



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR PARA NEUROTROFINAS,  
TrkB, EN LA SOBREVIVENCIA DE NEURONAS DESPUÉS DE  
CONVULSIONES

**MARÍA ALEJANDRA VIEDMA CALDERÓN**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

**PROFESOR GUÍA: ENZO BOSCO VIDAL**

SANTIAGO – CHILE  
2007

## RESUMEN

BDNF es parte de un grupo de proteínas llamadas neurotrofinas, secretadas por el SNC, cuya función es permitir o promover la supervivencia, proliferación, diferenciación y crecimiento de las neuronas, al igual que el crecimiento de axones y dendritas. Según estudios inmunohistoquímicos, el receptor para BDNF, TrkB, tiene una amplia distribución en la membrana de la neurona piramidal y de menos extensa en la membrana de neurona no piramidal. Se piensa que las neurotrofinas participan en la fisiopatología de la epilepsia de lóbulo temporal.

La inducción del *status epilepticus* (SE) por ácido kaínico da como resultado una gran reorganización de los circuitos neuronales, fenómeno que ha sido estudiado con anterioridad en el hipocampo. La neurotrofina BDNF, actuando por medio de su receptor TrkB, ha sido implicada en esta reorganización. En la presente memoria de título se investigó en la corteza de ratas, como los cambios regionales en la expresión de TrkB se correlacionan con la fragmentación de ADN (apoptosis) o con alteraciones en la morfología neuronal, por medio de Western blot e inmunohistoquímica.

Se encontró que la proteína completa de TrkB disminuyó en la corteza cerebral al ser medida 24 horas hasta 1 semana después de la inducción del SE. Los análisis por medio de inmunohistoquímica revelaron una disminución en la inmunorreactividad de TrkB 72 horas después de la inducción del SE, en la capa V de la corteza motora primaria a nivel rostral y de la corteza retrosplenica a nivel medial. La disminución de TrkB fue asociada con atrofia de la dendrita basal en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza retrosplenica. No se observó correlación entre los cambios regionales de la proteína TrkB y la fragmentación del ADN, medida mediante TUNEL.

Los resultados sugieren que TrkB disminuye en regiones neocorticales específicas lo que se correlaciona con retracción dendrítica, pero no con pérdida celular después de las crisis epilépticas. La disminución global de TrkB en la neocorteza y la atrofia dendrítica pueden contribuir en la propagación de la crisis epiléptica en el cerebro epiléptico.

## SUMMARY

BDNF belongs to a group of proteins called neurotrophines, which function is to promote the survival, spread, differentiation and neuron growth, and axon and dendrite growth too. Immunohistochemical studies show that the receptor for BDNF, TrkB, has a large distribution in the piramidal neuron membrane and a minor distribution in the non piramidal neurons membrane. Neurotrophines would take part of the fisiopathology of the temporal lobe epilepsy.

Induction of *status epilepticus* (SE) by kainic acid results in a large reorganization of neuronal brain circuits, a phenomenon that has been studied primarily in the hippocampus. BDNF, by acting through its receptor TrkB, has been involved in this reorganization. The present work investigates in rat cortex, how the regional changes in TrkB expression are correlated with DNA fragmentation (apoptosis) and with neuronal morfological alterations, using Western blot and immunohistochemistry.

The full length TrkB decrease in the cerebral cortex at 24 hours, effect that was held for one week after SE induction. The immunohistochemical analysis revealed a decreased in TrkB immunoreactivity 72 hours after SE induction, in layer V of the primary motor cortex at the rostral level and of the retrosplenial cortex at the medial level. The decreased of TrkB was related with basal dendritic atrophy in the layer V piramidal neurons of the retrosplenial cortex. It was not observed a correlation between regional changes of the TrkB protein and DNA fragmentation, using TUNEL.

The results of this work suggest that TrkB decrease in specific neocortical regions wich is correlated with dendritic retraction, but not with neuronal loss after a seizure. The total TrkB decreased in the neocortex and the dendritic atrophy would contribute in the propagation of a seizure in the epileptic brain.

# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	6
<b>Revisión bibliográfica</b>	7
1. Epilepsia	7
1.1. Clasificación y causas de la epilepsia	8
1.2. Consecuencias de la epilepsia y proceso epileptogénico	9
1.3. Terapia de la epilepsia	12
1.4. Fisiopatología de la epilepsia	12
2. Anatomía funcional del cerebro	13
2.1. Neurona y sinapsis	13
2.2. Regiones cerebrales	15
3. Neurotrofinas y sus receptores	19
3.1. Neurotrofinas	19
3.2. Receptores Trk	20
4. Apoptosis	22
<b>Hipótesis</b>	24
<b>Objetivo general</b>	24
<b>Objetivos específicos</b>	24
<b>Materiales y métodos</b>	25
1. Materiales (E1)	26
1.1. Animales	26
1.2. Anticuerpos	26
2. Metodología (E1)	26
2.1. Western blot	26
3. Materiales (E2)	28
3.1. Animales de experimentación	28
3.2. Anticuerpos	28

3.3. NEURO TACS™ II IN SITU APOPTOSIS DETECTION KIT	29
4. Metodología (E2)	29
4.1. Inmunohistoquímica	29
4.3. Detección de apoptosis	31
5. Materiales (E3)	32
5.1. Animales	32
5.2. FD RAPID GOLGISTAIN™ KIT	32
6. Metodología (E3)	32
6.1. Golgi	32
7. Cuantificación de los resultados y análisis estadístico	33
<b>Resultados</b>	35
<b>Discusión</b>	49
<b>Conclusiones</b>	54
<b>Bibliografía</b>	55

## INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una patología neurológica que se caracteriza por presentar hiperexcitabilidad neuronal, lo que se manifiesta como crisis epilépticas. Durante y después de las crisis epilépticas, los circuitos neuronales se remodelan, contribuyendo potencialmente a un empeoramiento progresivo de dicha enfermedad. Las alteraciones inducidas por crisis epilépticas van desde muerte neuronal hasta reorganización morfológica y funcional de circuitos neuronales. Estos procesos son regulados por proteínas llamadas neurotrofinas. Entre las neurotrofinas, el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), que actúa a través de su receptor específico TrkB, adquiere importancia ya que está en discusión si participa en la epileptogénesis, esto es, en la generación y progresión del estado neuronal hiperexcitable.

TrkB se expresa en neuronas corticales, pero también en otras estructuras encefálicas como el hipocampo, una estructura del lóbulo temporal. El hipocampo es particularmente relevante en las epilepsias adquiridas, en que un insulto inicial (por ejemplo, una convulsión) gatilla una reorganización neuronal, lo que transforma al hipocampo en foco epiléptico. Si bien BDNF está potencialmente implicado en la epileptogénesis del lóbulo temporal, no se sabe si participa en la reorganización de la corteza cerebral después de una convulsión.

En este trabajo, se indujo convulsiones con ácido kaínico para estudiar la reorganización cortical. La hipótesis fue que aumentos de TrkB, y su interacción con BDNF en la corteza, se correlacionarían con crecimiento dendrítico y/o neuroprotección. Para ello, se examinó la relación entre los niveles de TrkB, muerte neuronal por apoptosis y cambios en la morfología neuronal después de convulsiones.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1. EPILEPSIA

La epilepsia es el desorden neurológico más común en el mundo, y una causa importante de mortalidad y discapacidad en los países desarrollados (Burneo *et al*, 2005). Es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar hiperexcitabilidad neuronal. Como consecuencia de ello, los pacientes presentan crisis epilépticas recurrentes e impredecibles, que son producto de una descarga sincrónica de poblaciones neuronales del sistema nervioso central (SNC). Estas crisis pueden ser o no convulsivas y presentar fenómenos transitorios de distinta índole, como pérdida de conciencia, manifestaciones motoras, sensoriales, autonómicas o psicológicas, o combinaciones de estos eventos que pueden ser percibidos por el paciente o un observador (Shneker y Fountain, 2003; Berendt, 2003; Chapel *et al*, 2003).

Se sabe que la epilepsia afecta alrededor de un 1% a 3% de la población humana mundial. Actualmente, con los tratamientos farmacológicos disponibles, es posible mantener libre de síntomas sólo a un 50% a 70% de los pacientes, mientras que el resto sigue experimentando crisis (Pitkänen y Sutula, 2002; Shneker y Fountain, 2003).

Esta patología es parte importante de la clínica veterinaria, siendo el segundo desorden neurológico más común en nuestras mascotas. La prevalencia de la epilepsia en caninos varía entre un 0,5% a un 5%, mientras que en gatos ha sido estimada en 0,5%. Existe una predisposición racial en perros que ha sido reportada en el Beagle, Keeshound, Tervuren Belga, Golden Retriever, Labrador Retriever, Vizla y Pastor de Shetland (Berendt, 2003).

## 1.1. CLASIFICACIÓN Y CAUSAS DE LA EPILEPSIA

Las crisis epilépticas pueden ser clasificadas según su etiología, sitio de origen, forma clínica, frecuencia o características electrofisiológicas. Los esquemas de clasificación han sido cambiados en muchas ocasiones, pero el más comúnmente usado es el de la Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por “International League Against Epilepsy”) que clasifica la epilepsia y síndromes epilépticos según su etiología (Shneker y Fountain, 2003; Guerrini, 2006) en:

**Epilepsia idiopática o primaria.** Su causa era desconocida, pero los recientes avances en biología molecular han demostrado que muchas de ellas se deben a mutaciones en canales iónicos. Como consecuencia, se altera la excitabilidad neuronal, y en algunos casos, la transmisión sináptica (Gardiner, 2005; Stephenson y Zuberi, 2005; Graves, 2006).

**Epilepsia sintomática o secundaria.** Tiene una causa conocida. La epilepsia es síntoma de la enfermedad, que ocurre como consecuencia de una malformación, tumor, trauma, vasculopatías, infecciones, hipoxia perinatal o enfermedades metabólicas (Chapel *et al*, 2003).

**Epilepsia criptogénica.** La palabra criptogénica se refiere a un origen escondido, pues se cree tiene una base multifactorial siendo su causa final desconocida (Berendt, 2003). En algunos casos se ve asociado a la presencia de signos neurológicos como retraso mental o hemiparesia, por lo que también se consideran síntoma de la enfermedad (Jallon y Latour, 2005).

La ILAE a su vez clasifica los síndromes epilépticos según la forma clínica y características electroencefalográficas en *generalizada o parcial*. La primera presenta pérdida de conciencia y es bilateral, ocurriendo con participación difusa de toda la corteza. A su vez, en la epilepsia *parcial* se identifica una zona determinada de la corteza como

origen (McNamara *et al*, 2006; Guerrini, 2006). Las crisis parciales se subdividen en crisis parciales simples (cuando no hay pérdida de conciencia) y complejas (cuando hay pérdida de conciencia). Las crisis parciales desde su foco de origen pueden generalizarse a través de vías interhemisféricas o a través de áreas subcorticales como núcleos basales, tálamo o tronco cefálico (Chapel *et al*, 2003).

En veterinaria, la nomenclatura para la epilepsia ha derivado en gran parte de la humana, pero al igual que en esta última, no ha habido acuerdo para estandarizar la terminología. Como consecuencia, la literatura en esta materia es a veces confusa considerando sus definiciones e interpretaciones.

## **1.2. CONSECUENCIAS DE LA EPILEPSIA Y PROCESO EPILEPTOGENICO**

Se ha demostrado ampliamente que los eventos convulsivos tienen consecuencias severas y duraderas en la citoarquitectura y en las funciones del cerebro, eventos influenciados por el fondo genético y el tipo de crisis que se presente. Entre sus consecuencias directas se encuentran (Meldrum, 2001; Pitkänen y Sutula, 2002):

- Inducción de muerte neuronal por apoptosis o necrosis.
- Incremento o reducción de la neurogénesis.
- Crecimiento de brotes axonales y dendríticos.
- Alteración de la expresión génica.
- Alteración de la función sináptica.
- Alteración en la funcionalidad de los canales iónicos.
- Alteración en la composición de las subunidades de los receptores.
- Alteración en la morfología neuronal.
- Activación y proliferación de las células gliales.
- Reorganización molecular de la membrana, proteínas de la matriz extracelular y de los intermediarios de la homeostasis.

En la epilepsia adquirida, un insulto cerebral inicial gatilla una cascada de eventos neurobiológicos durante un período de latencia correspondiente a la epileptogénesis (Figura N° 1), el cual, al cabo de un tiempo variable (semanas) lleva a la ocurrencia de crisis espontáneas y al diagnóstico de epilepsia. El insulto inicial puede ser un *status epilepticus* (SE, que es definido como convulsiones ininterrumpidas que duran más de 5 minutos), trauma, lesión o infección. Además, las crisis recurrentes pueden contribuir a la progresión del desorden (McNamara, 1999; Pitkänen y Sutula, 2002; Herman *et al*, 2002). El término progresión se refiere al continuo cambio funcional de las redes neuronales del SNC, lo que se debe a reorganización neuronal y sináptica (Pitkänen y Sutula, 2002). Una de las epilepsias frecuentemente adquiridas en el humano es la epilepsia del lóbulo temporal, la cual es la principal causa de epilepsia refractaria. En ella, el foco epiléptico se ubica en el lóbulo temporal, generando crisis parciales simples y complejas recurrentes. Como resultado, ocurre pérdida neuronal y esclerosis o gliosis, y por ende, pérdida de volumen hipocampal y cortical (Zhang *et al*, 2002; Chapel *et al*, 2003; Volcy-Gomez, 2004).

Para el trabajo de esta tesis, se utilizó un modelo de epilepsia temporal. Para ello, ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con ácido kaínico (ácido 3-pirrolidinoacético), un agente que estimula sinapsis glutamatérgicas (Rudge *et al*, 1998; Schetty *et al*, 2003). Ello induce un SE en forma aguda, luego de media hora de la inyección (Pastor *et al*, 2006). Semanas después de este insulto inicial, los animales presentan epilepsia. Por lo tanto, este período sin crisis espontáneas corresponde al período de epileptogénesis, durante el cual las estructuras temporales telencefálicas desarrollan hiperexcitabilidad y por lo tanto, se convierten en foco epiléptico (McNamara *et al*, 2006; Siegel *et al*, 1999).

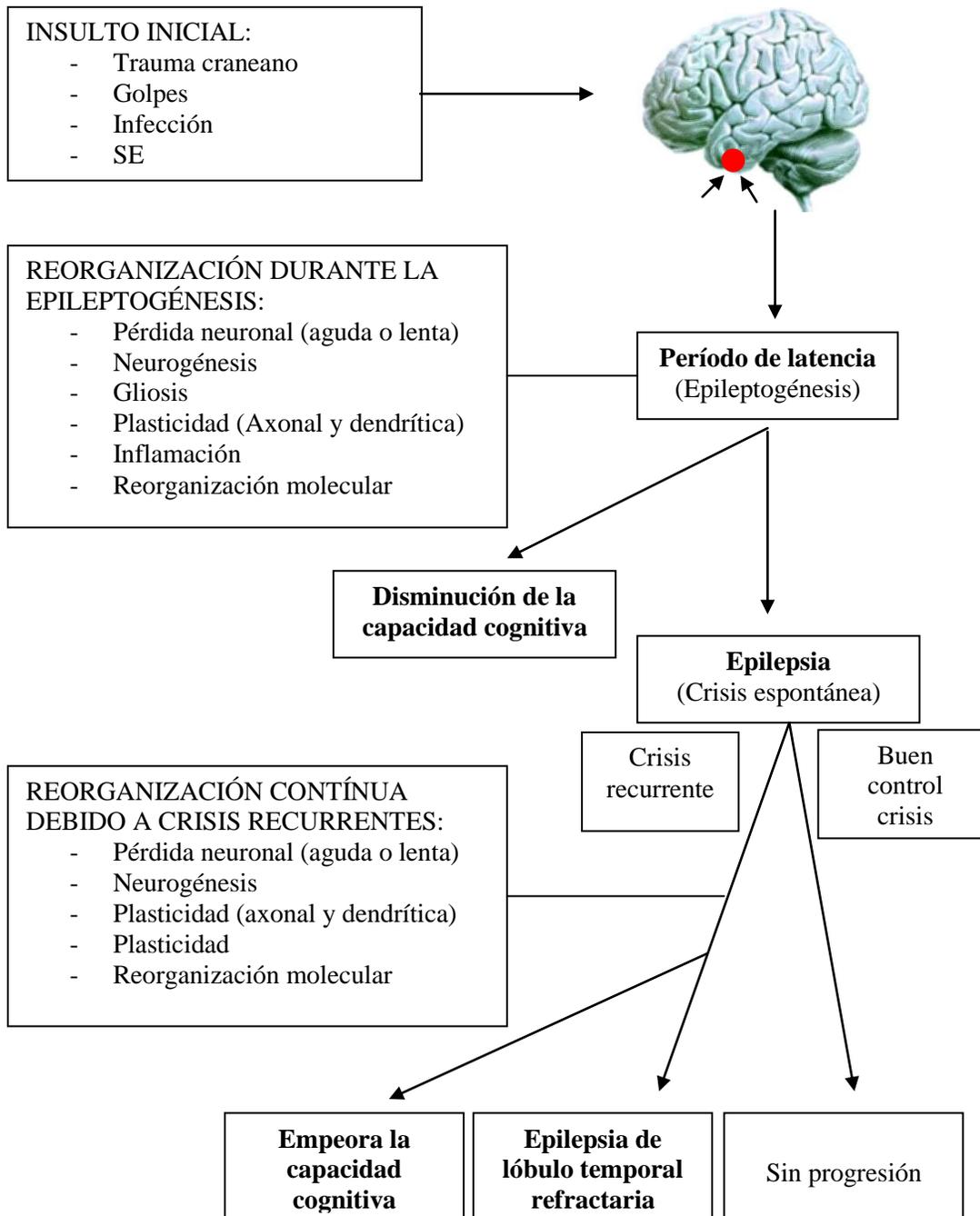


Figura N° 1: Diagrama del proceso epileptogénico a partir de un insulto cerebral inicial. (Pitkänen y Sutula, 2002)

### **1.3. TERAPIA DE LA EPILEPSIA**

Como la epilepsia es una enfermedad progresiva, un tratamiento temprano efectivo sería importante para prevenir las secuelas en el largo plazo. Este argumento hace presumir que la terapia con drogas antiepilépticas (DAE) deba ser instaurada en cualquier paciente que haya sufrido una sola crisis sin causa aparente (Shneker y Fountain, 2003). De todos modos se debe tener en cuenta que la terapia con DAE es sólo sintomática y muchas veces inefectiva, (McNamara *et al*, 2006).

Aún, pacientes tratados con DAE pueden continuar experimentando crisis, lo que se asocia con disminución de la capacidad cognitiva (Pitkänen y Sutula, 2002). En el caso de la epilepsia que no responde a terapia farmacológica o pacientes que experimentan efectos secundarios intolerables a ésta, las alternativas son el manejo quirúrgico de epilepsias parciales, lo que requiere de la identificación del foco epiléptico. También, la estimulación vagal puede prevenir o reducir las crisis (Shneker y Fountain, 2003). En caninos, la estimulación nerviosa vagal por compresión digital de los bulbos oculares ha demostrado ser benéfica en algunos pacientes (Zabara, 1992; Beredent, 2003). Otro tratamiento alternativo en algunas epilepsias infantiles es la dieta cetogénica, y ha sido propuesta como una alternativa terapéutica en el manejo de la epilepsia canina, aunque los niveles de cetosis logrados en perros son menores a los logrados en niños que mantienen bajo control sus crisis con esta dieta (Beredent, 2003; Chandler, 2006).

### **1.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA**

En la epilepsia ocurre un desbalance entre circuitos excitadores e inhibidores centrales. Los neurotransmisores involucrados son el L-Glutamato, el neurotransmisor excitatorio más abundante, y el ácido gamma-amino-butírico (GABA), el neurotransmisor inhibitor más abundante. De esta manera, un exceso de neurotransmisión glutamatérgica o una deficiencia de neurotransmisión GABAérgica pueden causar hiperexcitabilidad, lo que se traduce en despolarizaciones mantenidas de la membrana neuronal. Una consecuencia de la actividad neuronal aumentada es que ocurre una excesiva entrada de  $Ca^{+2}$  y  $Na^{+}$  al

interior de la célula, lo que activa mecanismos que llevan a la destrucción celular (Barakat *et al*, 2000; Tejeiro y Gómez-Serrano, 2003).

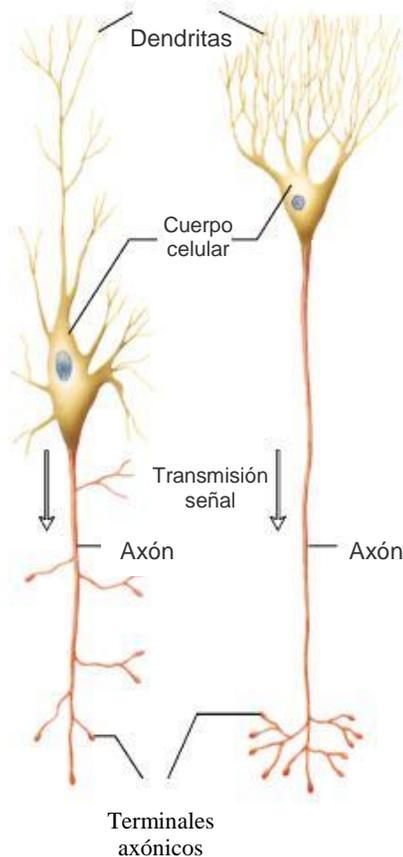
## **2. ANATOMÍA FUNCIONAL DEL CEREBRO**

### **2.1. NEURONA Y SINAPISIS**

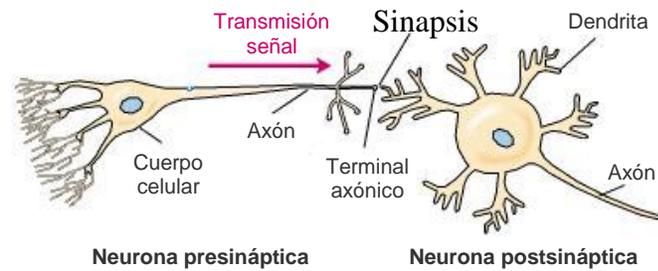
La neurona es la unidad anatómica y funcional del sistema nervioso. Como fue reconocido por Santiago Ramón y Cajal, las neuronas son unidades discretas que se comunican entre sí en sitios especializados llamadas sinapsis. La neurona es una célula polarizada, en la cual se diferencian 4 regiones con diferentes funciones: el cuerpo celular, dendritas, axón y terminales axónicos (Figura N° 2). Una característica importante de la neurona es la elaborada arborización dendrítica que surge del cuerpo celular, cuya función es recibir las señales químicas desde el terminal axónico de otras neuronas (Figura N° 3) (Lodish *et al*, 2000; Purves *et al*, 2001). En muchas neuronas corticales, las dendritas están provistas de pequeñas protrusiones llamadas espinas dendríticas, que se pueden observar con métodos como la tinción de Golgi o por microscopía electrónica (Siegel *et al*, 1999). Las espinas representan el compartimiento postsináptico de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas, donde cada espina forma una sinapsis con un terminal presináptico. Además de tener diversa morfología, las espinas tienen gran movilidad y plasticidad en períodos cortos de tiempo. Ramón y Cajal las describió como el sustrato biológico de la memoria, e hipótesis proponen que los cambios en su morfología o aparición de nuevas espinas pueden ocurrir durante el aprendizaje, donde especialmente aquellos cambios relacionados con la formación de nuevas sinapsis pueden persistir durante toda la vida y además ser un almacén de memoria (Wong, 2005). Los axones son largas prolongaciones únicas que nacen en el cuerpo neuronal especializadas en la conducción de señales eléctricas que viajan desde el cono axónico hacia los terminales axónicos (Figuras N° 2 y 3). Estas señales eléctricas son los potenciales de acción, que una vez que llegan a la terminación provocan entrada de  $Ca^{+2}$  y exocitosis de vesículas sinápticas, las cuales

contienen neurotransmisores. Éstos a su vez, interactúan con receptores específicos ubicados en la neurona postsináptica (Lodish *et al*, 2000).

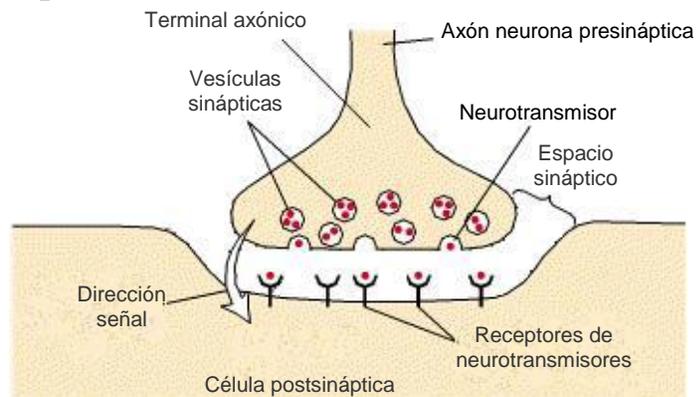
**Figura N° 2**



**Figura N° 3**



**Figura N° 4**



**Figura N° 2:** Esquema de dos neuronas en donde se observan sus dominios funcionales y la dirección que sigue la señal eléctrica desde las dendritas hacia el axón. **Figura N° 3:** Esquema que muestra la sinapsis entre una terminación axónica y una dendrita, señalando la dirección de la señal eléctrica. **Figura N° 4:** Esquema a mayor escala de una sinapsis. (Molecular cell biology).

Las sinapsis son sitios de contacto especializados entre neuronas. Se distingue un terminal presináptico que secreta los neurotransmisores que está precisamente alineado frente a la membrana postsináptica, que contiene los receptores (Figura N° 4). La interacción del neurotransmisor con receptores postsinápticos produce cambios en la permeabilidad a iones, determinando cambios de su potencial eléctrico (Lodish *et al*, 2000; Purves *et al*, 2001).

Entre los neurotransmisores más abundantes, el GABA produce una hiperpolarización de la membrana ya que ingresa  $\text{Cl}^-$  a la célula, mientras el Glutamato produce una depolarización de la membrana mediada por el ingreso de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ca}^{+2}$ . Los cambios de potencial de membrana que ocurren en una neurona en un momento dado, se integran en el cono axónico, la zona donde nace el axón, una zona especializada donde se generan potenciales de acción. Aquí, hay una alta densidad de canales de sodio sensibles a potencial. Si la depolarización alcanza el nivel umbral, se activan los canales de sodio y se dispara el potencial de acción el cual se propaga hasta llegar a las terminaciones. Los axones en general son mielinizados. En el SNC, la mielina es producida por un tipo de célula glial denominada oligodendrocito (Bustamante, 1994).

Una sola neurona puede contactar muchas otras neuronas, pero también recibe miles de sinapsis en su árbol dendrítico. De esta manera, el sistema nervioso es capaz de recibir información, procesarla y ejecutar respuestas.

## **2.2. REGIONES CEREBRALES**

El SNC está compuesto por la médula espinal, el tronco encefálico, diencefalo y telencefalo (Kandel, 1991). El presente estudio se centró en el telencefalo, constituido por la corteza cerebral y el hipocampo. En particular, se estudió cómo responde la corteza a un insulto inicial (un SE) que, después de un período de epileptogénesis, induce epilepsia temporal, o sea, hiperexcitabilidad espontánea en estructuras del lóbulo temporal, incluyendo al hipocampo.

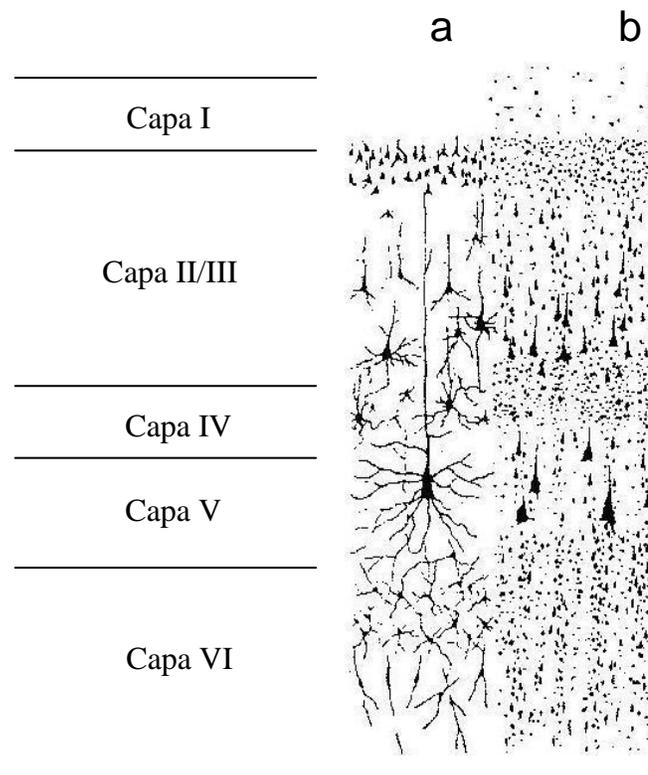
La corteza cerebral de los mamíferos es una capa de sustancia gris. Anatómicamente, existen dos hemisferios cerebrales y cada uno de ellos se divide en 4 lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital (Kandel, 1991). La corteza se divide funcionalmente en corteza sensorial, motora y de asociación. Las cortezas sensoriales reciben las aferencias desde estructuras sensoriales periféricas que informan al sujeto acerca del medio ambiente. Así, las aferencias del oído llegan a la corteza auditiva primaria (en el hombre, la circunvolución temporal superior), o las aferencias del ojo llegan a la corteza occipital o corteza visual primaria. Las cortezas motoras a su vez se activan cuando se ejecutan movimientos. Las cortezas de asociación son multimodales y se asocian con el procesamiento de la información (Valverde, 2002).

La corteza cerebral presenta una organización celular característica, pudiéndose distinguir diferentes capas celulares: El isocortex o neocorteza presenta 6 capas celulares mientras que en una corteza filogenéticamente más antigua, llamada allocortex, se observan sólo 3 capas celulares. Esta última está representada por el archicortex (hipocampo y giro dentado) y el paleocortex (corteza olfativa) (Purves *et al*, 2001; Valverde, 2002). Cada una de estas capas contiene neuronas cuya morfología es característica. Entre ellas se distinguen (Bustamante, 1994):

- **Neuronas piramidales**, las hay desde pequeñas hasta gigantes (cuerpo de 10 a más de 100  $\mu\text{m}$ ), su cuerpo celular es piriforme y poseen una dendrita apical prominente.
- **Neuronas granulares** o estrelladas, que miden 4-8  $\mu\text{m}$ .
- **Neuronas fusiformes o polimorfos**, de forma y tamaño variable.
- **Neuronas horizontales de Cajal** que son pequeñas y fusiformes, orientadas horizontalmente.
- **Neuronas de Martinotti** que son pequeñas células multiformes presentes en todos los niveles de la corteza.

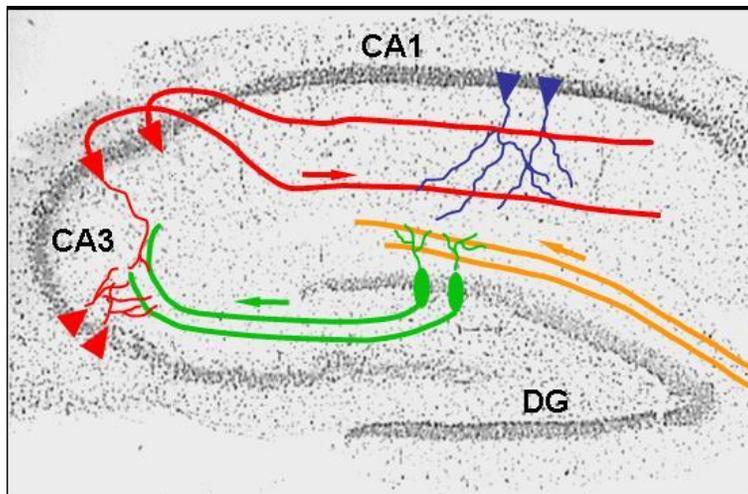
En algunas capas neocorticales predominan las neuronas granulares y en otras, las piramidales. Además, la corteza contiene axones aferentes o eferentes que se pueden observar con tinciones contra mielina. Las capas celulares se pueden observar al microscopio óptico utilizando diversas tinciones y son (Figura N° 5):

- Capa molecular o plexiforme con escasas células y numerosas fibras horizontales (I).
- Capa granular externa o capa de las pirámides pequeñas con células piramidales y granulares pequeñas (II).
- Capa piramidal externa con células piramidales de tamaño mediano (III).
- Capa granular interna con células granulares pequeñas (IV).
- Capa piramidal interna o de las grandes pirámides (V).
- Capa de células fusiformes o polimorfas (VI).



**Figura N° 5: Disposición de las capas neuronales en la neocorteza (a) Tinción de Golgi que muestra las ramificaciones neuronales y (b) Tinción cresil violeta que muestra los cuerpos neuronales. Modificado de World wide web <<http://membres.lycos.fr/wamcyril/physio-page02.htm>>**

El hipocampo, con una evolución intermedia entre la paleocorteza olfatoria y la neocorteza, forma parte del sistema límbico. Es una invaginación en el interior de la prolongación temporal del ventrículo lateral, en la cual forma su piso (Bustamante, 1994). Sus neuronas forman complejos circuitos que tienen un rol importante en el aprendizaje, memoria y emociones (Kandel, 1991). El hipocampo forma un gran cilindro abierto a un lado, cuya estructura principal, el asta de Ammón (con zonas denominadas CA1, 2, 3 y 4) siguen la misma forma. La organización histológica del hipocampo difiere de la del resto de la corteza, pues como dijimos anteriormente tiene sólo 3 capas, en que la capa intermedia está formada por células piramidales. En el asta de Ammón, las células piramidales aumentan de tamaño desde CA1 a CA3, con dendritas apicales, que disminuyen en largo de CA1 a CA3, las que se dirigen hacia la superficie de la corteza. La vía de entrada del hipocampo es la vía perforante, la cual contacta la corteza entorrinal con las neuronas granulares del giro dentado. Estas neuronas a su vez emiten axones, las llamadas fibras musgosas, que contactan las neuronas piramidales de CA3. Finalmente, las neuronas piramidales de la CA3 se conectan con las de la CA1 por colaterales axónicas (llamadas colaterales de Shaffer). Las neuronas de la CA1 se encuentran frecuentemente lesionadas en casos de epilepsia de lóbulo temporal (Figura N° 6) (Bustamante, 1994; Hargreaves, 1995).



**Figura N° 6: Circuitos sinápticos en el hipocampo. En naranja las fibras aferentes de la corteza entorrinal. En verde se observan las fibras musgosas que nacen en el giro dentado y se comunican con la zona CA3. En rojo se muestran las neuronas piramidales de la CA3 y las colaterales de Schaffer, que comunican con las neuronas piramidales de la CA1 en azul. (Modificado de Blitzer *et al*, 2005. *Biol Psychiat* 57: 113)**

### **3. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES**

#### **3.1. NEUROTROFINAS**

Las neurotrofinas forman parte de una gran familia de factores de crecimiento, o citoquinas, que se secretan en el SNC y permiten la supervivencia, proliferación, diferenciación y crecimiento de las neuronas, así como el crecimiento de axones y dendritas.

Como ya se comentó, se piensa que las neurotrofinas participan en la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Las neurotrofinas, o factores neurotróficos, son seis pequeñas glicoproteínas básicas que comparten entre un 50% a 60% de homología en su composición aminoacídica (Leibrock *et al*, 1989). Cuatro de ellas han sido caracterizadas en mamíferos. Ellas son: el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), la neurotrofina 4 (NT-4) (ésta última también conocida como neurotrofina 5 o NT-5), mientras que las otras dos, la neurotrofina 6 (NT-6) y la neurotrofina 7 (NT-7), han sido identificadas sólo en peces y probablemente no tengan homólogos en mamíferos o aves (Huang y Reichardt, 2001). Las neurotrofinas son secretadas al espacio extracelular y el efecto de ellas en las células blanco depende de su interacción con una familia de receptores transmembrana que son tirosina kinasas y se denominan Trk. TrkA es el receptor para NGF, TrkB para BDNF y NT-4, y TrkC para NT-3 (Figura N° 7) (Miller y Kaplan, 2001).

Todas las neurotrofinas interactúan también con el receptor conocido como p75, o receptor “de baja afinidad” (Miller y Kaplan, 2001; Chao, 2003). Los receptores Trk transmiten señales positivas, como aumento de la supervivencia neuronal y neurogénesis, mientras que los receptores p75 transmiten señales tanto positivas como negativas. Estas últimas pueden llevar a la muerte neuronal por apoptosis (Miller y Kaplan, 2001).

### 3.2. RECEPTORES TRK

Los receptores Trk son tirosina kinasas transmembrana que cuando se activan, se autofosforilan. De esta manera, regulan diversas funciones celulares (Huang y Reichardt, 2003). Según estudios inmunohistoquímicos, el receptor para BDNF, TrkB, tiene una amplia distribución en la membrana de neuronas piramidales de la capa V, donde está presente tanto en los somas, axones, dendritas y en las sinapsis, mientras que en neuronas no piramidales se encuentra principalmente en sus somas (Cellerino *et al*, 1996; Yan *et al*, 1997).

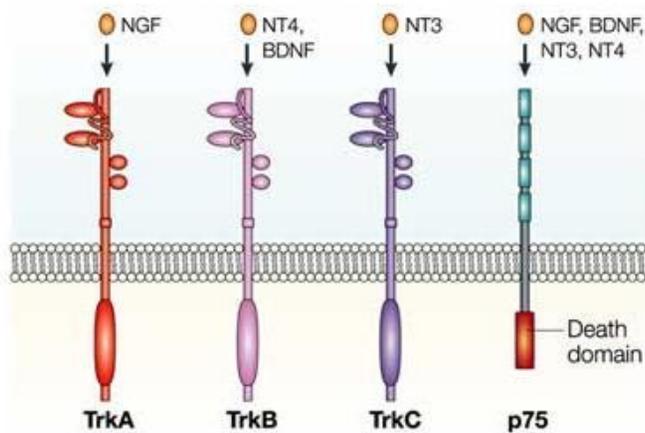


Figura N° 7

Figura N° 7. Receptores y sus neurotrofinas correspondientes. (Chao, 2003. Nat rev Neurosci 4 (4): 300)

BDNF es la neurotrofina más abundante en el adulto, se secreta en las sinapsis del telencéfalo donde tiene un papel importante en la plasticidad de la sinapsis, lo que se relaciona con el aprendizaje y la memoria (Huang y Reichardt, 2003; Lee *et al*, 2001).

Cuando los receptores TrkB se encuentran inactivados o subactivados, p75 media la apoptosis, por lo que se ha concluido que los receptores TrkB silenciarían la actividad proapoptótica de p75 (Miller y Kaplan, 2001). Por otro lado, los receptores p75 se expresan en niveles muy bajos (casi indetectables) en el SNC adulto en comparación con TrkB (Yan

y Johnson, 1989), en el cual se expresan sólo en respuesta a insultos cerebrales (Miller y Kaplan, 2001).

Mediante procesamiento diferencial o alternativo se produce una isoforma de TrkB trunca (TrkB<sub>T</sub>), una molécula idéntica extracelularmente a TrkB pero que carece de su dominio tirosina kinasa intracelular (Fryer *et al*, 1996). Estas isoformas truncas son más abundantes en células gliales en el SNC adulto (Ohira *et al*, 2005). Las funciones de estos receptores trancos son pobremente entendidas y a pesar de ciertas evidencias que sugieren que ellos pueden afectar directamente la señalización intracelular, la actividad tirosina kinasa es esencial para la gran mayoría de las respuestas a neurotrofinas mediadas por receptores Trk. (Huang y Reichardt, 2003). Se ha visto que en células no nerviosas, los receptores trancos pueden aumentar la concentración local efectiva de neurotrofinas capturándolas y presentándolas al TrkB de largo completo (TrkB<sub>fl</sub> por “full length” TrkB). Evidencia reciente también indica que las isoformas truncas ayudan a regular la expresión de los receptores TrkB en la superficie celular. (Huang y Reichardt, 2003).

Por lo tanto, la respuesta de una neurona a una neurotrofina requiere que un receptor Trk se exprese en la superficie celular. En cultivos de neuronas del SNC, se observó que los receptores Trk se localizan en vesículas intracelulares en la ausencia de señales. La actividad eléctrica estimula la inserción de Trk en la superficie celular por exocitosis de las vesículas citoplasmáticas que contienen este receptor, lo que está mediado por AMPc y Ca<sup>+2</sup>. Así, la actividad neuronal no sólo estimula la expresión y secreción de BDNF, sino además la presencia de TrkB en la membrana. Es esperable entonces que la actividad eléctrica durante las crisis epilépticas lleve a un exceso de señalización por neurotrofinas (Binder *et al*, 2001; Binder, 2004).

Diversos estudios muestran que después del SE, que lleva a epilepsia del lóbulo temporal, se induce un aumento en la expresión de factores neurotróficos y de sus receptores en el hipocampo (Rudge, 1997; Binder *et al.*, 2001; Shetty, 2003). Algunos estudios muestran que esto estaría asociado a neuroprotección: la infusión crónica de BDNF lleva a un incremento del neuropéptido Y (NPY) en el hipocampo, el cual es un

inhibidor de la excitabilidad de éste (Riebel *et al*, 2001) y la interacción de TrkB con los receptores NMDA (N-metil-d-aspartato) disminuye la exitotoxicidad del glutamato (Zhu *et al*, 2005). Sin embargo la mayoría de los estudios proponen que el aumento de BDNF sería epileptogénico pues aumenta la excitabilidad neuronal, el crecimiento de axones, formando así sinapsis recurrentes, y la arborización dendrítica, todo esto estudiado en el hipocampo (Binder *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003; Rose *et al*, 2004; Hu y Kalb, 2003; Scharfman, 2005). Si bien estas acciones mediadas por BDNF pueden tener consecuencias pro convulsivas, al mismo tiempo las señales de promoción de la sobrevivencia de TrkB podrían contrarrestar la muerte celular inducida por el SE (Huang y Reichardt, 2003; Kalb, 2005).

TrkB activado (o sea, fosforilado) está presente en el giro dentado, lo que se correlacionaría con crecimiento de colaterales axonales que hacen sinapsis recurrentes sobre neuronas excitadoras, aumentando así la excitabilidad del circuito por una retroalimentación positiva (Shetty *et al*, 2003). Si bien el papel del BDNF en la epileptogénesis en el hipocampo aún se discute, poco se sabe cómo BDNF participa en la reorganización de la corteza cerebral después de SE.

#### **4. APOPTOSIS**

Las células tienen dos alternativas de muerte celular, la necrosis y la apoptosis, o muerte celular programada. La apoptosis depende de complejas cascadas celulares y por lo tanto, es más lenta que la necrosis. Estas cascadas intracelulares llevan a fragmentación de ADN, por lo cual la presencia de ADN fragmentado en una célula es considerada un marcador de apoptosis (Chuaqui *et al*, 1996).

El ADN fragmentado puede ser identificado por medio de técnicas histoquímicas como lo es el TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling”). Esta técnica tiene una sensibilidad que varía entre un 61% y 90%, mientras que su especificidad es mayor al 87%, pero cae cuando hay cierto predominio de necrosis

inducida por la injuria por lo que es importante evaluar la morfología nuclear (Kelly *et al*, 2003).

Después de SE inducido con ácido kaínico, las regiones que presentan abundante apoptosis son la corteza entorrinal (zona de la corteza adyacente al hipocampo donde nace la vía perforante), corteza piriforme (una corteza límbica) e hipocampo (Goutan *et al.*, 1998).

## **HIPÓTESIS**

El receptor para BDNF, TrkB, se expresa con un patrón característico en diferentes zonas corticales después de SE. Los aumentos de TrkB se correlacionarían positivamente con crecimiento dendrítico y negativamente con la presencia de apoptosis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la expresión de TrkB después de SE en la corteza cerebral e hipocampo y establecer una correlación entre la expresión de TrkB con cambios morfológicos neuronales y presencia de apoptosis.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el contenido de TrkB en corteza cerebral 72 horas después de la inducción de SE.
- Establecer la distribución del receptor TrkB en condiciones de normalidad neurológica.
- Establecer la distribución de TrkB 72 horas después de SE.
- Corroborar la presencia de apoptosis posterior a convulsiones a través de la detección de ADN fragmentado.
- Coinmunodetectar TrkB y ADN fragmentado.
- Reconocer la morfología dendrítica en regiones cerebrales que expresan niveles diferenciales de TrkB después de SE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes, ubicada en San Carlos de Apoquindo 2200, Santiago. Este proyecto fue aprobado por la Comisión de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, según lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica. Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para evitar el sufrimiento de los animales.

De manera de cumplir con los objetivos planteados, se realizaron tres aproximaciones experimentales. La primera fue la cuantificación del receptor TrkB mediante la técnica de “Western blot” (E1) en neocorteza de ratas control y experimentales. La segunda consistió en realizar inmunohistoquímica para determinar la distribución de TrkB en condición control y experimental, y la existencia de localización con ADN fragmentado por medio de la técnica de TUNEL (E2). La tercera consistió en utilizar la técnica de Golgi, la cual permite observar las ramificaciones dendríticas de una neurona (E3).

En estas tres experiencias el tratamiento de los animales fue siempre el mismo. Las ratas fueron alojadas en el bioterio de la Universidad con agua y alimento concentrado *ad libitum*, y el ciclo luz-oscuridad y temperatura controlados. El modelo de epilepsia utilizado en las ratas es de tipo temporal, el cual fue inducido por ácido kaínico. Las ratas fueron pesadas y alojadas en jaulas individuales para posteriormente inyectar suero salino a las ratas control e inducir convulsiones mediante la inyección intraperitoneal de ácido kaínico (10 mg/kg) a las ratas experimentales. La aparición de convulsiones se produce aproximadamente 30 minutos después de la inyección, llevándose un registro de su evolución temporal. La intensidad de las convulsiones se mide en 6 grados que son: grado 1, inmovilización, vista fija, movimientos faciales y de boca; grado 2, sacudidas; grado 3, hiperactividad, movimiento clónico de las patas delanteras y cabeceo; grado 4, movimiento clónico de las patas delanteras y cabeceo parado sobre sus extremidades posteriores; grado 5, movimiento clónico de las patas delanteras y cabeceo parado sobre sus extremidades

posteriores y cae en decúbito; grado 6, saltos y vueltas. Fueron seleccionadas aquellas ratas que llegaron mínimo al grado 4, o que se mantengan por 4 horas en grado 3 (Zhang *et al.*, 1997). Para controlar que la convulsión es la que produce los cambios y no el ácido kaínico por si solo, se realizó un experimento paralelo con aquellas ratas que fueron tratadas pero que no convulsionaron, para comparar los niveles de expresión de TrkB, entre éstas y las que fueron seleccionadas.

## **1. MATERIALES (E1)**

### 1.1. ANIMALES

Se utilizó como animales experimentales 400 ratas Sprague – Dawley machos, de peso entre 150 y 250 g.

### 1.2. ANTICUERPOS

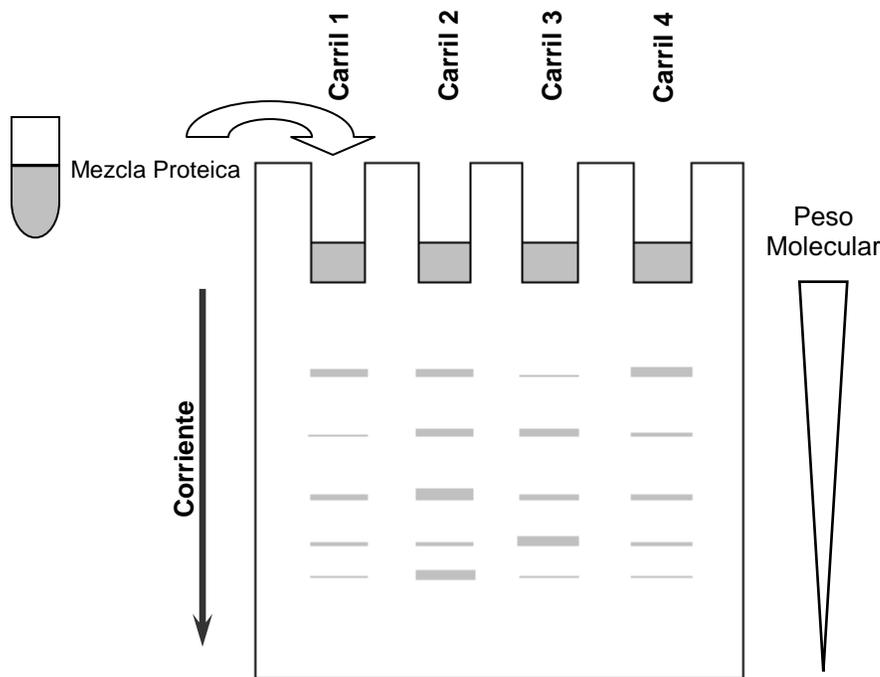
Los anticuerpos utilizados fueron un anticuerpo primario anti-TrkB de ratón (BD Transduction Laboratories, USA) y uno secundario anti-ratón hecho en cabra (Calbiochem-Novabiochem Corporation, CA, USA).

## **2. METODOLOGÍA (E1)**

### 2.1. “WESTERN BLOT”

Las ratas control y tratadas fueron decapitadas en experimentos independientes a las 6, 24, 72 horas y 1 semana después de la inyección con ácido kaínico (10 mg/kg) los que fueron realizados a lo largo de un año de estudio. Se juntaron y homogenizaron tres cerebros cada vez, formando pooles control y experimentales. Las neocortezas fueron separadas del resto del cerebro y homogenizadas en tampón de homogenización (Hepes-Na 5 mM, sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (BoehringerMannheim), pH 7,4) a 4°C. A cada uno de los homogenizados se le midió la concentración de proteínas por medio de la técnica del ácido bicinonínico. Basándose en la determinación de proteínas, los homogenizados fueron diluidos a 1 mg/ml en tampón de carga para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes SDS-

PAGE (0,25 M tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 50% glicerol, 5%  $\beta$ -mercapto-EtOH, 0,5% azul Bromo-fenol). Cada carril fue cargado con la misma cantidad de proteínas (20  $\mu$ g) y se realizó la electroforesis (Figura N° 8). El gel fue teñido con Azul de Coomassie para comprobar cargas iguales o rectificar si fuese necesario (Figura N° 9 y 10). Una vez igualadas las cargas, se realizó electroforesis, pero ahora las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa para realizar Western blot. Una vez transferidas las proteínas, la membrana fue bloqueada con leche descremada en polvo al 5% en PBS (solución tampón salina fosfatada: NaCl 0,138 M, KCl 2,7 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,694 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM) por una hora, luego fue incubada con el anticuerpo primario anti-TrkB en una concentración 1/1000. Posteriormente fue lavada con PBS con 0,1% del detergente Tween e incubada con el anticuerpo secundario en leche en una concentración de 1/5000 por 90 minutos. Los lavados finales se realizaron con PBS. La presencia de la proteína TrkB fue revelada por quimioluminiscencia (NEN Life Science Products), y el film fue escaneado y analizado por densitometría mediante el programa Adobe Photoshop 7.0.



**Figura N° 8: Diagrama de un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes en que las proteínas se separan según su peso molecular. Cada muestra de homogenizado es depositada en carriles independientes. Al aplicar una diferencia de potencial a través del gel, las proteínas migran según su peso molecular.**

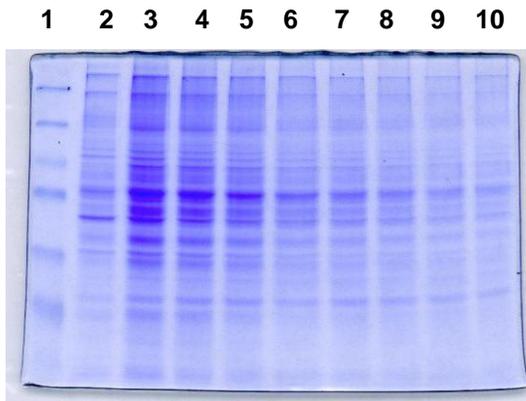


Figura Nº 9

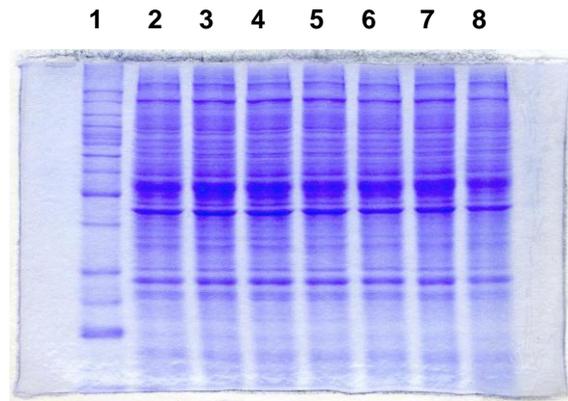


Figura Nº 10

Figura Nº 9 y 10: Imagen de dos geles coomassie donde en ambos el primer carril corresponde a un marcador de peso molecular estándar y los siguientes a carriles cargados con muestras proteicas. En el primer gel se puede observar la diferencia en la carga proteica entre carriles los que se observan de distinta intensidad. Este gel debe ser escaneado y cada carril cuantificado para igualar las cargas y preparar otro gel corregido que será el transferido a la membrana de nitrocelulosa. La Figura Nº 10 muestra los carriles 2 a 7 con cantidades de proteína muy similares.

### 3. MATERIALES (E2)

#### 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizó como animales experimentales 20 ratas Sprague - Dawley machos, de peso entre 150 y 250 g.

#### 3.2. ANTICUERPOS.

Los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica fueron un anticuerpo primario policlonal anti-TrkB de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) y un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA).

### 3.3. NEURO TACS™ II IN SITU APOPTOSIS DETECTION KIT (R&D Systems, MN, USA).

Kit para el desarrollo de la técnica de TUNEL mediante la cual se detectan por medio de colorimetría los extremos de los fragmentos de ADN generados por la apoptosis. El kit presenta los siguientes reactivos: NeuroPore, TACS-Nuclease, tampón TACS-Nuclease, tampón de marcación TdT 10X, enzima TdT, Tampón de detención TdT 10X, Streptavidina-HRP2, solución DAB, mezcla TdT dNTP,  $Mn^{+2}$  50X, Blue Counterstain.

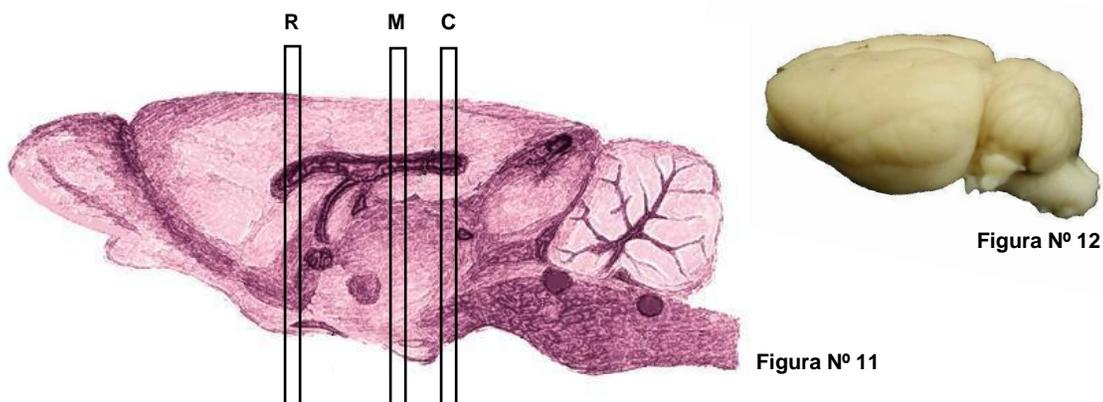
## 4. METODOLOGÍA (E2)

### 4.1. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las ratas, controles y tratadas con ácido kaínico, fueron anestesiadas con hidrato de cloral (416 mg/kg) 72 horas después de la estimulación con ácido kaínico, para luego ser perfundidas por vía intracardíaca con PBS a 37° C seguido de fijador (paraformaldehído al 4%, ácido pícrico al 0,3% y glutaraldehído al 0,1%) primero a 37° C y luego a 4° C. Los cerebros fueron disectados y postfijados a 4° C durante toda la noche. Después los cerebros fueron crioprotegidos en sacarosa al 10% y al 30%. Posteriormente los cerebros fueron cortados en el plano coronal con 30  $\mu$ m de grosor en un criomicrotomo (Microm, Walldorf, Germany), se seleccionaron aquellos localizados aproximadamente en Interaural 9,20 mm y Bregma 0,20 mm para los cortes rostrales, Interaural 5,7 mm y Bregma -3,30 mm para los cortes mediales e Interaural 2,96 mm y Bregma -6,04 mm para los cortes caudales (Paxinos and Watson, 1997), cortes que luego fueron recolectados en PBS azida al 0,02% hasta su utilización. Aquellos cortes seleccionados se depositaron en placas de cultivo de 24 pocillos para ser lavados en PBS.

El protocolo de inmunohistoquímica para TrkB fue el siguiente: Los cortes fueron lavados con PBS e incubados en agua oxigenada al 0,5% para bloquear la peroxidasa endógena. Los cortes fueron lavados nuevamente en PBS e incubados en solución de bloqueo (PBS Tritón al 0,2%, albúmina de cabra al 5% y albúmina de vaca al 16%) por una hora. Después fueron incubados por 72 horas en solución de bloqueo con un anticuerpo

primario anti-TrkB en una concentración de 1/4000. Luego los cortes se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado en una concentración de 1/1000 por dos horas en solución de bloqueo. Posteriormente fueron lavados en PBS y luego incubados en solución ABC (Complejo Avidina - Biotina - Peroxidasa) en una concentración de 1/250 por 90 minutos para amplificar la marca. Una vez lavados en PBS, se reveló la marca incubando los cortes con el sustrato de la peroxidasa, DAB (3,3'-diaminobenzidina) al 0,05% en una solución de Tampón Tris con agua oxigenada al 0,01% y NiCl<sub>2</sub> al 0,15% (que da color negro a la marca) por 4 a 8 minutos en oscuridad, para ser lavados en agua bidestilada y PBS. Los cortes destinados al estudio de colocalización de TrkB y marcadores de apoptosis, previo a la técnica de TUNEL eran procesados bajo este protocolo sin la presencia de NiCl<sub>2</sub> por lo que la marca es de color anaranjada. Finalmente los cortes fueron montados con un medio resinoso, para ser observados al microscopio óptico (Axioskop, Zeiss). Las imágenes de inmunohistoquímica (con aumento 2,5x, 10x y 100x), se tomaron usando una cámara digital (Coolpix 995, Nikon) acoplada al microscopio, y se transfirieron a un computador para ser analizadas por densitometría mediante el programa “Adobe Photoshop 7.0”.



**Figura N° 11: Diagrama de un corte sagital del cerebro de rata en donde se observan 3 zonas demarcadas como R (rostral), M (medial) y C (caudal), en donde se selecciona el corte adecuado. Modificado desde Word wide web <<http://faculty.virginia.edu/behvr-neuro-lab/images/RatBrainbLabels.jpg>>**

**Figura N° 12: Vista lateral de un cerebro de rata disectado y fijado. World wide web <<http://serendip.brynmawr.edu/bb/kinser/images/ratside101.jpg>>**

## 4.2. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

La apoptosis se detectó mediante la técnica de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling”) usando “neuroTACS TM In Situ Apoptosis Detection Kit” (R&D Systems, Minneapolis, USA). Los cortes obtenidos y seleccionados bajo el mismo criterio de la inmunohistoquímica, fueron procesados en forma individual en una placa de cultivo de 24 pocillos. A cada corte control y experimental se agregó NeuroPore por 30 minutos a 25° C para permeabilizar el tejido. Se realizó un control positivo incubando por 30 minutos con TACS-Nuclease (Deoxinucleotidil transferasa) y su tampón para verificar la eficiencia de los reactivos. Posteriormente los cortes experimentales y control positivo se lavaron con agua destilada libre de ADNasa y se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de inhibición (agua oxigenada al 3% y metanol). Después se lavaron con PBS Túnel y se equilibró con tampón de marcación TdT (“Terminal deoxinucleotidyl Transferase”) por 5 minutos. Luego las muestras fueron incubadas en la mezcla de reacción (Tampón de marcación TdT + deoxinucleotidos + enzima TdT +  $Mn^{+2}$ ) por una hora a 37°C y se detuvo la reacción con tampón de detención por 5 minutos. Luego se lavó con PBS Túnel ( $NaH_2PO_4$  0,345 g,  $Na_2HPO_4$  1,065 g y  $NaCl$  8,619 g) y se incubó con Streptavidina-HRP por 10 minutos. Se lavaron nuevamente las muestras con PBS Túnel y se reveló con solución DAB por 2 – 10 minutos para finalmente ser lavadas con agua destilada. Aquéllas en las que sólo se realizó el protocolo de TUNEL luego de ser lavadas con agua destilada, se contratiñeron con “Blue Counterstain” para verificar la morfología de las células. Los cortes fueron montados con un medio resinoso para ser observados al microscopio (Zeiss, Axioskop). Las células apoptóticas, que contenían cuerpos apoptóticos densos y precipitado nuclear condensado y oscuro fueron contadas bajo un objetivo de aumento 40x en 10 campos seleccionados al azar. Los puntajes para las células apoptóticas por área fueron asignados como: + = < 10, ++ = 10-100, +++ = > 100.

## **5. MATERIALES (E3)**

### **5.1. ANIMALES**

Se utilizó como animales experimentales 23 ratas Sprague – Dawley machos, de peso entre 150 y 250 g. De ellas 9 fueron control y 14 fueron experimentales.

### **5.2. “FD RAPID GOLGISTAIN™ KIT” (FD Neuro Technologies, Inc., MD, USA).**

Esta técnica consiste en observar la morfología neuronal ya que, al sumergir un corte en los reactivos que se describirán, algunas neuronas y todas sus proyecciones se tiñen con plata, haciéndolas visibles al microscopio.

Este kit presenta cinco reactivos: La solución A que contiene dicromato de potasio y cloruro de mercurio; la solución B que contiene cromato de potasio; y las soluciones C, D y E de identidad química secreta.

## **6. METODOLOGÍA (E3)**

### **6.1. GOLGI**

Ratas controles y tratadas con ácido kaínico, fueron anestesiadas con hidrato de cloral (416 mg/kg) 72 horas después de la estimulación con ácido kaínico, para luego ser perfundidas por vía intracardiaca con PBS a 37° C y paraformaldehído al 4% primero a 37°C y después a 4°C. Los cerebros fueron disectados y depositados en la solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche. Fue importante en este proceso el no contacto con metales, utilizándose sólo instrumentos de plástico o vidrio. Los cerebros fueron procesados usando FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD Neuro Technologies, Inc., Ellicott city, MD, USA). Estos fueron depositados en una mezcla de partes iguales de las soluciones A y B, preparada 24 horas antes, por dos semanas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Después los cerebros fueron cambiados a la solución C por 48 horas a 4° C. Posteriormente los cerebros fueron cortados en el plano coronal en un criomicrotomo

(Microm, Walldorf, Germany) a un grosor de 120  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron montados en portaobjetos y secados al aire. En una cámara húmeda fueron lavados con agua destilada y luego incubados con una mezcla de una parte de la solución D, una parte de E y dos partes de agua bidestilada por 10 minutos protegidos de la luz. Finalmente fueron lavados con agua destilada y deshidratados en una gradiente alcohólica para luego ser montados en un medio resinoso y ser observados al microscopio. De los cortes se seleccionaron 15 neuronas según el siguiente protocolo: (1) no deben tener dendritas cortadas, (2) su tinción debe ser oscura y pareja a lo largo del campo dendrítico y (3) deben estar relativamente aisladas de neuronas vecinas teñidas para evitar interrupciones. Luego de escanear las imágenes obtenidas mediante un microscopio con cámara lúcida (500X, BH-2 Olympus Co., Tokio, Japan) estas fueron analizadas mediante el programa “NIH Image 1.6”. El análisis morfométrico se restringió a las neuronas piramidales de la capa V en la corteza retrosplenica y auditiva en Interaural 5,70 y Bregma -3,30 (Paxinos y Watson, 1997).

## **7. CUANTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el Western blot la cantidad de TrkB presente en cada muestra se cuantificó mediante densitometría, empleando el programa “Adobe Photoshop 7.0”, el cual permitió comparar la intensidad y tamaño de las bandas marcadas en base a la medición de píxeles. Los resultados se expresaron como razones de cambio en relación al pool control.

En la inmunohistoquímica se analizó el hipocampo, corteza piriforme y neocorteza. La cuantificación de TrkB se realizó por medio del análisis densitométrico de los píxeles representativos (oscuros) en áreas de igual tamaño, mediante el programa Adobe Photoshop. El análisis se realizó en la totalidad de la corteza y en las capas II/III y V. En el hipocampo se analizó la CA1, la CA3 y el giro dentado, y en el caso de la corteza piriforme se analizó una porción de ella. Los resultados fueron comparados mediante razones de cambio en relación al animal control. Las razones de cambio de cada área estudiada fueron promediadas entre los experimentos, resultando una razón de cambio promedio a la cual se le estimó significancia, desviación estándar y error estándar.

Con la técnica de Golgi en cada neurona se analizó el largo dendrítico y el número de puntos de ramificación utilizando el programa “NIH Image 1.6”. El largo dendrítico fue cuantificado en un perímetro dendrítico apical y basal el cual es medido por el programa en  $\mu\text{m}$ . En cuanto a las ramificaciones estas se contabilizan directamente partiendo por las primarias (que nacen en el soma), siguiendo con las secundarias (que nacen de las primarias), hasta las últimas ramificaciones.

La inmunohistoquímica y los “Western blot” para TrkB fueron analizados por una prueba de t con el programa Graph Pad Prism4. Los estudios morfológicos fueron analizados mediante una prueba de U Mann-Whitney. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  error estándar (EE) de experimentos independientes. Se consideró significativo el valor de  $p < 0.05$  que se señala con \*. Los valores de  $p < 0.01$  se señalan con \*\* y  $p < 0.001$  se señalan con \*\*\*.

## RESULTADOS

### I. Determinar el contenido de TrkB en corteza cerebral 72 horas después de inducción de SE (E1)

Para realizar los Western blot, se utilizó homogenizado de telencéfalo. La Figura N° 13 muestra Western blots representativos y la cuantificación de los cambios de TrkB en los homogenizados de corteza luego del SE usando un anticuerpo contra un dominio extracelular, el que detecta tanto isoformas completas como trucas (Tabla N° 1). Sin embargo, ambas isoformas pueden diferenciarse claramente por su peso molecular, siendo el de TrkB<sub>f1</sub> de 145 kDa y el TrkB<sub>T</sub> de 95 kDa. Analizando el curso temporal de los cambios, fue evidente que la isoforma completa empezó a disminuir desde las 24 horas después de la inyección de ácido kaínico (Figura N° 13). La forma trunca muestra una disminución que comienza a ser significativa a partir de las 72 horas después del SE, permaneciendo disminuída una semana después de la crisis. Estos resultados fueron inesperados, ya que se había reportado que en el giro dentado del hipocampo, el SE inducía aumentos en la expresión de TrkB. Por ello, estos resultados se comprobaron con inmunohistoquímica, técnica que además permite detectar diferencias entre diferentes zonas telencefálicas.

	Tiempo después de la inyección de ácido kaínico			
	6	24**	72***	1 sem***
n	4	6	11	11
Promedio	0.9906	0.7073	0.6271	0.754
DE	0.08837	0.1385	0.196	0.1501
EE	0.04418	0.05654	0.05911	0.04525
Valor de p	0.8456	0.0035	< 0.0001	0.0003

**Tabla N° 1: Niveles de TrkB<sub>f1</sub> 6, 24, 72 horas y 1 semana después de la inducción del SE, donde n= número de ratas, Promedio= razones de cambio promedio entre control y experimental, DE= desviación estandar, EE= error estandar.**

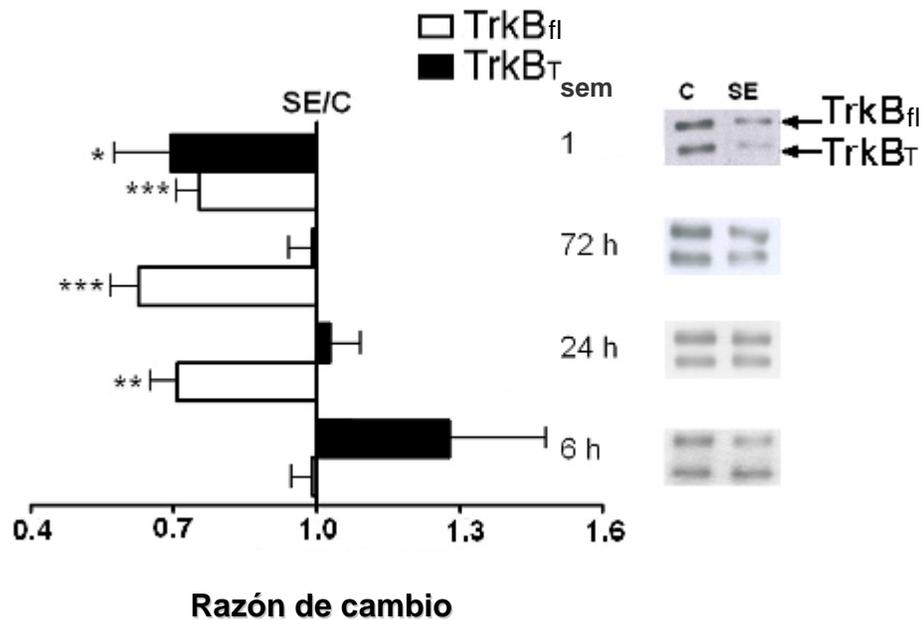


Figura N° 13: Gráfico que muestra los niveles de TrkB analizados por Western blot 6, 24, 72 horas y 1 semana después de la inducción de la crisis. TrkB completo (TrkB<sub>fl</sub>) y trunco (TrkB<sub>Tr</sub>) fueron cuantificados por densitometría. Se muestran las razones de cambio con respecto al control (\* p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001).

## II. Establecer la distribución del receptor TrkB en condiciones de normalidad neurológica y 72 horas después de convulsiones (E2)

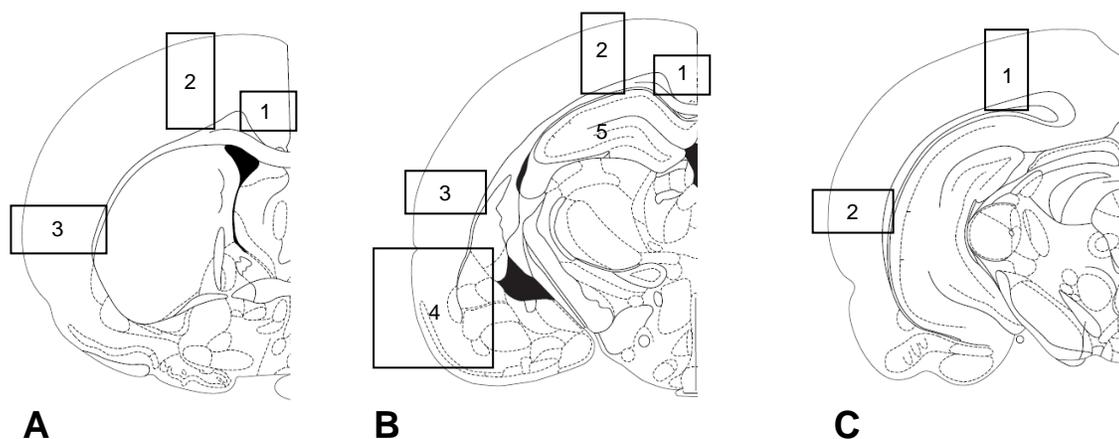
TrkB se detectó por inmunohistoquímica en animales control y 72 horas después del SE, ya que según la literatura, en este momento se observa apoptosis (Lan *et al*, 2000; Tooyama, 2002) lo que permitiría la comparación de ambos fenómenos.

Para ello, se realizaron cortes coronales y se analizó la presencia de TrkB en las regiones señaladas en la Figuras N° 14 que corresponden a cortezas límbicas (A-1 y B-1), motoras (A-2 y B-2) y sensoriales (A-3, B-3, C-1 y C-2), además del hipocampo (B-5) y la corteza piriforme (B-4). La presencia de TrkB se analizó en cortes coronales del cerebro, en

tres niveles: rostral, medial y caudal. A nivel rostral fueron analizadas la corteza cingulada anterior, motora primaria y somatosensorial primaria; a nivel medial fueron analizadas la corteza retoesplénica ventral, motora y auditiva; y a nivel caudal fueron analizadas la corteza visual y auditiva.

Las figuras de la neocorteza muestran que la inmunoreactividad de TrkB se localizó predominantemente en la capa V, pero también en las capas II/III. Las células de la capa V pudieron ser fácilmente identificadas como neuronas piramidales por su cuerpo celular piriforme, la dendrita apical prominente y las dendritas expandiéndose desde su cuerpo celular, mientras que en la capa II/III las células parecen ser predominantemente granulares. Neuronas granulares menos teñidas pudieron ser vistas en toda la corteza.

El episodio convulsivo inducido por la inyección de ácido kaínico produjo cambios en la distribución y presencia del receptor TrkB, la cual pudo ser observada y cuantificada en las zonas mencionadas. Las razones de cambio con respecto al control son mostradas en las tablas 1, 2 y 3 con asteriscos en base a su significancia (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figura N° 14:** (A) Diagrama del corte coronal rostral donde se muestran (1) la corteza cingulada anterior, (2) motora primaria y (3) somatosensorial primaria. (B) Diagrama del corte coronal medial donde se muestran (1) la corteza retoesplénica ventral, (2) motora, (3) auditiva, (4) piriforme e (5) hipocampo. (C) Diagrama del corte caudal donde se muestran (1) la corteza visual y (2) auditiva.

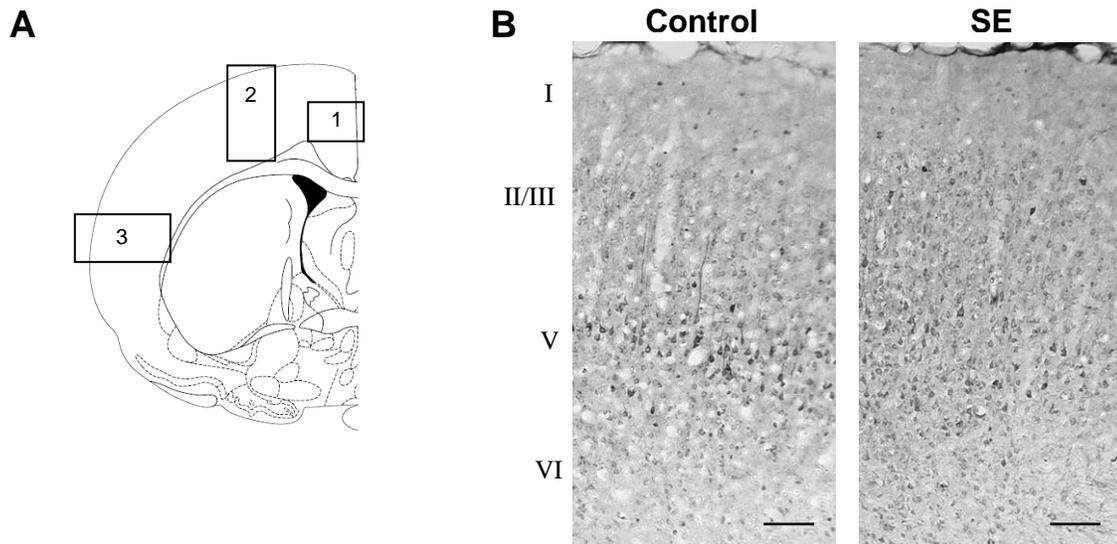
**a) Cortes Rostrales**

La cuantificación de TrkB en cortes rostrales se muestra en la Tabla N° 2, en que el promedio corresponde al cambio en densidad óptica del grupo experimental sobre el control. La inmunoreactividad se cuantificó a través de todas las capas (Total) y también por capa celular, específicamente, en las capas II/III y V, donde se localizan las neuronas que expresan TrkB.

**CORTE ROSTRAL**

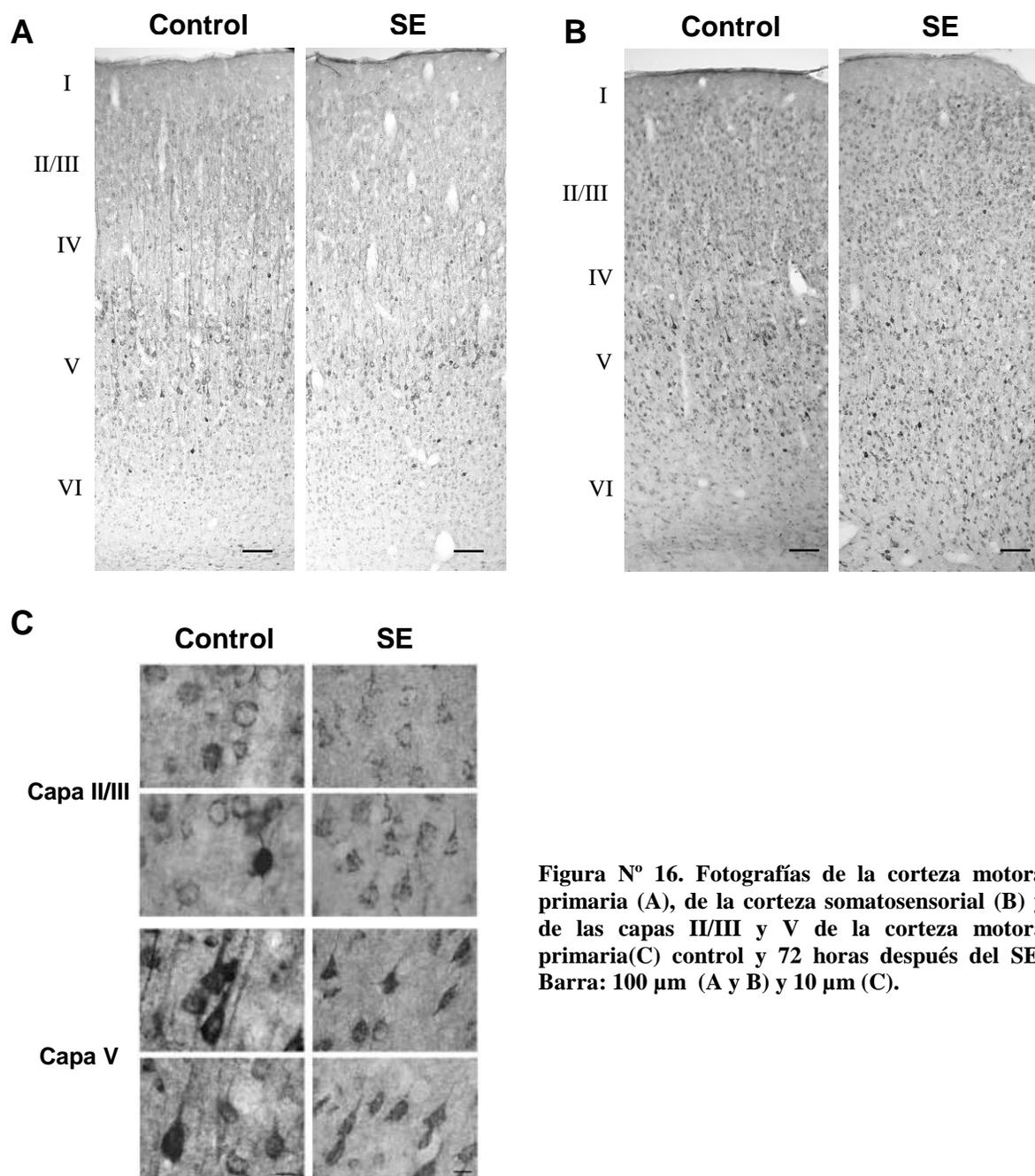
	Cingulada anterior (1)			Motora primaria (2) *			Somatosensorial primaria (3)		
	Total	II / III	V	Total *	II / III *	V *	Total	II / III	V
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Promedio	1,058	2,75	0,74	0,54	0,44	0,56	2,08	2,80	1,95
DE	0,602	3,32	0,28	0,26	0,28	0,24	2,12	3,91	2,33
EE	0,301	1,66	0,14	0,13	0,14	0,12	1,06	1,96	1,17
Valor p	0,861	0,37	0,16	0,04	0,03	0,03	0,38	0,42	0,47

**Tabla N° 2: Análisis del área cingulada anterior, motora primaria y somatosensorial. Se indica el número de ratas n, el promedio de cambio de densidad óptica con respecto al control (promedio), la desviación estándar DE, el error estándar EE y el valor de p.**



**Figura N° 15: Inmunohistoquímica de TrkB en cortes rostrales después de SE. (A) Diagrama del corte coronal del nivel rostral donde se muestran las zonas analizadas. (B) Fotografías de la corteza cingulada anterior control y 72 horas después del SE. Barra: 100 μm.**

A nivel rostral no se observó cambio en la inmunoreactividad de TrkB en el área cingulada anterior (Figura N° 15B). En cambio, en el área motora primaria se observa una disminución de la inmunoreactividad de TrkB de un  $46 \pm 13\%$  (Promedio  $\pm$  EE), tanto en las capas II / III como en la V (Figura N° 16A). En la capa V, la marca de TrkB se vio disminuida tanto en los somas neuronales como en las dendritas apicales, de las cuales desaparece (Figura N° 16C). El área somatosensorial primaria no experimentó cambios significativos (Figura N° 16B).



**Figura N° 16. Fotografías de la corteza motora primaria (A), de la corteza somatosensorial (B) y de las capas II/III y V de la corteza motora primaria(C) control y 72 horas después del SE. Barra: 100  $\mu$ m (A y B) y 10  $\mu$ m (C).**

## b) Cortes Mediales

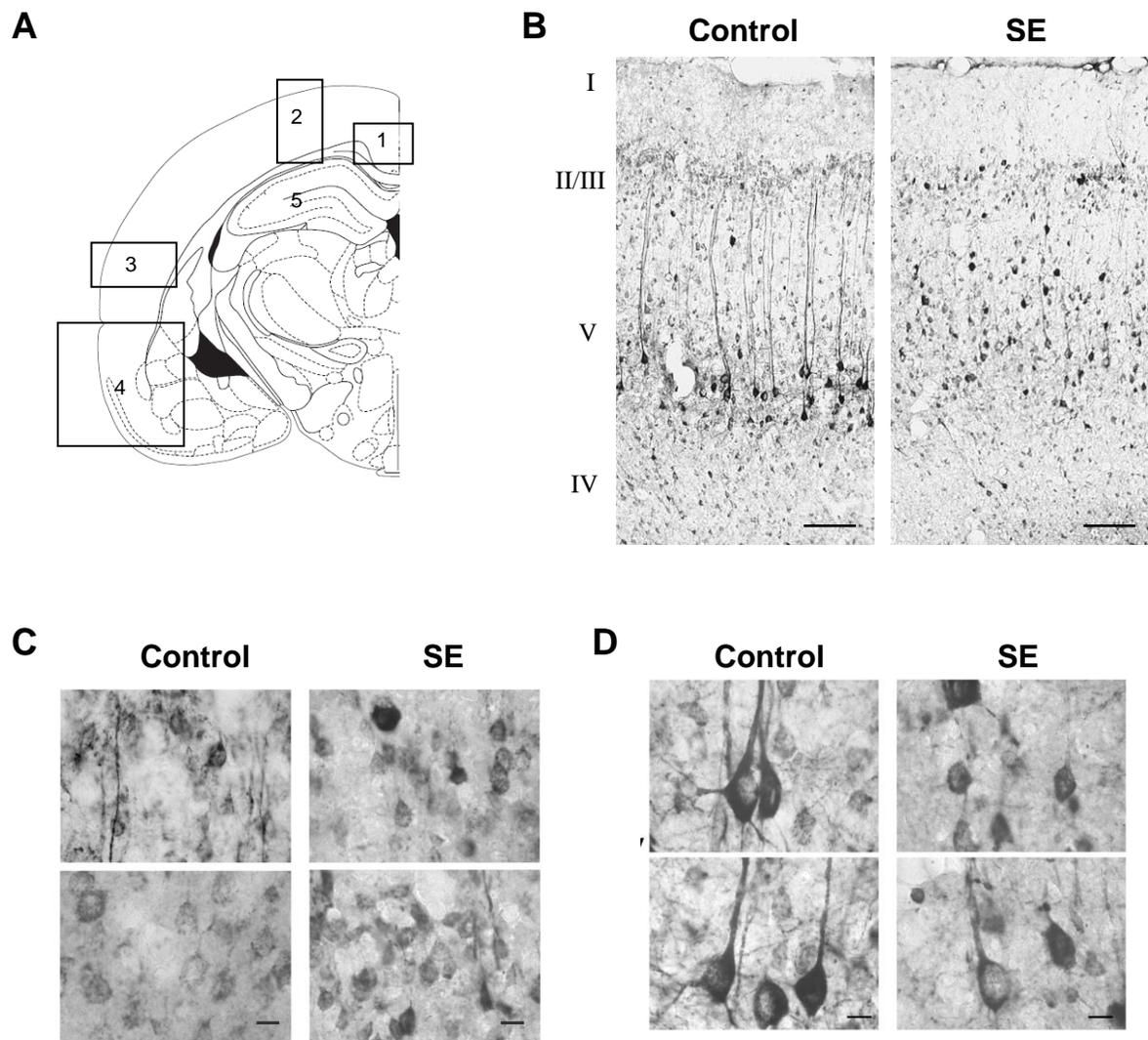
Como se puede observar en la Tabla N° 3, después del SE, se observa una disminución de la inmunoreactividad total de TrkB de un  $40\% \pm 5\%$  (promedio  $\pm$  EE), en el área retroesplénica ventral (Figura N° 17B). En la capa V ocurrió una disminución significativa de un  $58\% \pm 9\%$ , mientras que no se alteró en las capas II/III (Figura N° 17C). En la capa V, se observó menor tinción de TrkB tanto en el soma neuronal como en la dendrita apical de las neuronas piramidales, que fue acompañada de una evidente retracción celular (Figura N° 17D).

### CORTE MEDIAL

	Retroesplénica ventral (1) **			Motora (2)			Auditiva (3)		
	Total **	II / III	V *	Total	II / III	V	Total	II / III *	V
n	4	4	4	4	4	4	6	6	6
Promedio	<b>0,60</b>	<b>1,07</b>	<b>0,42</b>	<b>0,88</b>	<b>1,11</b>	<b>0,91</b>	<b>1,56</b>	<b>2,10</b>	<b>1,06</b>
DE	0,10	0,52	0,17	0,57	0,74	0,37	0,64	0,91	0,69
EE	0,05	0,26	0,09	0,29	0,37	0,18	0,26	0,37	0,28
Valor p	0,005	0,81	0,01	0,71	0,79	0,65	0,08	0,03	0,84

	Hipocampo			Piriforme
	CA1 *	CA3	GD	Pir *
n	6	7	7	6
Promedio	0,6869	0,9027	0,9612	1,546
DE	0,3051	0,2332	0,2884	0,5973
EE	0,1245	0,08813	0,109	0,2438
Valor p	0,03125	0,1485	0,4688	0,01565

**Tabla N° 3: Resultados del análisis de la neocorteza del corte medial (arriba) y resultados del análisis del hipocampo y sus regiones respectivas, y de la corteza piriforme (abajo) del corte medial.**

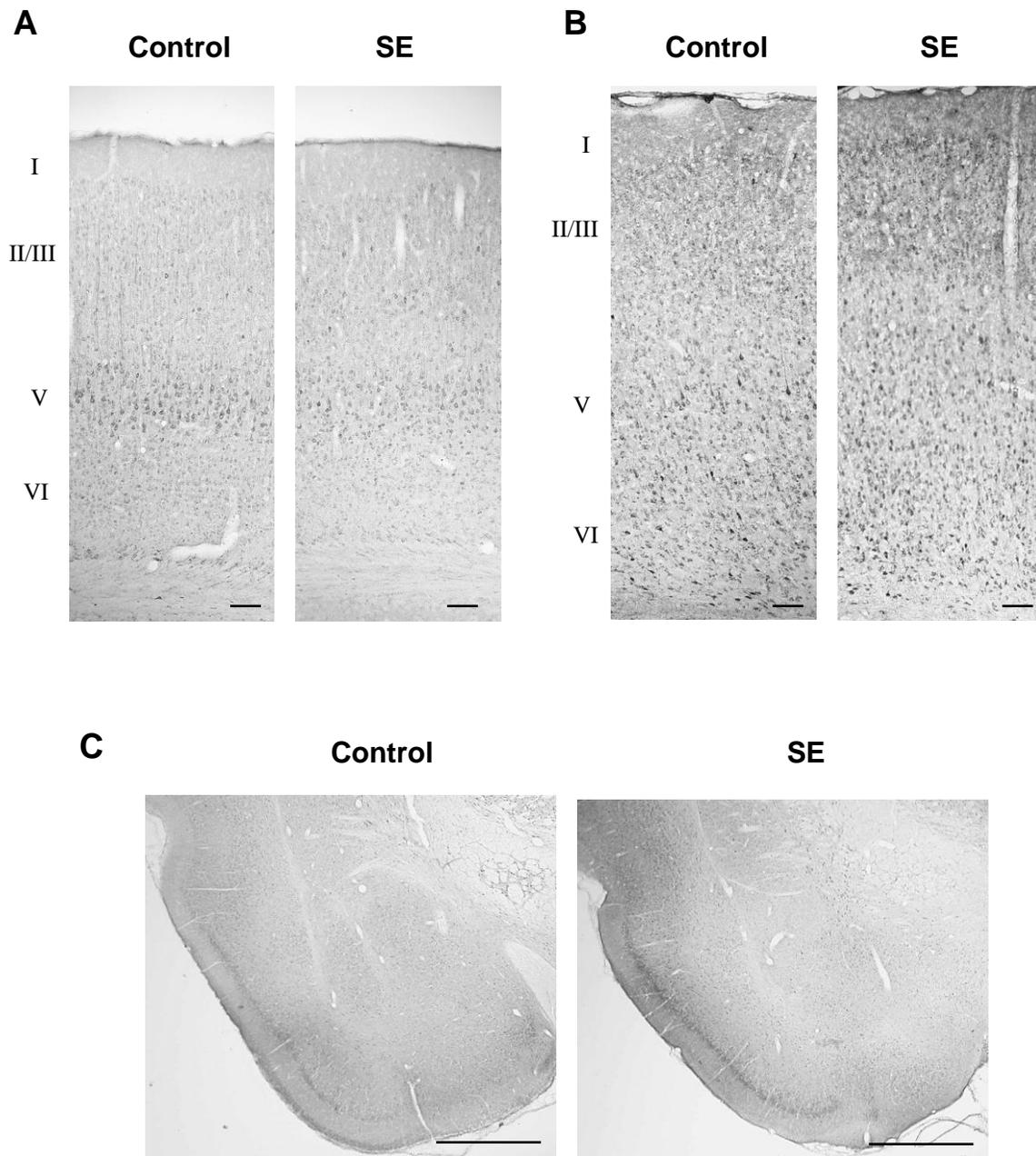


**Figura N° 17:** (A) Diagrama del corte coronal a nivel medial con sus respectivas zonas analizadas. (B) Fotografía de la corteza retrosplenica, corte control y SE. Barra: 100  $\mu$ m. Fotografías, con un mayor aumento, de las capas II/III (C) y de la capa V (D). Barra: 10  $\mu$ m.

En la corteza auditiva a su vez, la inmunoreactividad de TrkB no cambi6 cuando se cuantific6 a trav6s de todas las capas (Figura N° 18B), se mantuvo en la capa V, pero aument6 en las capas II/III en un  $110\% \pm 37\%$ , aumentando el n6mero de c6lulas marcadas. Interesantemente, las neuronas piramidales de la capa V fueron menos intensamente te6idas despu6s del SE, pero hubo una mayor densidad de c6lulas te6idas. As6 la

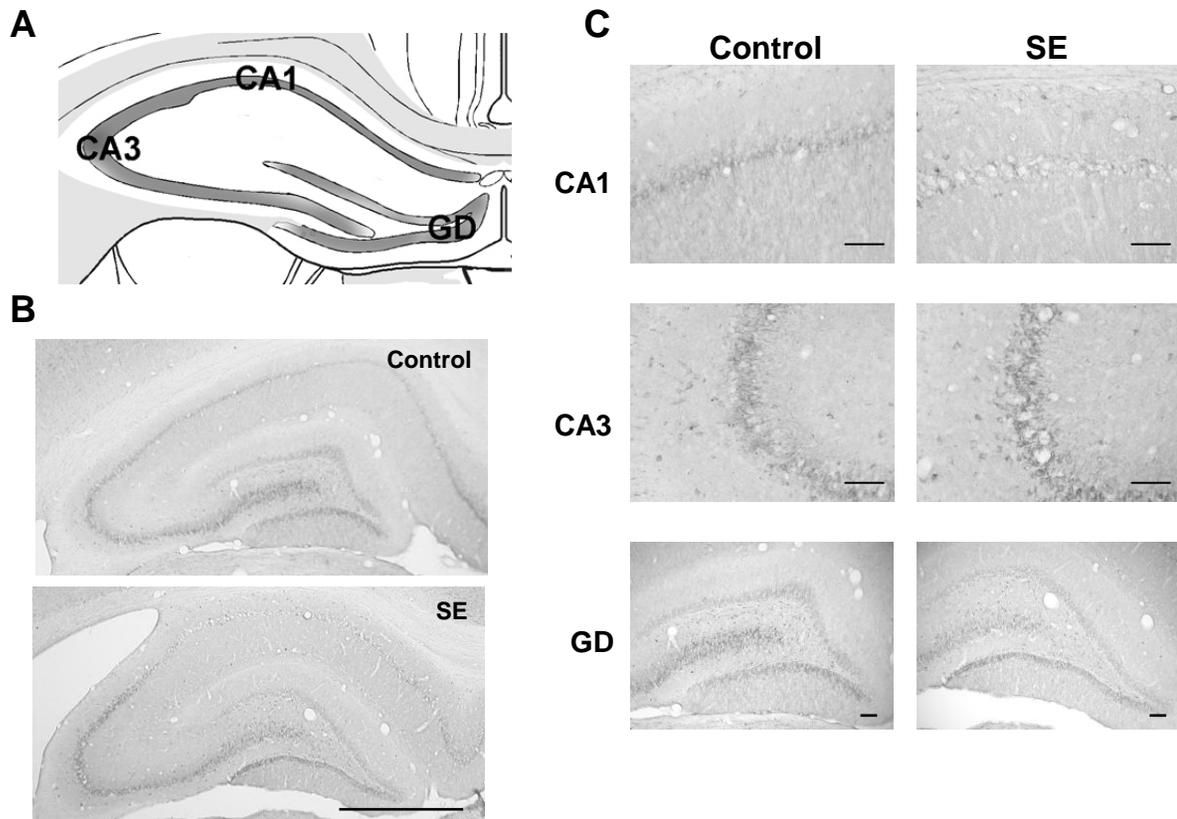
cuantificación por capas se compensó por el aumento en una capa y la disminución en la otra, resultando la inmunoreactividad total sin cambio.

La corteza motora primaria no reveló cambios significativos (Figura N° 18A).



**Figura N° 18: Fotografías que muestran la inmunoreactividad de TrkB control y 72 horas después de la inyección con ácido kaínico en corteza motora (A), corteza auditiva (B) y corteza piriforme (C). Barra: 100  $\mu$ m (A y B) y 1000  $\mu$ m (C).**

En la corteza piriforme, una región muy susceptible a fragmentación de ADN y apoptosis luego de la inducción del SE por ácido kaínico (Weiss *et al*, 1996), se observó un aumento de TrkB en un  $55 \pm 24\%$  (Figura N° 18 C).



**Figura N° 19:** (A) Esquema del hipocampo. (B) Fotografías que muestran la inmunoreactividad de TrkB en diferentes capas celulares del hipocampo en el corte coronal medial. Barra: 1000  $\mu\text{m}$ . (C) A la derecha se muestran fotografías de las regiones CA1, CA3 y giro dentado con mayor aumento. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

En el hipocampo (Figura N° 19B), se observó una disminución de un  $31\% \pm 12\%$  en CA1, y no presentaron cambios el giro dentado ni la región CA3 (Figura 19 C).

c) **Cortes Caudales:**

Como muestra la Tabla N° 3, en este nivel no se observó cambios significativos ni en la corteza visual ni en la auditiva (Figura N° 22).

**CORTE CAUDAL**

	Visual (1)			Auditiva (2)		
	Total	II / III	V	Total	II / III	V
n	4	4	4	4	4	4
Promedio	3,808	5,93	1,62	2,53	2,20	2,42
DE	5,06	9,92	0,96	1,93	3,14	1,48
EE	2,53	4,96	0,48	0,96	1,57	0,74
Valor p	0,35	0,39	0,29	0,21	0,50	0,15

Tabla N°3: Resultados de la cuantificación de la inmunoreactividad de TrkB en la corteza visual y auditiva del corte caudal.

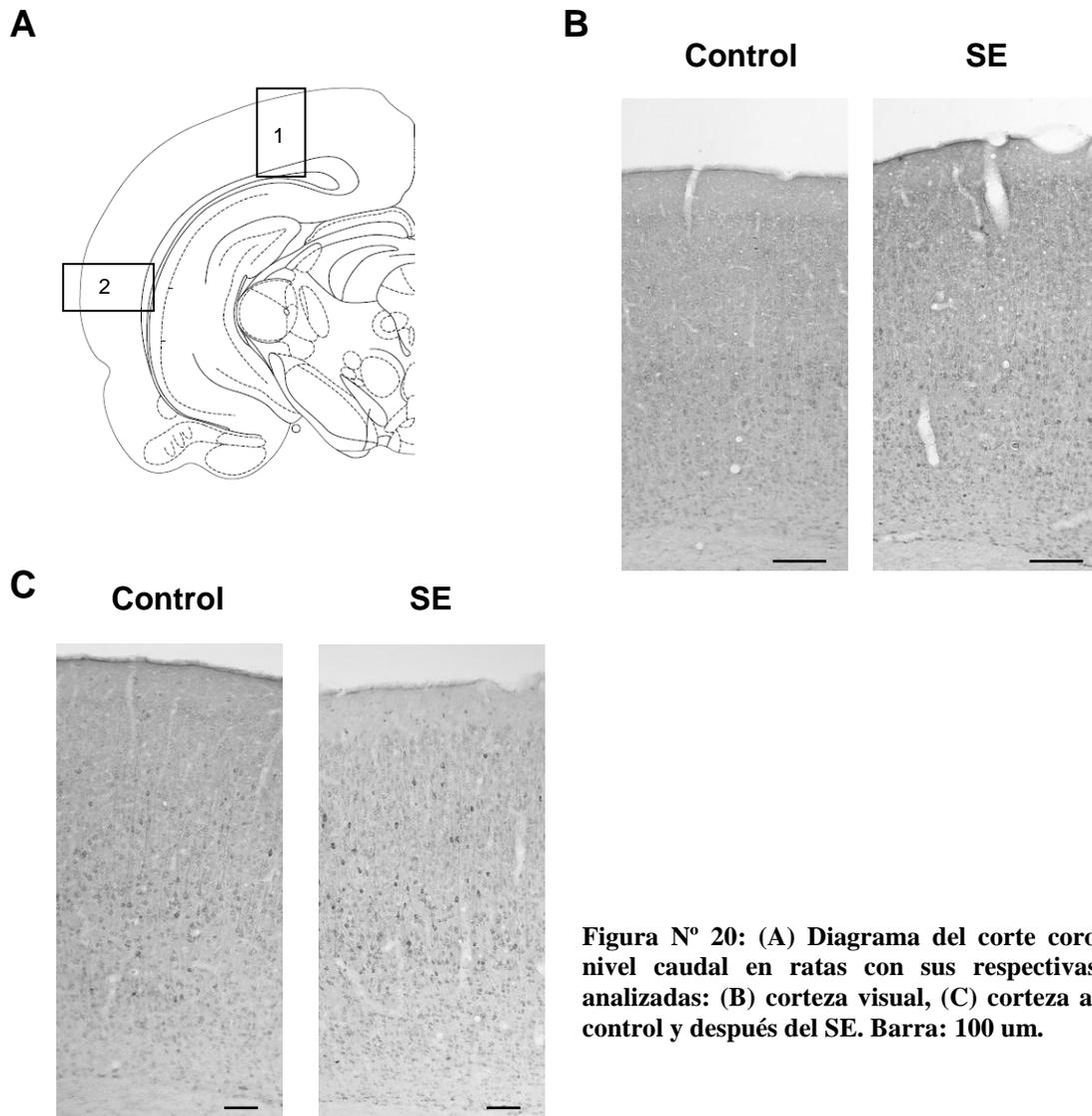


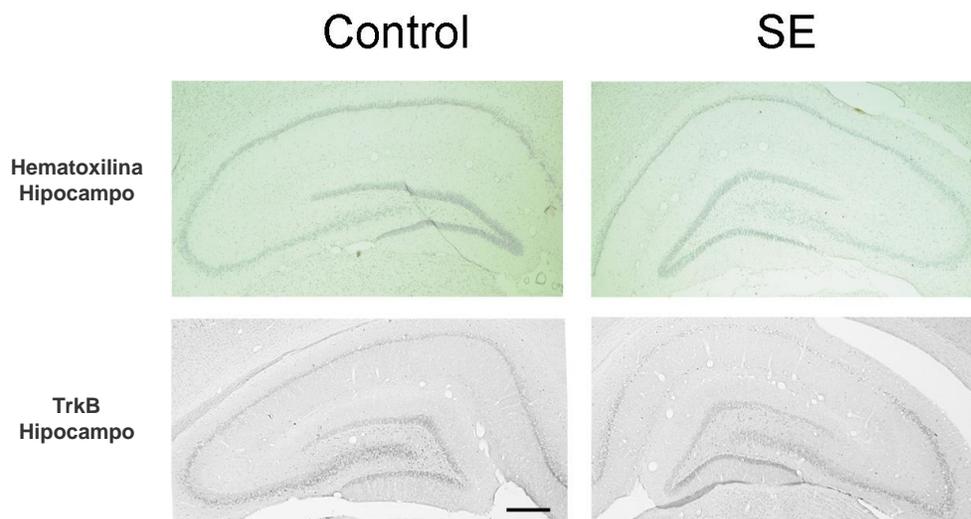
Figura N° 20: (A) Diagrama del corte coronal del nivel caudal en ratas con sus respectivas zonas analizadas: (B) corteza visual, (C) corteza auditiva, control y después del SE. Barra: 100 um.

Estos resultados muestran que al detectar TrkB mediante inmunohistoquímica en telencéfalo después de SE, los cambios son específicos para ciertas regiones cerebrales. TrkB disminuyó específicamente en la zona CA1 del hipocampo, en las cortezas morota primaria y retrosplénica ventral, a diferencia del aumento observado en la corteza piriforme. Por lo tanto, se quiso establecer si los cambios de TrkB se correlacionaban con la presencia de ADN fragmentado.

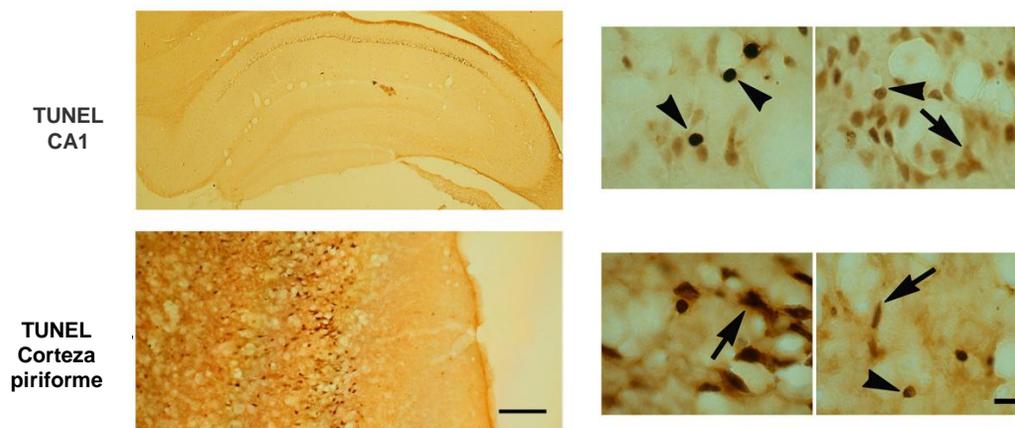
### **III. Establecer la presencia de apoptosis posterior a convulsiones mediante la técnica de TUNEL. Coinmunodetectar TrkB y TUNEL (E3)**

Mediante la técnica de TUNEL, se determinó si los niveles de TrkB estaban asociados con el aumento de la fragmentación del ADN, lo que es indicio de apoptosis. Como ha sido reportado previamente (Weiss *et al*, 1996), en el hipocampo, las células apoptóticas fueron más abundantes en la zona CA1 (+++), seguida de la zona CA3 (++) y el giro dentado (+). En la corteza las células positivas a TUNEL variaron entre los animales en diferentes localizaciones de la neocorteza, pero fue siempre alta en la corteza piriforme (+++). Dos regiones con alta tinción de TUNEL mostraron cambios opuestos en los niveles de TrkB, por ejemplo la región CA1 y la corteza piriforme (Figura N° 21 y 22). En la Figura N° 21 se muestra una tinción con hematoxilina, indicando la presencia de cuerpos celulares en las regiones hipocampales de animales control y SE.

Se observó que en las zonas con alto índice TUNEL (CA1 y piriforme), TrkB colocaliza en neuronas TUNEL positivas pero también está presente en neuronas TUNEL negativas (Figura N° 22). Estos resultados sugieren que, a nivel celular como regional, BDNF/TrkB no protegerían contra el progreso de muerte neuronal por apoptosis.



**Figura N° 21:** Fotografías de los hipocampos con tinción de hematoxilina (arriba), mostrando la ausencia de alteraciones morfológicas después del SE, y la inmunohistoquímica para TrkB (abajo), observándose la pérdida de inmunoreactividad en CA1 después del SE. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura N° 22:** Fotografías de la tinción de TUNEL y TrkB en hipocampo y corteza piriforme después del SE. Se observan células apoptóticas en CA1 (arriba) y corteza piriforme (abajo). Barra: 100  $\mu$ m. A la izquierda se muestra mayor magnificación de ambas zonas. Las cabezas de flecha indican células apoptóticas que no son positivas para TrkB, mientras que las flechas indican células apoptóticas que son positivas para TrkB. Barra: 10  $\mu$ m.

#### **IV. Reconocer la morfología dendrítica en regiones cerebrales que expresan niveles diferenciales de TrkB después de SE (E4)**

Para determinar si la disminución de TrkB en ciertas regiones corticales tenía consecuencias sobre la morfología dendrítica, se analizaron células impregnadas con tinción de Golgi. Comparamos células piramidales de dos regiones en las cuales se observaron cambios opuestos en la inmunoreactividad de TrkB: la corteza retroesplénica y la corteza auditiva. La Figura N° 23 muestra microfotografías de neuronas piramidales impregnadas con tinción de Golgi representativas de ratas control y de ratas que sufrieron SE, como también los dibujos de cámara lúcida de las neuronas seleccionadas. Observamos una reducción significativa de un  $40\% \pm 8\%$  en el largo de las dendritas basales sólo en la corteza retroesplénica. Por otro lado, no se detectaron diferencias en el largo de la dendrita apical, o el número de puntos de ramificación (Figura N° 24). Los valores de los largos dendríticos y los puntos de ramificación son el promedio de al menos 12 neuronas por región de 5 experimentos independientes.

El número de ramificaciones se midió por cada  $8 \mu\text{m}$  y fue medido a lo largo de un segmento de  $80 \mu\text{m}$  de la dendrita apical primaria. En la corteza auditiva, donde TrkB no cambió en la capa V, la disminución fue significativa cerca del soma celular y a distancias mayores a  $64 \mu\text{m}$ . Nuestros estudios muestran que la reducción del largo dendrítico ocurre en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza retroesplénica, un área donde TrkB se veía disminuido. Estos cambios fueron menos marcados en la capa V de la corteza auditiva, donde no ocurrieron cambios en TrkB (Figura N° 24).

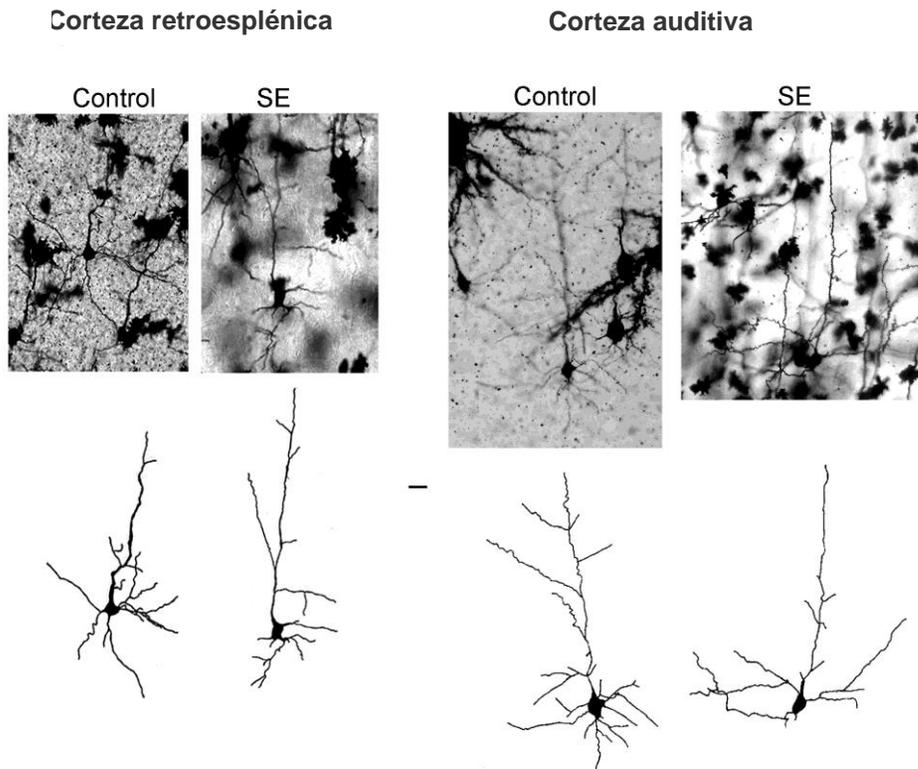


Figura N° 23: Fotografías (arriba) y dibujos con cámara lúcida (abajo) de neuronas piramidales representativas en la corteza retrosplenica y auditiva de una rata control y después de sufrir SE. Barra: 20  $\mu$ m

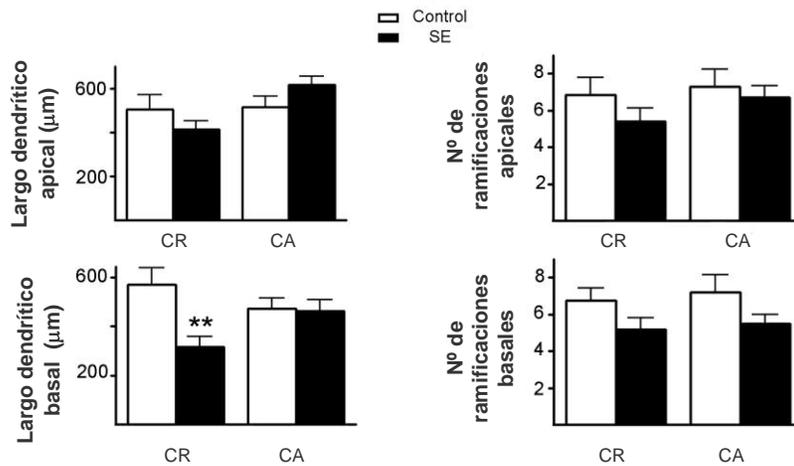


Figura N° 24: Análisis morfométrico que muestra que el largo dendrítico basal se redujo significativamente en comparación con las ratas control en la corteza retrosplenica pero no en la región auditiva.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente memoria de título muestran cómo cambia la expresión de TrkB en la corteza cerebral después de convulsiones.

Como había sido documentado en hipocampo, la expresión de TrkB es regulada por las crisis epilépticas de manera compleja. Los resultados de los experimentos, realizados en un modelo de epilepsia temporal en ratas, indican que esta compleja regulación se extiende a la corteza, donde fue observada una disminución significativa en la expresión de TrkB a partir de las 24 horas luego de la inyección de ácido kaínico.

En los “Western blots” (Figura N° 13) fueron analizadas ambas isoformas de TrkB, mientras que en el estudio inmunohistoquímico (Figuras N° 15-22) el análisis se concentró en el receptor completo, que se expresa predominantemente en neuronas, mientras que la isoforma truncada en el SNC adulto (TrkB<sub>T</sub>), es más abundante en células gliales. Ambas isoformas pueden ser identificadas en los Western blot por su peso diferencial, mientras esto no es posible en la inmunohistoquímica.

La localización inmunohistoquímica de TrkB en el telencéfalo de animales controles fue coincidente con estudios previos, en el cual fueron usados anticuerpos distintos con resultados similares (Yan *et al*, 1997). La especificidad del anticuerpo usado en este estudio fue corroborada por preincubación del anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology) con diferentes concentraciones de péptido bloqueador de la misma compañía.

Las células más intensamente teñidas fueron encontradas en la capa V de la corteza cerebral, pero también las neuronas granulares de la capa II/III, como también algunas neuronas piramidales en la capa III, fueron encontradas inmunopositivas. En algunas regiones de la neocorteza, por ejemplo en la corteza retrosplénica, la dendrita apical de la

neurona piramidal de la capa V fue intensamente teñida (Figura N° 17), mientras que en otras como la corteza auditiva, la tinción de la dendrita fue menos intensa (Figuras N° 18 y 20). Luego de las crisis, TrkB disminuyó en las dendritas y soma de neuronas piramidales. De cualquier manera, algunas células no piramidales dispersas en todas las capas celulares fueron TrkB positivas después de SE. La identificación precisa del tipo morfológico de las células no piramidales no fue posible, especialmente cuando no hubo tinción en las dendritas. Considerando los resultados anteriormente expuestos, éstos muestran que la respuesta a BDNF y NT4/5 disminuye en la corteza por disminución de su receptor TrkB, excluyendo la corteza piriforme. A su vez, los tipos celulares capaces de responder a esta señal cambian, todo lo cual puede tener consecuencias sobre la estabilidad de circuitos corticales específicos y por lo tanto, sobre el procesamiento de información, lo que deberá ser estudiado posteriormente.

Por ejemplo, pueden esperarse consecuencias funcionales importantes si las neuronas que expresan TrkB luego del SE fuesen interneuronas gabaérgicas, como sugiere su localización y morfología (Cellerino *et al*, 1996). Si BDNF/TrkB fortalece las conexiones sinápticas y mantiene la morfología neuronal, esto significaría que se potenciaría la neurotransmisión inhibitoria, lo que a su vez contrarrestaría la propagación de convulsiones. Por otro lado, la disminución de TrkB en las células piramidales de la capa V, que son neuronas glutamatérgicas (excitadoras), podría asociarse con retracción de sus proyecciones, y por lo tanto, disminución de sinapsis excitadoras. Por ejemplo, las neuronas piramidales de la capa V de la corteza retrosplenica, que mostraron un  $58\% \pm 9\%$  de disminución en la inmunoreactividad, proyectan a otras áreas corticales, al colículo superior y al subiculum (Wyss y Van Groen, 1992; Van Groen y Wyss, 2003). Como la morfología del axón está regulada por BDNF/TrkB (Hanamura *et al*, 2004; Koyama *et al*, 2004), esta disminución de TrkB en las neuronas que se proyectan, puede producir retracción de las vías eferentes, por ejemplo del hipocampo, y a consecuencias funcionales deletéreas, por ejemplo en el aprendizaje y la memoria, funciones en las cuales ambas estructuras y sus conexiones recíprocas han estado relacionadas (Van Groen *et al*, 2004).

Sumado a la disminución de TrkB en las células piramidales corticales, el contenido de TrkB cambia diferencialmente en las zonas hipocámpales. Mientras que no se observan cambios en CA3 y en el giro dentado, TrkB disminuye en la CA1 (Figura N° 19). Nuestros resultados son coincidentes con estudios anteriores que sugieren que el aumento de TrkB en el giro dentado es transitorio. Muchas evidencias han mostrado que en el giro dentado, donde TrkB es epileptogénico, TrkB se activa después de convulsiones. Una manera de medir la activación de TrkB es detectando su grado de fosforilación. El hecho de que nosotros no observemos cambios en TrkB total en el giro dentado no excluye que TrkB activado (o sea, fosforilado) pueda estar aumentado en esta región (Binder *et al*, 1999; Danzer *et al*, 2004).

BDNF/TrkB son también conocidos como moduladores de la ramificación dendrítica y morfología de las espinas dendríticas (Huang y Reichardt, 2003; Chakravarthy *et al*, 2006; von Boleen *et al*, 2006). La ramificación dendrítica, entre otras características, determinan la eficacia con la cual la información sináptica es transmitida al soma (Whitford *et al*, 2002). Las dendritas y sus espinas son estructuras dinámicas, cambiando su tamaño y forma en relación con la plasticidad neuronal (Hering y Sheng, 2001). Encontramos una reducción en las ramificaciones basales en la corteza retrosplenica, no así en la corteza auditiva (Figuras N° 23 y 24). La disminución de TrkB en las células piramidales de la capa V de la corteza retrosplenica se asoció con retracción dendrítica. En la corteza auditiva, la inmunorreactividad de la capa V no cambió, y no hubo disminución en la ramificación dendrítica.

Los resultados indican que la pérdida celular es más prominente en la CA1 y la corteza piriforme luego de un SE inducido por ácido kaínico (Figura N° 21 y 22), lo que coincide con resultados reportados con anterioridad (Weiss *et al*, 1996; Siddiqui y Joseph, 2005). Otros autores han encontrado, además, una significativa pérdida celular en CA3 (Yan *et al*, 1997). De las 6 ratas analizadas, sólo una tuvo un puntaje alto de TUNEL en la CA3, pero esto ocurrió sin disminución concomitante de TrkB en esta área. El alto grado de apoptosis en dos áreas que muestran cambios opuestos en los niveles de TrkB sugiere que ambos fenómenos son independientes, es más, la presencia de TrkB no protegería a las

neuronas contra el progreso de la apoptosis. Además cuando fueron realizados los estudios de colocalización de TUNEL y TrkB, se observaron neuronas apoptóticas positivas como también negativas para TrkB, sugiriendo una vez más que la señalización BDNF/TrkB no detendría el proceso de apoptosis a nivel celular después del SE. En su conjunto, estos experimentos indican que la presencia de TrkB no está asociada con neuroprotección, tanto a nivel regional como celular. Similarmente, estudios en ratones con delección de BDNF restringida al cerebro anterior sugieren que éste es necesario para el mantenimiento de la morfología neuronal, pero no para la supervivencia de neuronas. (Gorski *et al*, 2003).

La reorganización morfofuncional inducida por BDNF/TrkB en las zonas del hipocampo durante la epileptogénesis incluye crecimiento dendrítico aberrante y formación de nuevas sinapsis excitadoras. Esto puede constituir el sustrato para la generación de descargas neuronales que se propagan por la corteza una vez que la epilepsia de lóbulo temporal se ha desarrollado. Mostramos que los cambios en la expresión de TrkB en la corteza luego del SE es mucho más compleja de lo que se esperaba. Los resultados morfológicos muestran que la corteza se adaptaría a los nuevos niveles de actividad mediante la retracción de aquellas estructuras que reciben el contacto excitatorio, esto es, dendritas, y que estos cambios en parte pueden deberse a una regulación negativa de TrkB.

Los resultados en esta memoria de título apoyan la idea de que TrkB determina de manera importante la morfología neuronal. BDNF/TrkB aumentan de manera transitoria especialmente en las zonas CA3 y giro dentado del hipocampo. Además se muestra que en la corteza cerebral, BDNF/TrkB disminuye, especialmente en las neuronas piramidales (excitadoras). Con estos resultados experimentales se propone que al querer antagonizar el sistema de señalización BDNF/TrkB después de SE para prevenir el desarrollo de epilepsia, esta intervención debería restringirse al hipocampo. Las estrategias a desarrollar podrían incluir el bloqueo de elementos río debajo de TrkB específicos del hipocampo, o silenciamiento génico en esta zona.

La desventaja de antagonizar BDNF/TrkB de manera inespecífica en el SNC es que se potenciaría la retracción dendrítica y neuronal después de SE que ocurre en corteza cerebral, lo que se ha relacionado con la disminución de las funciones cognitivas (como aprendizaje y memoria). Es decir, si bien esta antagonización prevendría el desarrollo de la epilepsia, produciría una disfunción cognitiva mayor a la que ya se observa en individuos epilépticos. De todas maneras, la comprensión de los mecanismos implicados en la reorganización de circuitos neuronales después de SE nos ayuda a encontrar nuevas estrategias viables para el tratamiento de la epilepsia en el futuro.

## CONCLUSIONES

- La inmunorreactividad de TrkB se ve disminuida 72 horas después del SE inducido por la inyección intraperitoneal de ácido kaínico en el telencéfalo. La corteza motora primaria a nivel rostral, corteza retrosplénica anterior y la CA1 en el hipocampo muestran una disminución significativa de los niveles de TrkB, no así la corteza piriforme en donde se ve aumentada.
- La señalización vía BDNF/TrkB no se relaciona con el desarrollo de la muerte celular por apoptosis.
- La ausencia de señalización BDNF/TrkB se relaciona con una disminución significativa del largo de dendrítico basal.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. **BARAKAT, O.; FERNÁNDEZ, M.J.; CORRALES, J.A.; GONZÁLEZ, F.J.; IZQUIERDO, G.; FAJARDO, J.** 2000. Status epilepticus. *Medicina Intensiva* 24 (9): 405-12.
2. **BEREDNT, M.** 2003. Epilepsy. [En línea] *Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment*. International Veterinary Information Service.  
<[http://www.ivis.org/special\\_books/Braund/berendt/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/special_books/Braund/berendt/chapter_frm.asp?LA=1)>  
[Consulta: 23 octubre 2006]
3. **BINDER, D.K.** 2004. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol* 548: 34-56.
4. **BINDER, D.K.; CROLL, S.; GALL, C.; SCHARFMAN, H.** 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends in Neurosci* 24: 47-53.
5. **BINDER, D.K.; ROUTBORT, M.J.; McNAMARA, J.O.** 1999. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of Trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J Neurosci* 19(11): 4616-26.
6. **BUSTAMANTE, J.** 1994. *Neuroanatomía funcional*. Segunda edición. Santafé de Bogotá, Colombia. Celsus. Páginas: 27-33, 301-303, 311.
7. **BURNEO, J.G.; TELLEZ-ZENTENO, J.; WIEBE, S.** 2005. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research* 66 (1-3): 63-74.
8. **CELLERINO, A.; MAFFEI, L.; DOMENICI, L.** 1996. The distribution of brain derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in parvalbumin-containing neurons of the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 8: 1190-1197.
9. **CHAKRAVARTHY, S.; SAIPOUR, M.H.; BENCE, M.; PERRY, S.; HARTMAN, R.; COUEY, J.J.; MANSVLDER, H.B.; LEVELT, C.N.** 2006. Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4): 1071-6.
10. **CHANDLER, K.** 2006. Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Vet J* 172, 207-217.
11. **CHAO, M.C.** Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. 2003. *Nature reviews, Neuroscience* 4: 299-309.

12. **CHAPEL, R.; RESTON, J.; SNYDER, D.; TREADWELL, J.; TREGEAR, S.** Management of treatment-resistant epilepsy. Volumes 1 y 2. Chapter 1: Introduction. Evidence Report/Technology Assessment No. 77. Chapter 1: Introduction. [En línea] In: AHRQ Evidence Reports, Numbers 61 - 120. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat1a.part.1>> [Consulta: 23 octubre 2006]
  
13. **CHUAQUI, B.; DUARTE, I; GONZÁLEZ, S.; ROSENBERG, H.** 1996. Capítulo 2: Patología celular. Daño celular irreversible, Apoptosis. [En línea] <[http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol\\_033.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_033.html)> In: Manual de Patología Celular. [Consulta: 1 julio 2004]
  
14. **DANZER, S.C.; HE, X.; McNAMARA, J.O.** 2004. Ontogeny of seizure-induced increases in BDNF immunoreactivity and TrkB receptor activation in rat hippocampus. *Hippocampus* 14(3): 345-55.
  
15. **FRYER, R.H.; KAPLAN, D.R.; FEINSTEIN, S.C.; RADEKE, M.J.; GRAYSON, D.R.; KROMER, L.F.** 1996. Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 374: 21-40.
  
16. **GARDINER, M.** 2005. Genetics of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* 46 Suppl 9: 15-20.
  
17. **GORSKI, J.A.; ZEILER, S.R.; TAMOWSKI, S.; JONES, K.R.** 2003. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23(17): 6856-65.
  
18. **GOUTAN, E.; MARTÍ, E.; FERRER, I.** 1998. BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses. *Molecular Brain Research* 59: 154-64.
  
19. **GRAVES, T.D.** 2006. Ion channels and epilepsy. *Qjm* 99(4): 201-17.
  
20. **GUERRINI, R.** 2006. Epilepsy in children. *Lancet* 367: 499-524.
  
21. **HANAMURA, K.; HARADA, A.; KATOH-SEMBA, R.; MURAKAMI, F.; YUMAMOTO, M.** 2004. BDNF and NT-3 promote thalamocortical axon growth with distinct substrate and temporal dependency. *Eur J Neurosci* 19(6): 1485-93.
  
22. **HARGREAVES, E.L.** 1995. The Hippocampus. [En línea] Page O' Neuroplasticity. New York University. <<http://homepages.nyu/~eh597/>> [Consulta: 20 noviembre 2006]

23. **HERING, H.; SHENG M.** 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2(12): 880-8.
24. **HERMAN, S.T.** 2002. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* 59(9 suppl 5): S21-6.
25. **HU, P.; KALB, R.G.** 2003. BDNF heightens the sensitivity of motor neurons to excitotoxic insults through activation of TrkB. *J Neurochem* 84(6): 1421-30.
26. **HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F.** 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
27. **HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F.** 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-42.
28. **JALLON, P.; LATOUR, P.** 2005. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* 46 Suppl 9: 10-4.
29. **KALB, R.** 2005. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci* 28(1): 5-11.
30. **KANDEL, E.R.; SCHWUARTZ, J.H.; JESSELL, T.M.** 1991. Principles of neural science. Elsevier Science publishing Co., Inc. Tercera edición.
31. **KELLY, K.J.; SANDOVAL, M.R.; DUNN, K.W.; MOLITORIS, B.A.; DAGHER, P.C.** 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 1309-18.
32. **LAN, J.; HENSHALL, D. C.; SIMON, R.P.; CHEN, J.** 2000. Formation of the base modification 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine and ADN fragmentation following seizures induced by systemic kainic acid in the rat. *J Neurochem* 74(1): 302-9.
33. **LEIBROCK, J.; LOTTSPREICH, F.; HOHN, A.; HOFER, M.; HENGERER, B.; MASIAKOWSKI, P.; THOENEN, H.; BARDE, Y.A.** 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341 (6238): 149-52.
34. **LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L. S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.** 2000. Capítulo 21: Nerve cells. 21.1. Overview of Neuron Structure and Function. [En línea] In: *Molecular Cell Biology*. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb>> [ Consulta: 23 octubre 2006]

35. **MARDER E.; GOAILLARD J.M.** 2006. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 7: 563-74.
36. **MCNAMARA, J.O.** 1999. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399(6738 Suppl): A15-22.
37. **MCNAMARA, J.O.; HUANG, Y.Z.; LEONARD, A.S.** 2006. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE* 2006(356): re12.
38. **MELDRUM, B.S.** 2001. Why and when are seizures bad for the brain? *Trends Pharmacol Sci* 22: 445-46.
39. **MILLER, F.D.; KAPLAN, D.R.** 2001. Neurotrophin signaling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58: 1045-53.
40. **PAXINOS, G.; WATSON, C.** 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. San Diego.
41. **PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M.** 2001. Capítulo V: Complex brain functions. The association cortices: An overview of cortical structure. 1. Introductory chapter. *The Organization of the Nervous System: nerve cells.* [En línea] In: Neuroscience. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=.0uNI-thF8Ac-y1FGPWkXGjIR53>> [Consulta: 23 octubre 2006]
42. **OHIRA, K.; KUMANOGOH, H.; SAHARA, Y.; HOMMA, K.J.; HIRAI, H.; NAKAMURA, S.; HAYASHI, M.** 2005. A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* 25(6): 1343-53.
43. **PASTOR, J.; UZCÁTEGUI, Y.G.; GAL-IGLESIAS, B.; ORTEGA, G.J.; SOLA, R.G.; MENÉNDEZ DE LA PRIDA, L.** 2006. Bases fisiopatológicas de la epilepsia del lóbulo temporal: estudios en humanos y animales. *Rev Neurol* 42(11): 663-73.
44. **PITKÄNEN, A.; SUTULA, T.P.** 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 1(3): 173-81.
45. **REIBEL, S.; DEPAULIS, A.; LARMET, I.** 2001. BDNF and epilepsy - the bad could turn out to be good. *Trends Neurosci* 24(6): 318-19.
46. **ROSE, C.R.; BLUM, R.; KAFITZ, K.W.; KOVALCHUK, Y.; KONNERTH, A.** 2004. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays* 26(11), 1185-94.

47. **RUDGE, J.S.; MATHER, P.E.; PASNIKOWSKI, N.C.; CORCORAN, T.; ACHESON, A.; ANDERSON, K.; LINDSAY, R.M.; WIEGAND, S.J.** 1998. Endogenous BDNF is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Experimental Neurology*: 149-410.
48. **SCHARFMAN, H.E.** 2005. Brain-derived Neurotrophic Factor and Epilepsy - A Missing Link? *Epilepsy Curr* 5(3): 83-8.
49. **SHETTY, A.K. ; ZAMAN, V. ; SHETTY, G.A.** 2003. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy : a lack of correlation between brain-derived- neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J Neurochem* 87: 147-59.
50. **SHNEKER, B.F.; FOUNTAIN, N.B.** 2003. Epilepsy. *Disease-a-Month* 49: 426-78.
51. **SIDDIQUI, A.H.; JOSEPH, S. A.** 2005. CA3 axonal sprouting in kainate-induced chronic epilepsy. *Brain Res* 1066(1-2): 129-46.
52. **SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; FISHER, S.K.; ALBERS, R.W.; UHLER, M.D. Part One.** Cellular Neurochemistry and Neural Membranes. 1: Neurocellular Anatomy: Characteristics of the Neuron. **Part Five.** Metabolism. 37: Epileptic Seizures and Epilepsy: Epilepsy models. [En línea] In: Basic Neurochemistry. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=bnchm>> [Consulta: 23 octubre 2006]
53. **SILHOL, M.; BONNICHON, V.; RAGE, F.; TAPIA-ARANCIBIA, L.** 2005. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132(3): 613-24.
54. **STEPHENSON, J.B.P.; ZUBERI, S.** 2005. Capítulo 7: Nonepileptic Seizures and Similar Phenomena in Children and Adolescents: Diagnostic Categories. [En línea] In: Imitators of epilepsy. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imitepil>> [Consulta: 23 octubre 2006]
55. **TEJEIRO, J.; GÓMEZ-SERENO, B.** 2003. Status epilepticus. *Rev Neurol* 36(7): 661-779.
56. **TOOYAMA, I.; BELLIER, J.P.; PARK, M.; MINNASCH, P.; UEMURA, S.; HISANO, T.; IWAMI, M.; AIMI, Y.; YASUHARA, O.; KIMURA, H.** 2002. Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy. *Epilepsia* 43 Suppl 9: 39-43.

57. **VALVERDE, F.** 2002. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol* 34(8): 758-80.
58. **VAN GROEN, T.; WYSS, J. M.** 2003. Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J Comp Neurol* 463(3): 249-63
59. **VAN GROEN, T.; KADISH, I.; WYSS, J.M.** 2004. Retrosplenial cortex lesions of area Rgb (but not of area Rga) impair spatial learning and memory in the rat. *Behav Brain Res* 154(2), 483-91
60. **VOLCY-GÓMEZ, M.** 2004. Mesial temporal lobe epilepsy: its physiopathology, clinical characteristics, treatment and prognosis. *Rev Neurol* 38 (7): 663-67.
61. **VON BOHLEN UND HALBACH, O.; KRAUSE, S.; MEDINA, D.; SCIARRETTA, C.; MINICHELLO, L.; UNSICKER, K.** 2006. Regional- and age-dependent reduction in trkB receptor expression in the hippocampus is associated with altered spine morphologies. *Biol Psychiatry* 59(9): 793-800.
62. **WEISS, S.; CATALTEPE, O.; COLE, A.J.** 1996. Anatomical studies of DNA fragmentation in rat brain after systemic kainate administration. *Neuroscience* 74(2): 541-51.
63. **WHITFORD, K.L.; DIJKHUIZEN, P.; POLLEUX, F.; GHOSH, A.** 2002. Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25: 127-49.
64. **WONG, M.** 2005. Modulation of dendritic spines in epilepsy: Cellular mechanisms and functional implications. *Epilepsy & Behavior* 7: 569-77.
65. **WYSS, J. M.; VAN GROEN, T.** 1992. Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus* 2(1): 1-11
66. **YAN, Q.; JOHNSON, E.M.Jr.** 1989. Immunohistochemical localization and biochemical characterization of nerve growth factor receptor in adult rat brain. *J Comp Neurol* 290(4): 585-98.
67. **YAN, Q.; RADEKE, M.J.; MATHESON, C.R.; TALVENHEIMO, J.; WELCHER, A.A.; FEINSTEIN, S.C.** 1997. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 378(1): 135-57
68. **ZABARA, J.** 1992. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia* 33: 1005-12.
69. **ZHANG, X.; GELOWITZ, D.L.; LAI, C.T.; BOULTON, A.A.; YU, P.H.** 1997. Gradation of kainic acid-induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. *Eur J Neurosci* 9: 760-69.

70. **ZHANG, X.; CUI, S.S.; WALLACE, A. E.; HANNESSON, D. K.; SCHMUED, L.C.; SAUCIER, D.M.; HONER, W.G.; CORCORAN, M.E.** 2002. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 22: 6052-61.
71. **ZHU, D.; WU, X.; STRAUSS, K.I.; LIPSKY, R.H.; QURESHI, Z.; TERHAKOPIAN, A.; NOVELLI, A.; BANAUDHA, K.; MARINI, A.M.** 2005. N-Methyl-D-Aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Neurosci Res* 80: 104-13.