

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CLAUDIO INFANTE
PROFESOR CONSEJERO: LUIS ADARO
PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
OBJETIVOS	18
Objetivos generales	18
Objetivos específicos	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Animales	19
Procedimiento quirúrgico	19
Generación del foco epiléptico	20
Obtención del electroencefalograma	22
Obtención de las muestras	22
Preparación del homogeneizado	23
Medición de la concentración de proteínas de la fracción cruda	23
Medición de la actividad enzimática de NOS	23
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
1. Registro electroencefalográfico	26
1.1. Actividad electroencefalográfica en grupos controles	26
1.2. Caracterización de postdescargas según su amplitud y frecuencia	26
1.3. Actividad epiléptica en grupos experimentales	29
2. Observaciones conductuales.	29
3. Actividad NOS mediante cromatografía de intercambio iónico	30
3.1. Actividad NOS en grupos controles	30
3.2. Actividad NOS en grupos experimentales	35
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 –isoxazolpropionato.

BH4: Tetrahidrobiopterina

EEG: Electroencefalograma

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

FAD: Flavin adenina dinucleótido

FMN: Flavin mononucleótido

GABA: Ácido γ -amino-butírico.

GMPC : Guanosín monofosfato cíclico.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal.

NO: Óxido nítrico

PLM: Peroxidación lipídica de membrana

NOS: Óxido nítrico sintasa

SEM: Error medio estándar

RESUMEN

La epilepsia es una patología del sistema nervioso central, cuyo origen puede ser genético o adquirido. El fenómeno fisiopatológico más importante que la produce es la hiperexcitabilidad de grupos de neuronas, las cuales disparan estos potenciales en forma repetitiva y sincrónica.

Durante los últimos años se ha estudiado a un nuevo mensajero neuronal, el óxido nítrico (NO), un gas radical libre de vida media corta, que participa en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Si bien, el rol del NO en otros sistemas está relativamente claro, no se conoce claramente su efecto en la epilepsia.

El objetivo de esta memoria es determinar la actividad de la enzima que produce el NO, la óxido nítrico sintasa (NOS), en las estructuras cerebrales que presentan los más bajos umbrales epileptogénicos, como son el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral.

La actividad enzimática se determinó en un grupo control y dos grupos de animales experimentales, de los cuales se obtuvo las muestras a un día y cinco días después de la administración del agente epileptogénico AMPA en el hipocampo derecho. La determinación de la actividad epiléptica en estas estructuras se realizó por electroencefalograma (EEG) y la actividad enzimática de la NOS se determinó por la conversión de arginina a citrulina, usando ³H-arginina. La separación de la arginina de la citrulina se realizó por cromatografía de intercambio iónico.

Las estructuras con mayor compromiso epiléptico determinado con la técnica de registro electroencefalográfico fue el hipocampo y la amígdala. Desde el punto de vista de la actividad enzimática de la NOS, los resultados señalaron una disminución en hipocampo derecho e izquierdo 5 días después de la microinyección del agente epileptogénico AMPA. Por su parte, en corteza cerebral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad en ninguna de las etapas estudiadas. A nivel de la amígdala se observó una disminución de la

actividad de la NOS en el hemisferio izquierdo, contralateral al sitio de la microinyección.

Estos resultados señalan que la actividad de la NOS en las estructuras más sensibles a la descarga epiléptica, disminuye en las etapas tardías del proceso epiléptico. Sin embargo, se necesitan más estudios que puedan corroborar las nuevas interrogantes que surgen sobre la regulación de la actividad de la enzima, particularmente en los primeros momentos de la generación del proceso epiléptico.

SUMMARY

Epilepsy is a disease of the central nervous system, whose origin can be either genetic or acquired in nature. The most important physiopathic phenomena of epilepsy is neural hyperexcitability, which causes synchronous and repetitive firing.

In recent years, studies have been conducted on a new neuronal messenger, nitric oxide (NO), a radical gas exhibiting a short half-life, which is involved in a variety of physiological and pathological processes. Whereas the role of NO in other systems is relatively clear, its effect on epilepsy is not established.

The purpose of this thesis is to determine the activity of the enzyme which produces NO, nitric oxide synthase (NOS) in the brain structures that exhibit the lowest epileptogenic thresholds, such as the hippocampus, the amygdala and the cerebral cortex.

Enzyme activity was determined in a control group and in two groups of experimental animals, where samples were obtained at one day and five days after microinjection of the epileptogenic agent AMPA into the right hippocampus. Epileptic activity in the hippocampus was measured by electroencephalogram (EEG), and NOS activity was determined by the conversion of arginine into citrulline, using ³H-arginine. Separation of arginine and citrulline was performed by ion exchange chromatography.

Using the EEG readings, it was determined that the structures with the greatest epileptic activity were the hippocampus and the amygdala. Data collected on NOS indicated lows in the right and left hippocampi five days after the administration of the epileptogenic agent AMPA. With regards to the cerebral cortex, no statistically significant differences were noted at any phase of the study. In the amygdala, diminished activity of NOS was noted in the left hemisphere, which is the hemisphere contralateral to the site of the microinjection of the epileptogenic agent, AMPA.

These results indicate that the activity of NOS in the areas most sensitive to epileptic discharge decreases in the later stages of the epileptic process. However, additional studies are needed to investigate new questions arising about enzymatic activity regulation as it pertains to the initial phases of the generation of epileptic process.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las patologías del sistema nervioso central la epilepsia tiene una alta prevalencia y constituye un importante problema de salud, tanto en la población humana como en la casuística veterinaria. Por estas razones es de gran interés estudiar los procesos patológicos que la producen. La diversidad de variables presentes en esta patología neurológica hace difícil su tratamiento y es la que nos ha motivado a estudiar los procesos fisiopatológicos que la generan.

El fenómeno fisiopatológico más importante en la epilepsia es el desbalance interactivo entre circuitos excitatorios e inhibitorios. Este desbalance genera hiperexcitabilidad neuronal, que corresponde a un aumento de la capacidad del tejido nervioso de disparar potenciales de acción. El foco epiléptico aparece cuando grupos de neuronas disparan sincrónicamente estos potenciales de acción.

En la actualidad está demostrado el papel esencial de neurotransmisores en la regulación de diversas funciones neuronales. En los últimos años se ha descrito la participación de un nuevo mensajero neuronal, el óxido nítrico (NO). A partir de los primeros estudios realizados por Furchgott y Zawadzki (1980), quienes lo denominaron inicialmente como factor relajante derivado del endotelio (EDRF), se ha demostrado un sinnúmero de acciones fisiológicas, bioquímicas y patológicas, en las que interviene directa o indirectamente.

Dado que el análisis de los mecanismos moleculares involucrados en la generación de un foco epiléptico es complejo, en esta memoria nos interesó conocer la participación de uno de ellos, específicamente la enzima responsable de la síntesis de NO, la óxido nítrico sintasa (NOS) y su relación con la epilepsia.

Para ello estudiamos la actividad NOS en las estructuras cerebrales que presentan los más bajos umbrales epileptogénicos, tales como hipocampo, amígdala y corteza cerebral (Swanson y Petrovich, 1998).

La presente memoria de título pretende realizar alguna contribución al entendimiento de la relación entre la NOS y la epilepsia, estudiando las variaciones

de la actividad de esta enzima en un modelo experimental de epilepsia, inducida por el agonista glutamatérgico AMPA, en el gato.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La epilepsia es una patología del sistema nervioso central que se define como un proceso crónico, repetitivo, que se expresa por períodos que van de algunos segundos a varios minutos y con intervalos variables entre los periodos de manifestación. Un porcentaje de los casos aparece como una complicación adquirida del sistema nervioso, ya sea secuela de un traumatismo craneano, tumores, hemorragias, infecciones o procesos degenerativos. Otra causa es de origen genético o idiopático (Motles et al, 1993).

El principal signo clínico en las epilepsias mas graves es la crisis tónico clónica con perdida de conciencia, sin embargo, es importante destacar que existen otros tipos de epilepsias menos graves entre las cuales se cuentan, las ausencias, las alucinaciones auditivas, percepción de olores y otras que muestran cambios conductuales. Por lo tanto, estamos designando como epilepsia a una gran variedad de cuadros sintomáticos que reconocen como causa un estado de hiperexcitabilidad neuronal (Motles et al, 1993).

El fenómeno fisiopatológico más importante que produce la epilepsia es el desbalance interactivo entre circuitos excitatorios (representado principalmente por glutamato y aspartato) e inhibitorios (representado por GABA). El desbalance, que puede ser el resultado de una disminución de la inhibición y/o aumento de la excitación, genera hiperexcitabilidad neuronal, esto es, un aumento de la capacidad del tejido nervioso de disparar potenciales de acción en forma repetitiva. El foco epiléptico aparece cuando grupos de neuronas disparan sincrónicamente estos potenciales de acción (Motles et al, 1993).

Desde el punto de vista electroencefalográfico, el estudio de registros con electrodos, que recogen la actividad integrada de muchas neuronas, revelan como signo patognomónico de hiperexcitabilidad neuronal la espiga o la espiga-onda. El registro puede realizarse con macroelectrodos colocados sobre el cuero cabelludo en la especie humana o con electrodos implantados quirúrgicamente en estructuras cerebrales profundas en animales de experimentación. Las espigas pueden presentarse aisladamente, o bien se presentan agrupadas durante un periodo

breve, produciendo lo que se llama postdescarga. La aparición de postdescargas generalmente coincide con la aparición de las manifestaciones clínicas, sean ellas o no manifestaciones convulsivas. Sin embargo en algunos casos se puede producir postdescargas sin manifestaciones clínicas (Motles et al, 1993).

Durante los últimos años, el rol del glutamato en la epilepsia y en otras enfermedades del sistema nervioso ha sido muy relevante. Este neurotransmisor es liberado en el espacio sináptico mediante la despolarización del terminal presináptico y ejerce su acción al unirse a receptores glutamatérgicos ubicados en la membrana pre-sináptica y post-sináptica. Puede actuar uniéndose a una variedad de receptores, algunos de los cuales tienen canales a través de los que hay flujo de iones como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y son llamados receptores ionotrópicos (Infante et al, 2002). Otros agonistas glutamatérgicos activan una proteína G y son llamados receptores metabotrópicos (Fagg et al, 1986).

Dentro de los receptores ionotrópicos se describen tres tipos:

- Receptores NMDA
- Receptores Quisqualato o AMPA , y
- Receptores Kainato (Fagg et al, 1986).

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

Durante los últimos años se ha estudiado a un nuevo mensajero neuronal, el óxido nítrico (NO), un gas, radical libre de vida media corta en medios biológicos. En los primeros estudios realizados en 1980 por Furchgott y Zawadzki se le denominó Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF), desde entonces ha sido implicado en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos y cuyo mecanismo de síntesis se asocia en el sistema nervioso a activación de receptores NMDA (Ferrer y Fonseca, 1998).

En el sistema nervioso, el NO actúa como neurotransmisor, además participa en la regulación de procesos como la vasodilatación sanguínea activando la

guanidilciclasa (GC), lo que provoca el aumento intracelular de GMPc que es el mediador de sus efectos como vasodilatador (Ferrer y Fonseca, 1998); en la activación de macrófagos en el sistema inmune, movimientos de peristalsis en el sistema digestivo y el plexo pélvico y erección del pene; en el sistema nervioso central regula la liberación de hormonas del eje hipotálamo-hipófisis, las conductas sexuales y de agresividad y hay evidencias de que tendría un importante rol en la regulación de la plasticidad sináptica, en la morfogénesis y en la mediación del dolor (Dawson y Dawson, 1996).

Bajo condiciones patológicas, altas concentraciones de NO pueden ser beneficiosas (antibacteriano, antiparasitario, antiviral), pero también se ha descrito la participación de NO en procesos de neurotoxicidad (Dawson y Dawson, 1996). En la enfermedad de Parkinson disminuye los receptores de dopamina, lo cual aumenta la formación de peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo. El daño selectivo se incrementa con la edad, lo que sugiere la implicación del NO en una variedad de enfermedades neurodegenerativas (Dawson y Dawson, 1996).

La activación de los receptores NMDA y el subsecuente aumento de Ca^{2+} intracelular, presumiblemente inicia la mayoría de los procesos de toxicidad mediados por glutamato, la NOS es una enzima dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, por lo tanto, también será modulada por la presencia de este ión (Dawson y Dawson, 1996).

El mecanismo por el cual el NO se vuelve nocivo, es el siguiente: hay cuatro radicales: superóxido, hidroxilo, peróxido y óxido nítrico. Todas estas moléculas son muy reactivas y pueden causar daño celular, especialmente de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. De todas estas sustancias, el radical hidroxilo es el más nocivo, ya que puede producir el daño celular en fracción de segundos al provocar peroxidación lipídica de la membrana (PLM). El NO al interactuar con el anión superóxido forma el peroxinitrito, capaz de producir daño directo a las proteínas y al ADN e incluso inducir la PLM, modificando la activación de los canales iónicos y la liberación de neurotransmisores (Ferrer y Fonseca, 1999).

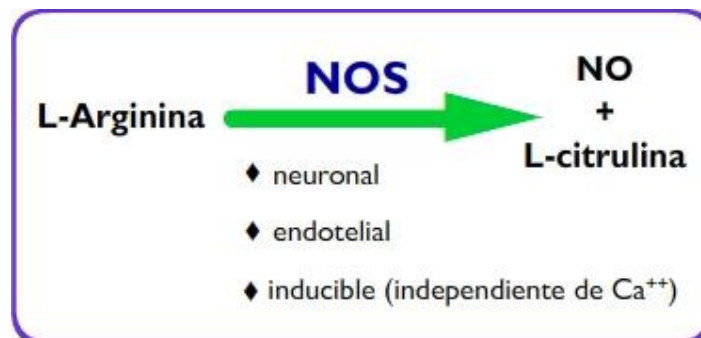
El óxido nítrico se libera por la conversión de L-arginina en L-citrulina. También requiere de la presencia de calmodulina y de 4 cofactores que son flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH4) y NADPH. En presencia de la calmodulina los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por el FMN hacia el grupo hemo (Davis et al, 2001).

La enzima que cataliza esta reacción es la oxido nítrico sintasa (NOS). Se ha identificado 3 isoformas:

- neural o tipo I (nNOS)
- endotelial o tipo III (eNOS)
- calcio independiente (iNOS) o tipo II (Janos y Sylvester, 2001).

La nNOS y eNOS también se llaman constitutivas, son calcio/calmodulina dependientes. Se encuentran en el citosol y sólo producen cantidades importantes de NO al ser activadas por una elevación del calcio intracelular (Martín, 2000) (Fig.1).

Fig. 1. La enzima NOS convierte la L-arginina en L-citrulina y NO.



La nNOS es la que se encuentra en mayor concentración en el cerebro. La eNOS se encuentra en el endotelio de los vasos sanguíneos cerebrales, donde regula su relajación por estimulación nerviosa no adrenérgica no colinérgica. La eNOS también se localiza en una discreta población de neuronas en el hipocampo (Licinio et al, 1999).

La iNOS es también denominada inducible o tipo macrófago, se produce en macrófagos, polimorfos nucleares, músculo liso y endotelio vascular (Sator et al,

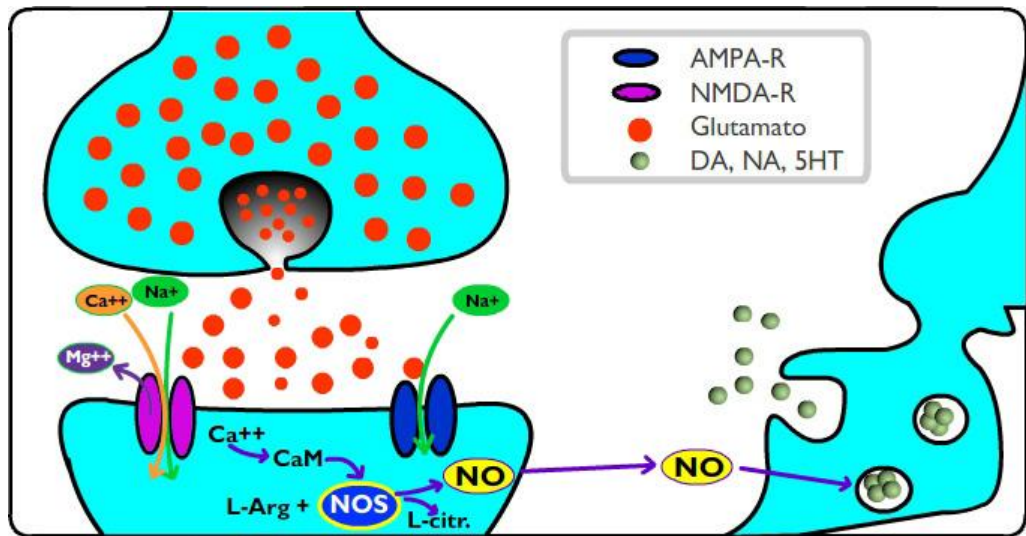
1998). Es inducida por la liberación endógena de citoquinas proinflamatorias y endotoxinas que producen grandes concentraciones de NO que son citotóxicas y citostáticas para las células blanco (Martín 2000).

La iNOS bajo condiciones normales no se expresa en el sistema nervioso, no obstante, bajo condiciones de activación de la glía, se expresa en respuesta a una variedad de daños como traumas, agentes tóxicos, infartos, enfermedades infecciosas como meningitis, encefalitis y cuadros autoinmunes como la esclerosis múltiple y juega un importante rol en la acción contra agentes infecciosos; también juega un rol fisiopatológico en una variedad de procesos neurodegenerativos como el Mal de Alzheimer o la enfermedad de Huntington. (Licinio et al, 1999).

Una misma célula puede expresar las distintas isoenzimas (constitutivas y/o inducibles) dependiendo de la maquinaria que regula la expresión de la iNOS, usando el NO como modulador (Colasanti y Suzuki, 2000).

Malenka y Nicoll (1999) proponen la participación de la NOS como un intermediario en la traducción de la señal iniciada por glutamato a nivel de los receptores AMPA (agonista glutamatérgico) y NMDA. La liberación de glutamato por el terminal presináptico estimula al canal de Na^+ del receptor AMPA, permitiendo la entrada de Na^+ . La despolarización iniciada por la entrada de Na^+ remueve el Mg^{2+} que se encuentra normalmente bloqueando el canal del receptor NMDA. Este desbloqueo permite la entrada de Ca^{2+} al citosol, activando la apo Calmodulina y ésta a la kinasa II dependiente de calmodulina, la que se autofosforila y fosforila la proteína del canal AMPA, aumentando el número de receptores activados; y, además, activa la NOS aumentando la producción de NO (Fig. 2).

Fig. 2. Esquema de la activación neuronal de la NOS.



Si bien, el rol del NO en otros sistemas está relativamente claro, no se conoce claramente su efecto en la epilepsia. Rigaud-Monnet et al, (1995) sugieren que el NO interviene en la regulación y transmisión glutamatérgica del flujo sanguíneo cerebral en focos epilépticos; así en estudios con ratas inyectadas con L-NAME (inhibidor de la NOS) previo a la inyección de ácido kaínico para inducir un foco epiléptico, disminuyó la concentración de glutamato en el hipocampo y también disminuyeron los focos epilépticos.

Otra investigación, en ratas, demostró un efecto neurotóxico del NO usando inhibidores de nNOS en estudios con estimulación con metanfetaminas (Desaiah et al, 2000). Por otro lado, modelos de experimentación con pilocarpina, otro agente epileptogénico, sugieren un efecto protector del NO frente a la inducción de focos epilépticos (Del-Bel et al, 1997). Estos efectos contrapuestos de la NOS nos llevaron a estudiar cómo es que una misma molécula puede estar implicada en procesos neuroprotectores y neurotóxicos, participando en procesos fisiológicos importantes y por otro lado colaborando en la generación de daños funcionales en varios sistemas e incluso inducir la muerte neuronal. Una respuesta tentativa a esta paradoja, estaría dada en que el NO muestra características únicas que permiten a esta molécula intervenir en muchas acciones. La cantidad, duración de su efecto y localización de la NOS son variables determinantes en los efectos del NO. La particular expresión de estas isoformas en diferentes circuitos neurales

probablemente dé cuenta de su acción; de allí que la comprensión de la regulación y función de la enzima podrían conducir a estrategias terapéuticas más selectivas para la prevención o incluso el tratamiento de numerosas enfermedades (Billiar, 1995).

La presente memoria de título pretende contribuir al entendimiento de la relación de la NOS y el fenómeno epiléptico, a través de la determinación de la actividad total de NOS en un modelo experimental de actividad epiléptica en el que se analizaron tres estructuras con el más bajo umbral epileptogénico, como son hipocampo, amígdala y corteza cerebral sensorio motora (Swanson y Petrovich, 1998).

Para ello se desarrolló un modelo experimental en gatos, en que el agonista glutamatérgico AMPA fue administrado en dosis umbrales en el hipocampo, lo que permitió generar un foco epiléptico circunscrito a las estructuras más sensibles y cuyas manifestaciones clínicas estuvieron ausentes o en algunos casos fueron acompañadas sólo de cambios conductuales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar las variaciones temporales y regionales de actividad NOS en el cerebro de gatos con epilepsia generada por inyección intracerebral de AMPA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Generar un foco epiléptico focalizado, por inyección intracraneana de AMPA en hipocampo derecho de gato.
- Evaluar las características electroencefalográficas y conductuales generadas por el proceso epiléptico producido con AMPA.
- Determinar la actividad enzimática total de NOS, en homogeneizado de hipocampo, amígdala y corteza cerebral de ambos hemisferios.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES.

Se utilizaron 25 gatos adultos, mestizos, de ambos sexos, con pesos entre 2.5 y 3.5 Kg.

Los cuidados y procedimientos realizados con los animales fueron conducidos de acuerdo con la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (1996, National Academy Press, Washington D.C., USA) y con aprobación de los Comités de Bioética del Campus Oriente de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, ambos de la Universidad de Chile.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Los animales fueron sometidos al siguiente procedimiento: bajo anestesia con Nembutal® (30 mg/Kg i.p.) y en condiciones asépticas, se dispuso de un sistema estereotáxico en el cual la cabeza del animal se fijó y quedó en un sistema de coordenadas conocido que permite abordar cualquier estructura cerebral. Para ello se utilizó un aparato estereotáxico y un atlas histológico del cerebro del animal con las coordenadas para cada una de las estructuras cerebrales (Jasper y Ajmone-Marsan, 1954; Reinoso-Suárez, 1961).

Así fue posible implantar una cánula en el hipocampo derecho a través de la cual posteriormente se inyectaría AMPA, esta cánula estaba adosada a un electrodo bipolar. En hipocampo izquierdo, amígdala derecha e izquierda y corteza cerebral sensorio-motora derecha se implantaron electrodos similares al que se adosó a la cánula, con la finalidad de medir la actividad eléctrica de cada una de estas estructuras. La cánula implantada en hipocampo derecho mide 10 mm. de largo y 1 mm. de diámetro y la distancia entre la punta de la cánula y la punta del electrodo fue de 3 mm. El electrodo para amígdala mide 25 mm. de largo. Todos los electrodos son de tungsteno y fueron soldados a una base a través de la cual fue posible conectarlos al equipo electroencefalográfico. La base de conexión fue adherida con acrílico dental al cráneo del animal (Motles et al, 1988).

Las coordenadas que se utilizaron para alcanzar el hipocampo fueron: Anterior (A):3, Lateral (L):6 y Vertical (V):7; para amígdala: A:10, L:10 y V: 6; mientras que el electrodo para la corteza cerebral se ubicó en A:22 y L:8. Además, se adhirieron al cráneo dos tubos de aluminio de 3 cm. de largo por 0,5 cm. de diámetro, dispuestos por delante y el otro por detrás de la base, perpendicular al eje antero–posterior de la cabeza; a través de ellos la cabeza del animal fue sostenida indoloramente al equipo estereotáxico durante el período de 1 a 2 min., tiempo que duró el procedimiento de la microinyección de AMPA (Infante et al, 2002).

Una vez finalizada la cirugía, se administró penicilina (200.000 UI) subcutánea, sobre la herida (cráneo) y en la conjuntiva ocular. Además, al animal se le administró suero glucosalino (60 ml) intraperitoneal.

Siete días después, una vez que el animal se encontraba recuperado, en términos de peso y apetito, se realizó el siguiente procedimiento experimental (Fig. 3).

GENERACIÓN DEL FOCO EPILÉPTICO

Los animales fueron divididos en tres grupos, cada uno de ellos fue tratado con un protocolo diferente. La elección de los tiempos para cada grupo se realizó de acuerdo a los tiempos de evolución en trabajos donde se indujo isquemia a los mismos tejidos (Iadecola, 1997).

Grupo experimental 1 día (n=5): mediante una jeringa Hamilton y con el animal fijado en el sistema estereotáxico se inyectó en hipocampo derecho 80µg de una solución de 5 µl de AMPA (16 µg/µl), preparada en suero fisiológico, ésta fue la dosis umbral para generar un foco epiléptico (Motles et al, 2002). Un día después de la microinyección de AMPA los animales fueron sacrificados bajo anestesia general y se obtuvieron muestras de cada estructura, las que se lavaron en suero fisiológico a 4°C, se etiquetaron y rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido y fueron guardadas a –80°C hasta su posterior análisis.

Grupo experimental 5 días (n=7): se utilizó el mismo protocolo anterior sólo que los animales fueron sacrificados a los 5 días luego de la microinyección de AMPA.

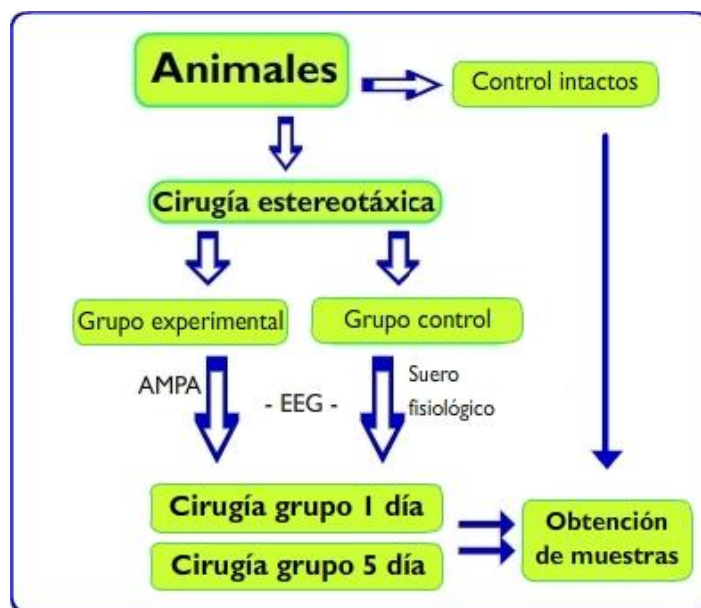
Grupo control: con el propósito de comparar cada grupo experimental con su respectivo control, este grupo a su vez fue dividido en 3 subgrupos:

- **Control 1 día** (n=6): se inyectó 5 μ l de suero fisiológico en hipocampo derecho, a través de la cánula intracerebral. 24 hr. después los animales fueron sacrificados. Para obtener las muestras se utilizó el mismo protocolo que se describió para los grupos experimentales.

- **Control 5 días** (n=4): se inyectó 5 μ l de suero en hipocampo derecho y 5 días después los animales fueron sacrificados.

- **Control intactos** (n=3): en estos animales no se realizó la cirugía para implantar la cánula y los electrodos. Se utilizó el mismo protocolo para la obtención de muestras que se describió anteriormente. El objetivo de este grupo fue evaluar el efecto que podrían inducir los implantes en la actividad de las muestras.

Fig. 3. Protocolo de experimentación para obtener las muestras para la posterior determinación de la actividad NOS.



OBTENCIÓN DEL ELECTROENCEFALOGRAMA (EEG)

Para definir el trazado de un EEG normal, previo a la microinyección se realizó un registro basal. Una vez inyectado el agente epileptogénico (AMPA) se registró por cuatro horas la actividad electroencefalográfica y conductual, siendo la primera hora, una etapa de registro continua y luego se realizaron registros regulares cada 5 min. La interpretación de los EEG fue realizada por personal calificado.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Bajo anestesia general, al igual que para la cirugía estereotáxica, se procedió a extraer la cánula y los electrodos, para posteriormente remover la calota hasta llegar al tejido cerebral y tomar muestras de corteza cerebral (sensorio-motora), hipocampos y amígdalas. En la extracción de los hipocampos se removió la corteza cerebral que se encuentra por sobre esta estructura. En la extracción de las amígdalas, que se ubican en la base del cerebro, primero se localizó estereotáxicamente a través de una aguja entintada que atravesó la amígdala. De esa manera fue posible localizarla, visualizarla y extraer el núcleo amigdalino.

Las estructuras se lavaron en suero fisiológico a 4°C y rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido. Luego se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

PREPARACIÓN DEL HOMOGENEIZADO

Las muestras de tejidos se suspendieron en un volumen equivalente 4 veces su peso (g) en buffer de homogeneización (Mop-Tris 20 mM pH 6.8) a 4°C, con inhibidores de proteasas: leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1 mM, pepstatina A 1 µg/ml, benzamidina 1 mM, DTT 0.25 mM. La homogeneización se realizó a 4 °C con un homogeneizador Politrón a 13500 r.p.m., por 4 períodos de 15 segundos y con descansos de 5 segundos. Luego se centrifugó a 800 x g a 4° C por 10 minutos, para eliminar restos celulares. El sobrenadante (fracción cruda) se congeló a -80 °C para su posterior análisis.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN CRUDA

Las proteínas fueron cuantificadas según el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

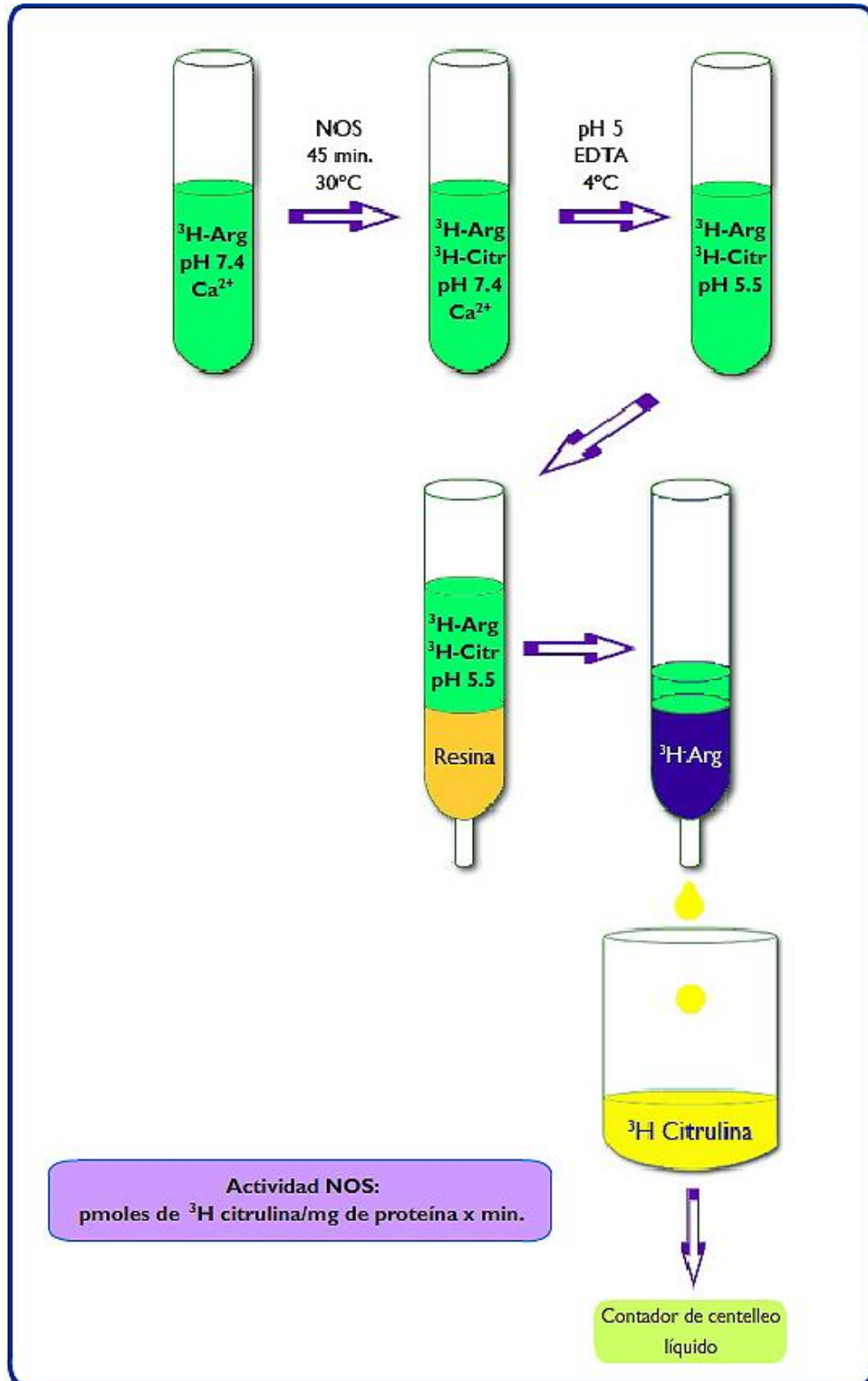
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NOS

La actividad de la NOS se determinó por la conversión de arginina a citrulina, usando ^3H -arginina en un medio que contiene: 1mM NADPH, 1.25 mM Ca^{2+} , 20 uM FMN, 20 uM FAD y 10 mM BH_4 , en 40 mM Tris-HCl pH 7.4 (Figueroa y Massmann, 1995). La actividad enzimática total requiere de NADPH, BH_4 , FAD, FMN, calmodulina y Ca^{2+} . La muestra se incubó a 30 °C por 45 minutos. La reacción se detuvo con 1.8 ml de una solución 30 mM HEPES (pH 5.5) y 3 mM EDTA.

La separación de ^3H -arginina y ^3H -citrulina se realizó por cromatografía de intercambio iónico con 1 ml de resina Dowex (50X8–400), la fracción eluída contenía ^3H -citrulina que se colectó en 9 ml de líquido de centelleo, el cual inmediatamente fue leído en un contador de centelleo líquido (Fig. 4).

La actividad enzimática se expresa como pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min.

Fig. 4. Esquema de la determinación de la actividad enzimática por cromatografía de intercambio iónico.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar medio (SEM). Para el análisis estadístico se utilizaron los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis seguido del test de Dunns para comparación múltiple. Se consideró significativo un $p < 0.05$.

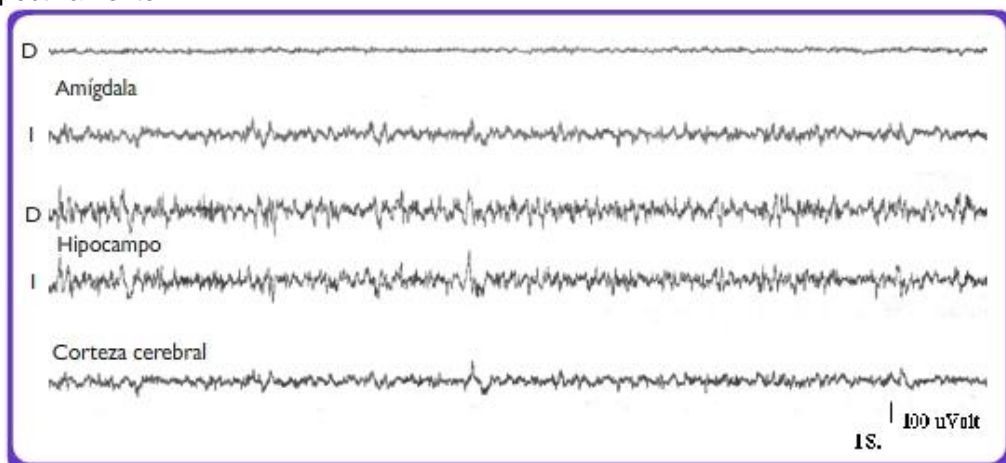
RESULTADOS

1. REGISTRO ELECTROENCEFALOGRÁFICO.

1.1. Actividad electroencefalográfica en grupos controles.

La inyección intracerebral 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. 5), ni cambios conductuales en ninguno de los animales estudiados.

Fig. 5. Registro electroencefalográfico control, el cual presenta un trazado normal con ausencia de postdescargas en todos los canales. D e I = derecha e izquierda respectivamente.



1.2. Caracterización de postdescargas según su amplitud y frecuencia.

Se analizaron 2 parámetros del EEG, la amplitud de postdescargas y la frecuencia de espigas de cada postdescarga, registradas en corteza, amígdalas e hipocampos, durante el momento de mayor actividad epiléptica. Los valores de estas variables se muestran en la tabla 1.

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

$\pm 95 \mu\text{volt}$ en corteza derecha, siendo esta última significativamente menor que el resto de las estructuras cerebrales ($p < 0.05$), indicando claramente su menor compromiso con la epilepsia inducida (Fig. 6).

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 ($p < 0.05$) (Fig. 7).

Tabla 1. Valores de amplitud y frecuencia de espigas en postdescarga de mayor intensidad, en registros electroencefalográficos de gatos con epilepsia. Comparación de hipocampo derecho e izquierdo y amígdala derecha e izquierda con respecto a corteza derecha.

* $p < 0.05$.

Variables	Corteza Derecha Prom. \pm D.S.	Hipocampo Derecho Prom. \pm D.S.	Hipocampo Izquierdo Prom. \pm D.S.	Amígdala Derecha Prom. \pm D.S.	Amígdala Izquierda Prom. \pm D.S.
Amplitud (μvolt)	216 \pm 49	* 437 \pm 255	* 472 \pm 252	* 464 \pm 263	* 525 \pm 310
Frecuencia (espigas/seg)	8 \pm 4	* 14 \pm 4	* 14 \pm 3	* 11 \pm 3	9 \pm 3

Fig. 6. Comparación de la amplitud de postdescarga (promedio de $\mu\text{volt} \pm \text{D.S.}$), medido durante el momento de mayor actividad epiléptica, entre corteza cerebral v/s el resto de estructuras cerebrales ($p < 0.05$).

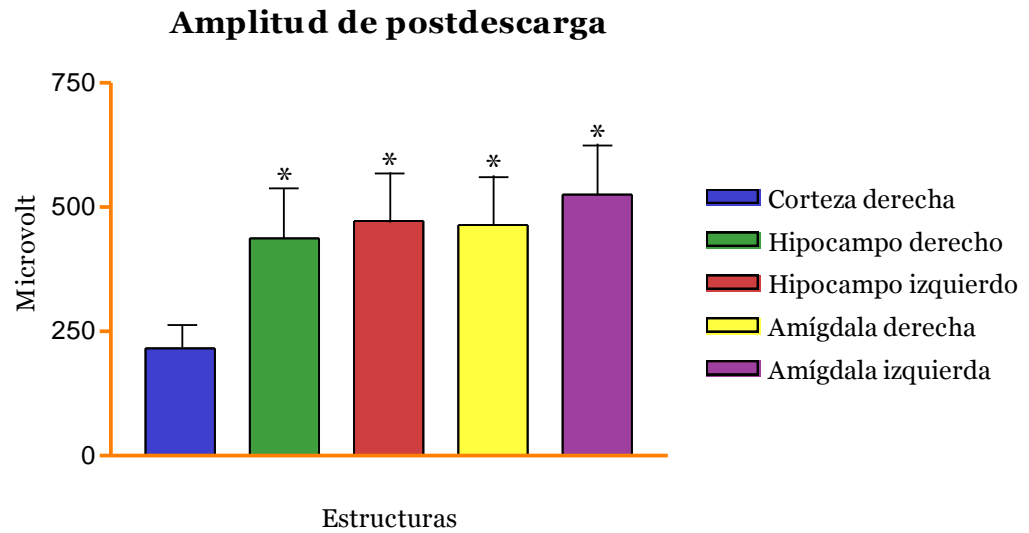
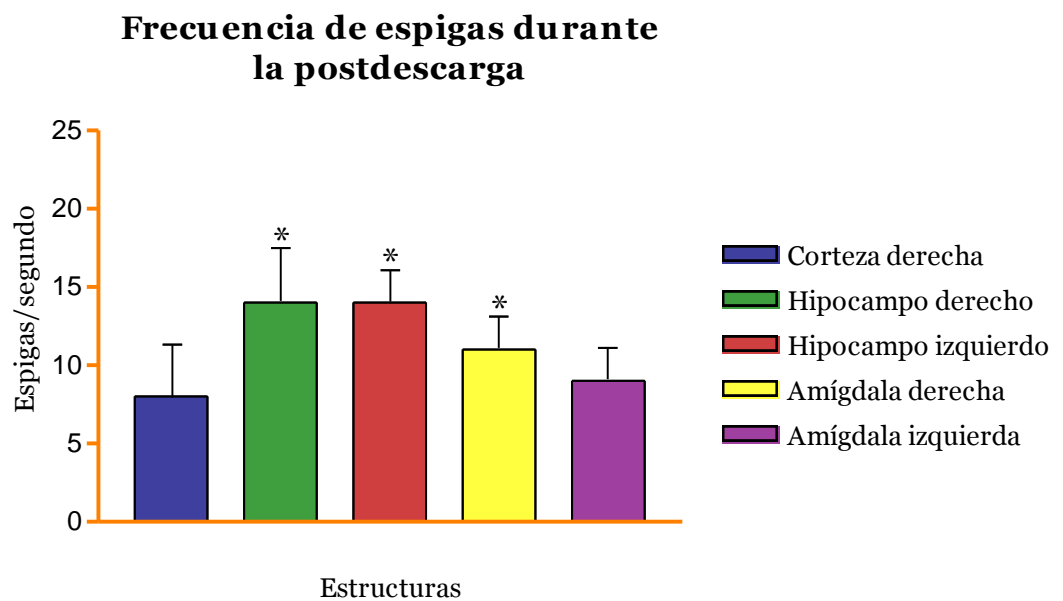


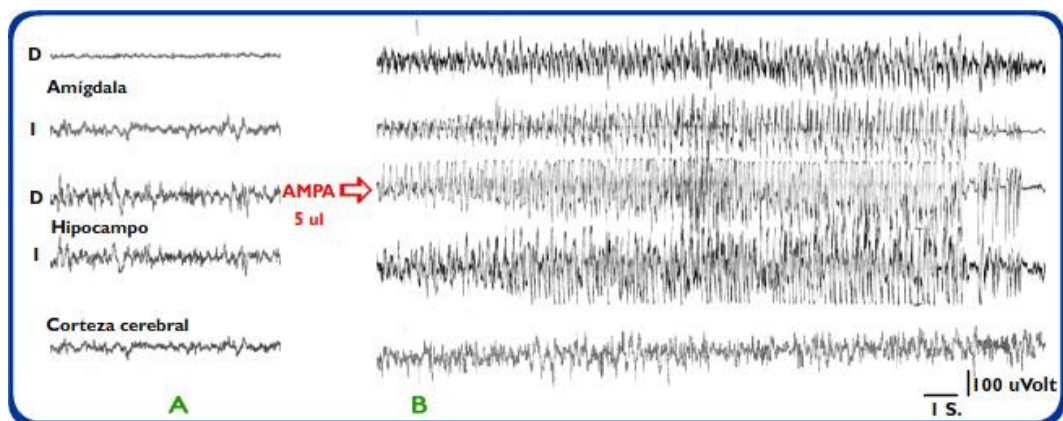
Fig. 7. Comparación de la frecuencia de espigas de postdescargas (promedio de espigas por segundo $\pm \text{D.S.}$) durante el momento de mayor actividad epiléptica, entre corteza cerebral v/s el resto de estructuras cerebrales ($p < 0.05$).



1.3. Actividad epiléptica en grupos experimentales.

Con la finalidad de evaluar el curso temporal del foco epiléptico, se tomaron nuevos registros electroencefalográficos, previo al sacrificio de los animales (Fig.8). 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 los hipocampos y en las amígdalas, pero no en la corteza cerebral.

Fig. 8. Registro electroencefalográfico de grupo experimental. Se muestran típicas postdescargas las cuales comprometen a 4 estructuras implantadas con excepción de corteza cerebral, producto de la microinyección de AMPA 40 mM en hipocampo derecho como agente epileptogénico. D e I: derecha e izquierda, respectivamente.



A= lectura control

B= lectura posterior a la inyección con AMPA

2. OBSERVACIONES CONDUCTUALES.

La inyección de AMPA 40 mM en hipocampo derecho de los animales, generó postdescargas, las cuales se localizaron principalmente en estructuras subcorticales. En la mayoría de los casos, las postdescargas registradas en hipocampo y amígdala no fueron acompañadas de cambios conductuales evidentes, aunque algunos animales presentaron alteraciones 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 clonías en músculos faciales, párpados y labios.

3. ACTIVIDAD NOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La actividad total de NOS en muestras de homogeneizado se determinó en hipocampo, amígdala y corteza cerebral, de ambos hemisferios, tanto en los grupos controles: intactos, de 1 día y 5 días y los grupos experimentales de 1 día y 5 días. Los resultados se expresaron como pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min.

3.1. Actividad NOS en grupos controles.

La inyección intracerebral de 5 μl de NaCl 0,9 % en el hipocampo derecho no provocó variaciones significativas en la actividad NOS de los 3 grupos controles. Esto nos permitió reagrupar los resultados y trabajar con un solo grupo control que correspondía a los animales inyectados (grupo de 1 día y 5 días) (tabla 2).

Tabla 2. Promedio \pm SEM de la actividad NOS total, en grupos controles. La actividad se expresa como pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

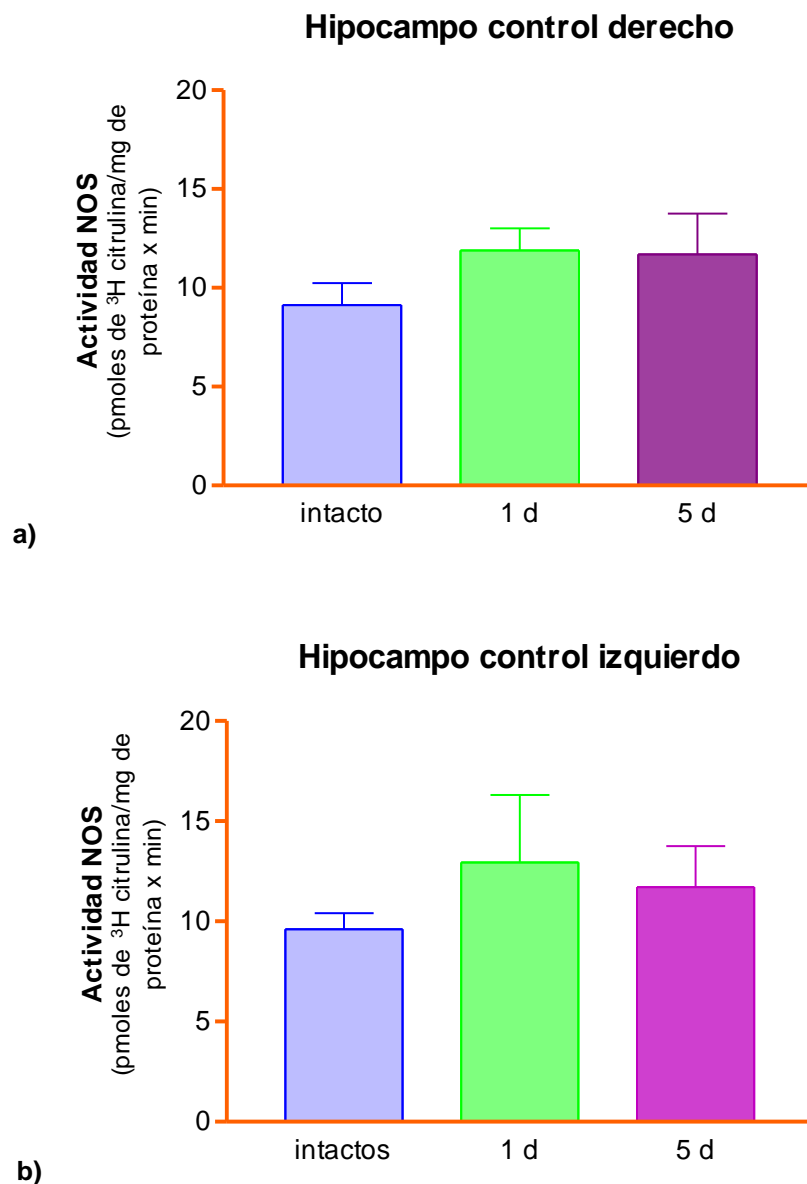
Grupos controles	Hipocampo Derecho	Hipocampo Izquierdo	Corteza Derecha	Corteza Izquierda	Amígdala Derecha	Amígdala Izquierda
Intacto	9.13 \pm 1.11 n=3	9.6 \pm 0.81 n=3	4.8 \pm 0.10 n=3	5.3 \pm 0.01 n=3	-	12.27 \pm 1.45 n=3
1 día	11.9 \pm 1.11 n=4	12.95 \pm 3.36 n=4	4.12 \pm 0.39 n=6	3.97 \pm 0.09 n=3	9.43 \pm 1.89 n=4	9.27 \pm 1.96 n=6
5 días	11.7 \pm 2.1 n=4	11.7 \pm 2.05 n=4	3.7 \pm 0.12 n=4	3.43 \pm 0.53 n=4	7.8 \pm 1.41 n=3	6.45 \pm 1.68 n=4

3.1.1. Hipocampo

En el hemisferio derecho, el grupo intacto presentó una actividad de 9.13 \pm 1.11 pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min. La inyección intracerebral de 5 μl de NaCl 0,9 % en el hipocampo derecho mostró valores levemente mayores de actividad a 1 día registrando 11.9 \pm 1.11 pmoles y a los 5 días la actividad fue de 11.7 \pm 2.1 pmoles. En el hipocampo izquierdo los resultados fueron similares, el grupo intacto tuvo una lectura de 9.6 \pm 0.81 pmoles, mientras que los animales del

grupo de 1 día tuvieron una actividad de 12.95 ± 3.36 pmoles y a los 5 días registraron 11.7 ± 2.05 moles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las estructuras señaladas (Fig. 9).

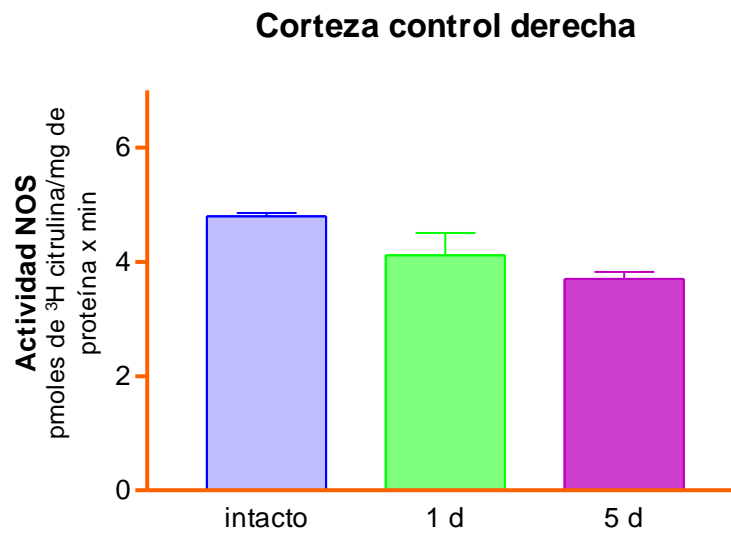
Fig. 9. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total en hipocampo derecho (a) e izquierdo (b), de los grupos controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



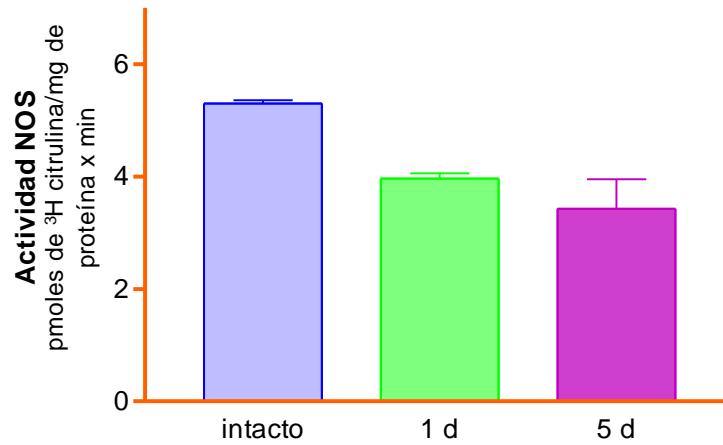
3.1.2. Corteza cerebral

Las muestras intactas de corteza sensorio-motora derecha mostraron una actividad de 4.8 ± 0.10 pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min, mientras que en los grupos inyectados del lado ipsilateral observamos una leve disminución, de 4.12 ± 0.39 pmoles a 1 día y de 3.7 ± 0.12 pmoles a los 5 días. La corteza izquierda tuvo una actividad en el grupo intacto de 5.3 ± 0.01 pmoles, disminuyendo en los animales inyectados con 3.97 ± 0.09 pmoles a 1 día y a los 5 días la actividad fue de 3.43 ± 0.53 pmoles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las estructuras señaladas (Fig. 10).

Fig. 10. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total en corteza derecha e izquierda, de los grupos controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



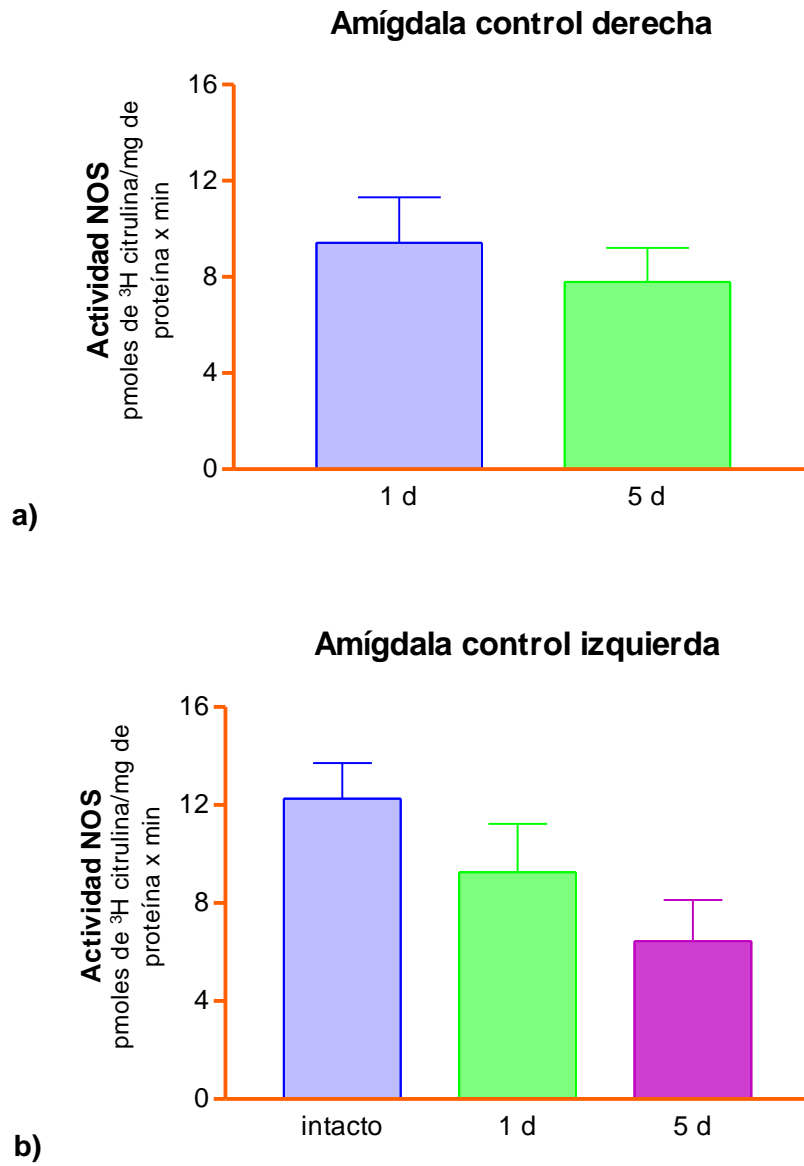
Corteza control izquierda



3.1.3. Amígdala

La actividad de la amígdala derecha fue 9.43 ± 1.89 pmoles de ³H citrulina/mg de proteína x min. en el grupo de 1 día, disminuyendo a los 5 días con una actividad de 7.8 ± 1.41 pmoles. En la amígdala izquierda el grupo intacto registró 12.27 ± 1.45 pmoles, el grupo de 1 día registró 9.27 ± 1.96 pmoles y el grupo de 5 días marcó 6.45 ± 1.68 pmoles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las estructuras señaladas (Fig. 11).

Fig. 11. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total en amígdala derecha (a) e izquierda (b), entre los grupos controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



3.2. Actividad NOS en grupos experimentales.

La inyección intracerebral de 80 μ g de AMPA en el hipocampo derecho provocó un foco epiléptico circunscrito a ambos hipocampos y amígdalas, con un mínimo compromiso de la corteza asociativa (Tabla 3).

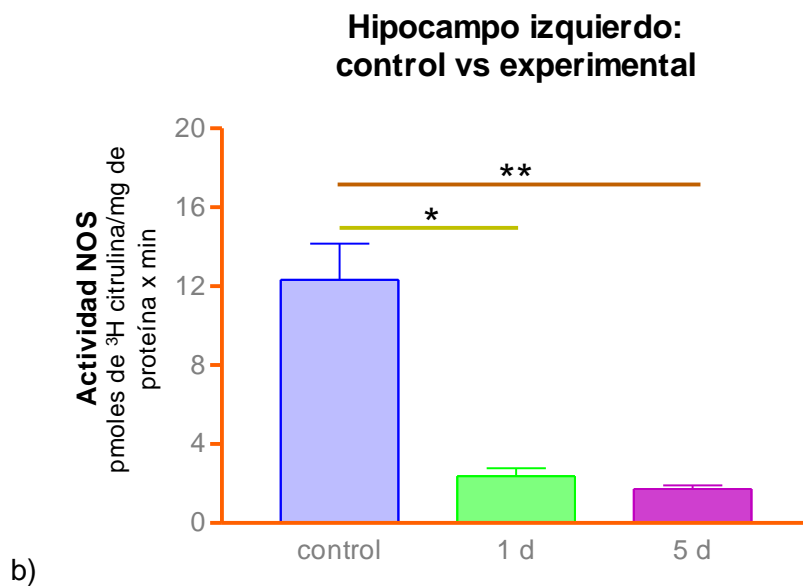
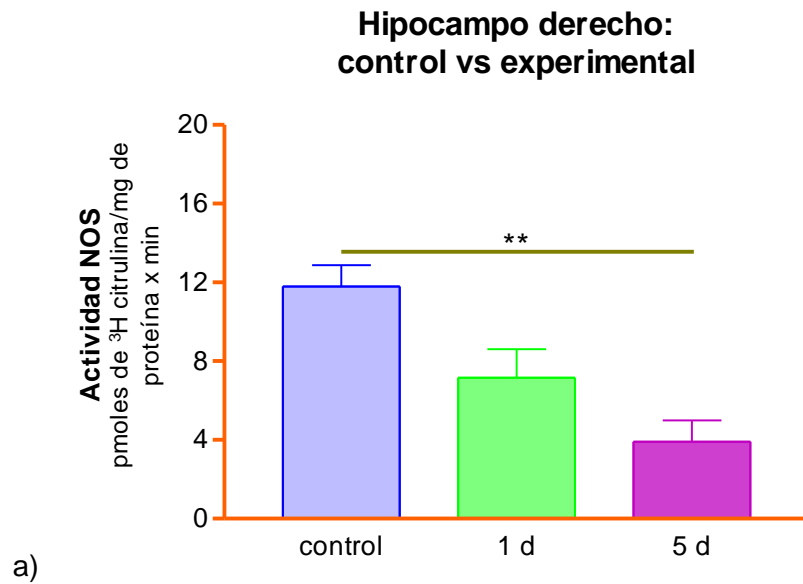
Tabla 3. Promedio \pm SEM de la actividad NOS total, en el grupo control y experimentales. La actividad NOS se expresa como pmoles de 3 H citrulina/mg de proteína x min. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Grupos	Hipocampo Derecho	Hipocampo Izquierdo	Corteza Derecha	Corteza Izquierda	Amígdala Derecha	Amígdala Izquierda
Control	11.8 \pm 1.08 n=8	12.33 \pm 1.84 n=8	3.95 \pm 0.24 n=10	3.66 \pm 0.30 n=7	8.7 \pm 1.19 n=7	8.79 \pm 1.35 n=9
1 día	7.16 \pm 1.45 n=5	* 2.38 \pm 0.39 n=5	2.52 \pm 0.47 n=5	-	4.00 \pm 0.62 n=5	** 2.43 \pm 0.26 n=4
5 días	** 3.9 \pm 1.09 n=6	** 1.72 \pm 0.2 n=5	3.0 \pm 0.49 n=6	3.52 \pm 0.44 n=5	8.00 \pm 1.22 n=7	* 2.73 \pm 0.34 n=4

3.2.1. Hipocampo.

En hipocampo derecho, el grupo control tuvo una media de 11.8 \pm 1.08 pmoles de 3 H citrulina/mg de proteína x min.; el grupo de 1 día promedió 7.16 \pm 1.45 pmoles y el grupo de 5 días tuvo una media de 3.9 \pm 1.09 pmoles. Esta disminución fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Fig. 11). En el hemisferio izquierdo observamos una marcada disminución de la actividad a 1 día y 5 días luego de generado el foco. El grupo control promedió 12.33 \pm 1.84 pmoles, mientras que en el grupo de 1 día la actividad de la NOS disminuyó a 2.38 \pm 0.39 pmoles ($p < 0.05$); esta disminución fue aún mayor en el grupo de 5 días, con 1.72 \pm 0.2 pmoles ($p < 0.01$) (Fig. 12).

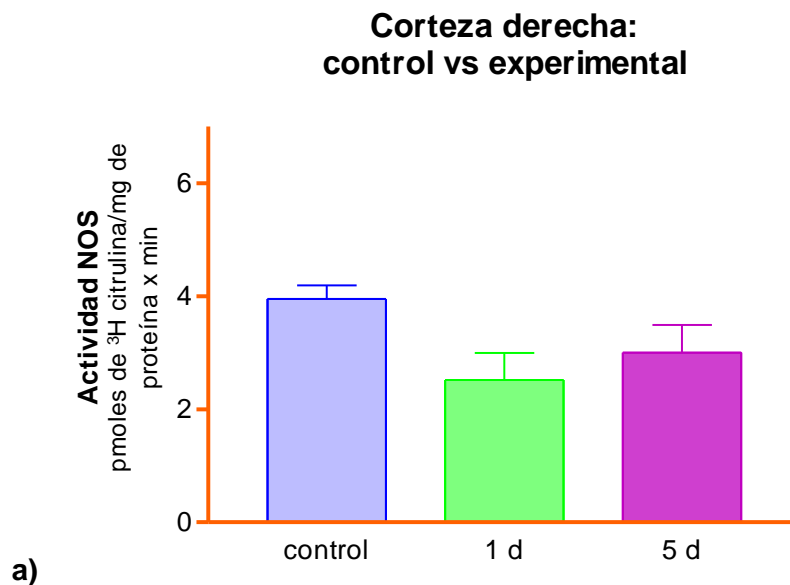
Fig. 12. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total de hipocampo derecho (a) e izquierdo (b), entre el grupo control y los grupos experimentales. . (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)



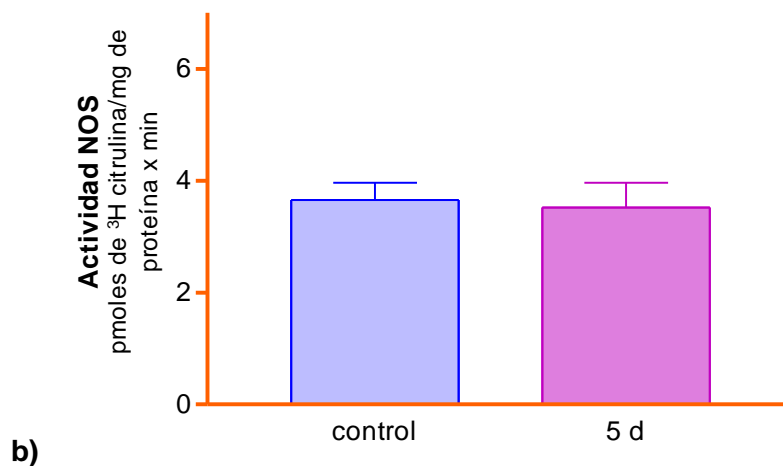
3.2.2. Corteza cerebral

La corteza cerebral derecha presentó 3.95 ± 0.24 pmoles de ^3H citrulina/mg de proteína x min. en las muestras control. El grupo de 1 día mostró una disminución con respecto al control con 2.52 ± 0.47 pmoles y a los 5 días 3.0 ± 0.49 pmoles (Fig. 12). En el hemisferio izquierdo el grupo control tuvo una actividad de 3.66 ± 0.30 pmoles la cual prácticamente mantuvo su niveles a los 5 días con 3.52 ± 0.44 pmoles (Fig. 13). No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los hemisferios de corteza cerebral.

Fig. 13. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total en corteza cerebral sensorio-motora derecha e izquierda, entre el grupo control y los grupos experimentales. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)



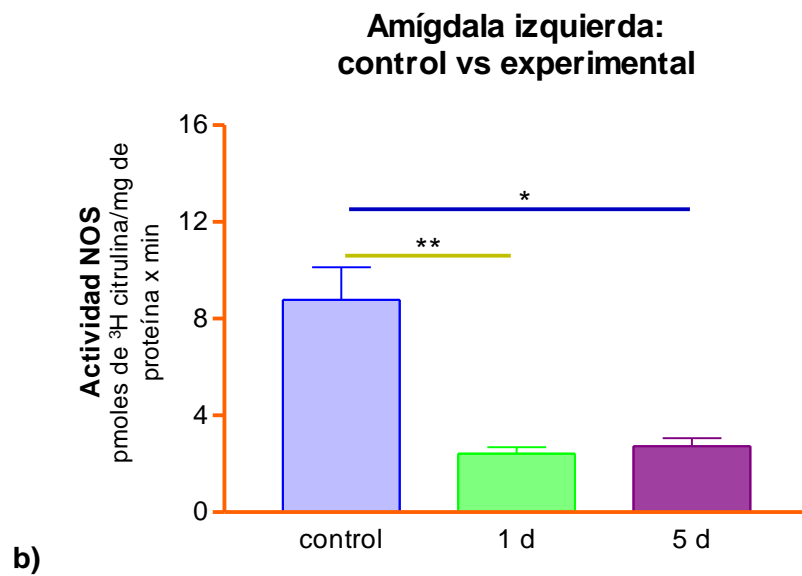
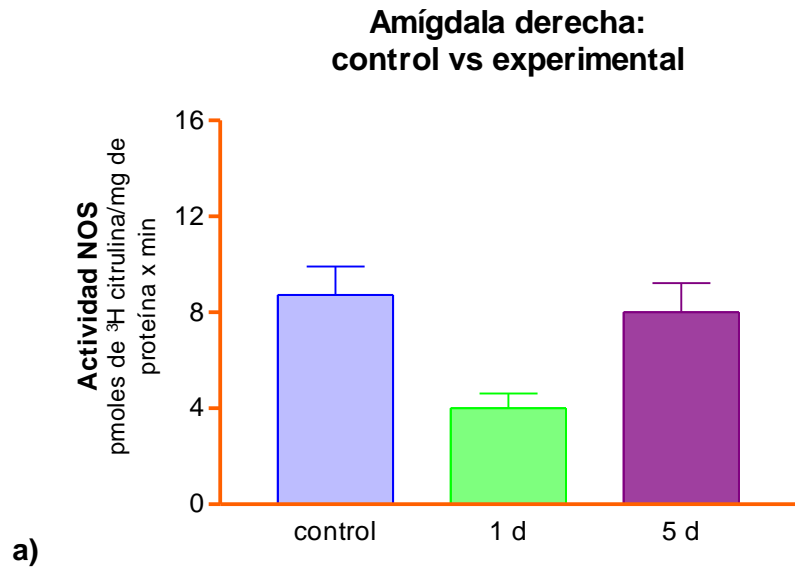
Corteza izquierda: control vs experimental



3.2.3. Amígdala

En el grupo control de amígdala derecha se obtuvo una media de 8.7 ± 1.19 pmoles de ³H citrulina/mg de proteína x min. En el grupo de 1 día la actividad fue de 4.0 ± 0.62 pmoles y a los 5 días 8.0 ± 1.22 pmoles (Fig. 13). En el hemisferio izquierdo la actividad fue muy diferente, observándose en el grupo control una media de 8.79 ± 1.35 pmoles, mientras que a 1 día de la inducción del foco epiléptico hubo una disminución estadísticamente significativa, con 2.43 ± 0.26 pmoles ($p < 0.01$) la cual se mantuvo hasta los 5 días con un valor de 2.73 ± 0.34 ($p < 0.05$) pmoles (Fig. 14).

Fig. 14. Comparación del promedio \pm SEM de la actividad NOS total en amígdala derecha e izquierda, entre el grupo control y los grupos experimentales. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).



DISCUSIÓN

Esta investigación demostró que la inyección intracerebral de 80 µg de AMPA a través de una cánula en hipocampo derecho, es capaz de generar un foco epiléptico circunscrito a las estructuras con más bajo umbral epileptogénico; el cual mostró una clara tendencia a la disminución durante el período de su evaluación. El foco se presentó tanto en la zona de la microinyección, como en el hipocampo contralateral, en ambas amígdalas y en menor medida en la corteza cerebral sensorio-motora. Estos datos son similares a los de Swanson y Petrovich (1998), los que evidencian la diversidad de conexiones bilaterales que existen entre estas estructuras y la alta sensibilidad que manifiestan en adquirir la condición epiléptica.

En trabajos realizados por Infante et al, (2002), el hipocampo y la amígdala mostraron una mayor sensibilidad que la corteza cerebral a la administración intracerebral de ácido kaínico. Estos efectos se percibieron con dosis bajas del agonista glutamatérgico (1-2 µl, 4.6 mM). Con dosis más altas (3-5 µl, 4.6 mM), la actividad en amígdala y corteza cerebral aumentó y no hubo diferencias entre las tres estructuras. Esto demuestra que el hipocampo presenta una mayor sensibilidad a generar focos epilépticos que las otras dos estructuras. Por otra parte, el hipocampo sería la estructura más sensible a AMPA, comparado con los agonistas glutamatérgicos NMDA y ACPD (Motles et al, 2002).

Para la elección de la droga a utilizar se tomaron en cuenta las características de cada uno de los agonistas. De acuerdo a la dosis efecto, se estimó que la inyección de ácido kaínico es aproximadamente unas 15 veces más intensa en la generación de un foco epiléptico que la inyección de AMPA. Otro aspecto importante en la elección del agonista glutamatérgico es que el AMPA provoca un aumento de la actividad epiléptica circunscrita principalmente al hipocampo y la amígdala; en cambio, el ácido kaínico por su mayor capacidad epileptogénica tiene una gran capacidad de difundir a la corteza cerebral y provocar, además, daño neuronal manifiesto (Motles et al, 2002). Analizando estos trabajos se determinó que el AMPA sería la droga de elección para cumplir nuestros requisitos:

1. provocar un foco epiléptico circunscrito a las estructuras más sensibles; y

2. usar una dosis baja de AMPA para que el daño celular que provocara la droga fuera el menor posible.

Para verificar que el foco fuera localizado en las estructuras descritas con más bajo umbral epiléptico, fue necesario monitorear la actividad electroencefalográfica de las tres estructuras estudiadas. Para ello se analizaron las postdescargas considerando la amplitud y la frecuencia de las espigas. La amplitud es un indicador de la intensidad del fenómeno de hiperexcitabilidad que presenta un grupo de neuronas en un momento dado y la frecuencia es el número de espigas por segundo, que a su vez es un indicador de las veces en que un grupo de neuronas modifica su estado de despolarización, visualizado en el EEG como espigas o espigas-ondas.

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 resultados 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. 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 manera tal que a 1 día y a los 5 días luego de la inyección, sólo se detectaron espigas aisladas en el electroencefalograma. Esta condición permitió determinar qué estructuras mostraban tendencia hacia la recuperación de la actividad enzimática y por lo tanto su compromiso epiléptico era menor que aquellas como el hipocampo, en la cual a pesar de encontrarse la epilepsia en proceso de extinción mantuvo sus bajos niveles de actividad generados inicialmente por la inducción del foco epiléptico.

Con respecto a los cambios conductuales, se visualizaron alteraciones de la conducta que se ajustan a los signos que presenta la epilepsia psicomotora en el gato. En este tipo de epilepsia, el fenómeno de hiperexcitabilidad y sincronización

neuronal se encuentra circunscrito a estructuras subcorticales, sin embargo, en la especie humana, en este tipo de epilepsia puede estar comprometido además el lóbulo temporal, razón por la cual también se encuentra en la literatura como epilepsia del lóbulo temporal (Dow et al, 1992). La mayoría de las epilepsias felinas se presentan como epilepsia focal y son secundarias a alguna patología cerebral como tumores, infartos, enfermedades infecciosas y desórdenes traumáticos y vasculares (Kline, 1998).

En esta investigación visualizamos diversas reacciones viscerales como lamidos constantes, movimientos masticatorios y salivaciones profusas. Estos signos podrían ser explicados, en parte, por un aumento de la actividad bioeléctrica de la amígdala (Allikmets, 1967).

Con respecto a la actividad NOS en los grupos controles, cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre los grupos de 1 día y 5 días inyectados con NaCl (0.9 %) y los animales intactos (sin implante crónico). Esto sugiere que el daño estructural que provocó la cánula en el hipocampo y los electrodos en todas las estructuras fue despreciable en cuanto a inducir diferencias en la actividad, lo que es consistente con lo observado por Motles et al (2002) en estudios histológicos donde se observa un compromiso inflamatorio muy bajo de las estructuras y además, se ha descrito que el daño neuronal inducido por el AMPA se logra solo con dosis elevadas (Fowler et al, 2003). Sin embargo no podemos descartar la generación de una agresión mecánica en el hipocampo derecho, lugar en donde se insertó la cánula.

El principal resultado en la determinación de la actividad NOS en este estudio fue que el hipocampo, la estructura inyectada con AMPA, mostró una marcada disminución en la actividad a los 5 días en ambos hemisferios ($p < 0.05$), lo que indica que la cantidad de AMPA inyectada fue suficiente para provocar cambios en los niveles de actividad enzimática. En el hipocampo izquierdo, además, se puede apreciar una disminución en la actividad en el grupo de 1 día ($p < 0.05$). Llama la atención que el hemisferio inyectado tenga actividades menores que el contralateral, una posible explicación a esta interrogante es que la cánula y el AMPA hayan provocado algún daño tisular (Fowler, 2003), alterando la expresión

de la enzima y de los inhibidores endógenos de la NOS (Roczniak et al, 2000). La rápida propagación e intensidad de la alteración epiléptica observada en el hipocampo contralateral es un indicador del robusto sistema comisural que existe entre ambos hipocampos en los felinos (Andersen, 1975).

La actividad también disminuyó en la amígdala contralateral, a 1 día y a 5 días de generado el foco epiléptico. Estos resultados son similares a los de Infante et al (2002), en el cual la actividad electroencefalográfica producida en hipocampo rápidamente se propagó a la amígdala; utilizando la conectividad sináptica directa entre ambas estructuras.

En concordancia con el escaso compromiso epiléptico de la corteza cerebral, la actividad NOS en esta estructura no fue modificada en ninguno de los hemisferios. La actividad enzimática detectada en la corteza cerebral manifiesta una menor sensibilidad que el hipocampo y la amígdala en generar focos epilépticos y, además, ha mostrado bajos niveles de actividad epileptogénica en el electroencefalograma, similares a los de estudios previos de Infante et al (2002).

En esta investigación la actividad enzimática total de la NOS disminuyó significativamente en hipocampo y amígdala izquierdos a 1 y 5 días y en hipocampo derecho a los 5 días. Por otra parte, en un estudio en paralelo con las mismas muestras de este trabajo, se determinó por Dot Blot la concentración relativa de las tres isoenzimas, de las cuales la nNOS sólo presentó diferencias significativas en corteza izquierda e hipocampo derecho aumentando a los 5 días de inducido el foco epiléptico ($p < 0.05$). La eNOS aumentó significativamente a los 5 días en hipocampo derecho e izquierdo y en corteza cerebral a 1 día ($p < 0.05$). La iNOS sólo presentó diferencias significativas en la amígdala derecha a los 5 días, aumentando con un $p < 0.05$ (Díaz, 2005). En nuestra investigación, la actividad enzimática total de la NOS en las estructuras analizadas que presentaron diferencias estadísticamente significativas, fueron todas por disminución de la actividad; en cambio en la determinación de la concentración relativa de las isoenzimas de la NOS, en todas las estructuras hubo un aumento en la cantidad relativa respecto de los controles. Esta diferencia es confirmada por Babb et al (1996), quién describió una alta densidad de receptores AMPA en hipocampo. De acuerdo a este trabajo, el número

de receptores AMPA en la epilepsia de hipocampo incrementaría en las dendritas de la capa molecular con lo que se obtendría una relación aumentada de la densidad de receptores AMPA en las fibras presinápticas, esto aumentaría notablemente la entrada de Ca^{2+} al citosol, activando la secuencia de producción de NOS y permitiendo un aumento en la cantidad de la enzima.

Otra explicación de la disminución de la actividad de la NOS es propuesta por Rocznik et al (2000), quien sugiere que un inhibidor endógeno puede ser expresado en células que presentan una alta cantidad de NOS, de acuerdo a esto, podemos especular que este inhibidor u otro mecanismo regulatorio similar, estaría actuando sobre las isoformas luego de haber alcanzado sus máximos niveles de expresión producto de la generación de epilepsia. Es muy probable que las variaciones observadas en los niveles de actividad de las enzimas, en la cual en algunos casos como en la amígdala, se observa una recuperación de la actividad en el grupo de 5 días, sea el reflejo de la clara atenuación que experimentó el proceso epiléptico con el transcurso de los días. Si esta explicación es correcta entonces la evaluación de la actividad de la NOS es un buen indicador del curso de desarrollo temporal del proceso epiléptico.

Diversos estudios han mostrado dualidad en la función de la NOS. Dependiendo del modelo de epilepsia y los parámetros farmacológicos utilizados, los efectos del NO han sido descritos como neurotóxicos (Desai et al, 2000; Osonoe et al, 1994) o neuroprotectivos (Sequeira et al, 2001; Lumme et al, 2000; Boda y Szente, 1996). Además se han descrito aumentos y disminuciones de la actividad nNOS (González-Hernández et al, 2000). Considerando el modelo utilizado en nuestro trabajo y los resultados obtenidos en él, podemos sugerir que la NOS tendría un papel proepiléptico. No obstante lo anterior, estos resultados también podrían sugerir una respuesta adaptativa de la actividad NOS en cuadros epilépticos, los cuales podrían jugar un papel regulador en la hiperactividad neuronal.

Tomando en cuenta el complejo sistema que regula la actividad bioeléctrica y funcional del cerebro, podemos especular que esta regulación de la NOS pasaría a ser otro sistema más en el complejo mecanismo regulador de la actividad neuronal

y que para comprender mejor su función, se necesitan aún más estudios que puedan corroborar y definir la fisiopatología de estos mecanismos.

CONCLUSIONES

1. La aplicación intracerebral de 80 μg de AMPA en hipocampo derecho, generó una actividad epiléptica localizada circunscrita a ambos hipocampos y amígdalas, con un mínimo compromiso de la corteza cerebral.
2. La actividad epiléptica umbral, generada de manera experimental, provocó cambios electroencefalográficos característicos y en algunos casos modificaciones conductuales menores, con ausencia de convulsiones.
3. La aplicación de AMPA en hipocampo derecho, generó cambios regionales y temporales en la expresión de la actividad NOS de hipocampo y amígdala.
4. El hipocampo contralateral a la zona de la microinyección presentó las mayores disminuciones en actividad NOS.
5. La inyección de AMPA no provocó modificaciones en la actividad de la NOS en la corteza cerebral.
6. De acuerdo a nuestros resultados, la evaluación de la actividad NOS sería un buen indicador del desarrollo temporal del proceso epiléptico.
7. Nuestros resultados sugieren que la NOS tendría un papel proepiléptico en el mecanismo regulador de la actividad neuronal del proceso epiléptico.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLIKMETS, L. Kh.. Behavioral reactions to electrical stimulation of amygdala in cats. *Neurosci Behav Physiol.* 1967. (2) pp. 119-27.
- ANDERSEN, P. Organization of hippocampal neurons and their interconnections. In *The Hippocampus. Vol. 1: Structure and Development.* 1975. pp.155-175.
- BABB, T., MATHERN, G. W., LEITE, J.P., PRETORIUS, J. K., YEOMAN, K.M. , KUHLMAN, R.A. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentate of human and kainite rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996. (26) pp. 193-205.
- BILLIAR, T. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg.* 1995. 221(4). pp. 339-49.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the cuantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein binding. *Anal. Biochem;* 1976. (76). pp. 248-54.
- BODA, B., SZENTE M. Nitric oxide inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neurosci Lett.* 1996. (209) pp. 37-40.
- COLASANTI, M., SUZUKI, H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci.* 2000. 21 (7). pp. 249-52.
- DAVIS, K., MARTIN, E., TURKO, I. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. (41). pp. 203-36
- DAWSON, T., DAWSON, V. Nitric Oxide Synthase: Role as a Transmitter/Mediator in the Brain and Endocrine System. *Annu. Rev. Med.* 1996. (47). pp. 219-27.

- DEL-BEL, E.A., OLIVEIRA, P.R, OLIVEIRA, J.A.C., MISHRA, P.K., JOBE, P.C., GARCIA-CAIRASCO, N. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. *Braz J Med Biol Res.* 1997. (30). pp. 971-979.
- DESAIAH D., REDDY S. L. N., IMAM S. Z., AND ALI S. F. Role of neuronal nitric oxide in methamphetamine neurotoxicity and protection by nNOS inhibitor. *Pure Appl. Chem.* 2000. 72 (6): 1001–06.
- DÍAZ M. Comparación de la cantidad de isoformas de óxido nítrico sintasa en hipocampo, amígdala y corteza cerebral de gatos sometidos a una condición experimental de epilepsia. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile. 2005.
- DOW S.W., DREITZ, M.J., HOOVER, E.A. Exploring the link between feline inmunodeficiency virus infection and neurologics disease in cats. *Vet Med.* 1992. (87) pp. 1181-1184
- FAGG, G.H., FOSTER, A.C., GANONG, A.H. Excitatory aminoacid synaptic mechanisms and neurological function. *Trends Pharmacol Sci.* 1986. (7). pp. 357-363.
- FERRER, D., FONSECA, C. Importancia Biológica y Participación en algunas Funciones Cardiovasculares y Hematológicas. *Medisan.* 1998. 2(3) pp. 45-53).
- FERRER, D., FONSECA, C. Radicales Libres y su papel en la Homeostasia Neuronal. *Medisan.* 1999. 3(3) pp. 5-11.
- FIGUEROA, J.P., MASSMANN, A. Estrogen increases nitric oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995. (173) pp. 1539-45.

- FOWLER, J., MCCRACKEN, E., DEWAR D., MCCULLOCH J. Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage in vivo. *Brain Res.* 2003. (991) pp. 104-112.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980. 288 (5789) pp. 373-6.
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T., GARCÍA-MARÍN, V., PÉREZ-DELGADO M., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.L., RANCEL-TORRES, N., GONZÁLEZ-FERIA, L. Nitric oxide synthase expression in the cerebral cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia.* 2000. (41) pp. 1259-68.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997. (20) pp.132-39.
- INFANTE, C., CARTIER, L., MOTLES, E. Comparative study of the epileptogenic effect of kainic acid injected into the cerebral cortex, hippocampus and amygdala in adult cats chronically implanted. *Arch Ital Biol.* 2001. (140) pp. 31-40.
- JANOS, P., SYLVESTER E. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2001. 24, (4) pp. 211-215.
- JASPER, H., AJMONE-MARSAN, C.A. A stereotaxic atlas of the Diencephalon of the cat. *Nat. Res. Council of Canada.* Ottawa. 1954.
- KLINE, KL. Epilepsy Feline. *Clin Tech Small Anim Pract.* 1998. 13 (3) pp. 152-58.
- LICINIO, J., PROLO, P., MCCANN, S.M., WONG, M. Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today.* 1999. (5) pp. 225-32.

- LUMME, A., SOINILA, S., SADENIEMI, M., HALONEN, T., VANHATALO, S. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat hippocampus after status epilepticus induced by perforant pathway stimulation. *Brain Res.* 2000. (871) pp. 303-10.
- MALENKA, R., NICOLL, R. Long-Term Potentiation- A Decade of Progress?. *Science.* 1999. (285) pp. 1870-74.
- MARTÍN, G. Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2000. (29) pp. 501-07.
- MOTLES, E., INFANTE, C., LEIVA, J., SAAVEDRA, H., MARTÍNEZ, I. Output pathway for turning behavior from the neostriatum and substantia nigra in cats. *Brain Res.* 1998. (473) pp. 65-73.
- MOTLES, E. *Fisiopatología del Sistema Nervioso. Publicaciones Técnicas Mediterráneas.* Santiago. 1993. pp. 218-30.
- MOTLES, E., CARTIER, L., INFANTE, C. Induction and blockade of epileptic foci by intracerebral injection of glutamatergic agonist and antagonist in freely moving cats. *Arch Ital Biol.* 2002. 140(1) pp. 41-50.
- OSONOE, K., MORI, N., SUSUKI, K., OSONOE, M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *Brain Res.* 1994. (663) pp. 338-340.
- REINOSO-SUÁREZ, F. *Topographischer Hirnatlas der katze für Experimentale Physiologische Untersuchungen.* Merck, Darnstadt F.R.G. 1961.
- RIGAUD-MONNET, A., HÉRON, A., SEYLAZ, J., PINARD, E. Effect of inhibiting NO on hippocampal extracellular glutamate concentration in seizures induced by kainic acid. *Brain Res.* 1995. (673) pp. 297-303.

- ROCZNIAK, A. LEVINE, D., BURNS, K. Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000. (278) pp. 702-07.
- SATOR, M., JOURA E., FRIGO, P. Terapia de Reemplazo Hormonal y Presión intraocular. *Maturitas.* 1998. (28) pp. 55-58.
- SEQUEIRA, S., MALVA, J., CARVALHO, A., CARVALHO, C. Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activation inhibits neurotransmitter release through nitric oxide formation in rat hippocampal nerve terminals. *Mol. Brain Res.* 2001. (89) pp. 111-18.
- SWANSON, L., PETROVICH, G. What is the amygdala?. *Trends Neurosci.* 1998. pp. 21: 32.