



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
CATALASA EN CORTEZA CEREBRAL, HIPOCAMPO Y
AMIGDALA BILATERALES DE GATOS CON EPILEPSIA
EXPERIMENTAL POR AMPA.

ANDREA LORENA ESCOBAR GALIANO

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

PROFESOR GUÍA: CLAUDIO INFANTE

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
CATALASA EN CORTEZA CEREBRAL, HIPOCAMPO Y
AMIGDALA BILATERALES DE GATOS CON EPILEPSIA
EXPERIMENTAL POR AMPA.

ANDREA LORENA ESCOBAR GALIANO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : CLAUDIO INFANTE F.
PROFESOR CONSEJERO: HECTOR ADARMES A.
PROFESOR CONSEJERO: JUAN LEIVA R.

SANTIAGO, CHILE

2009

Para mi madre, Graciela Galiano, por su ejemplo de esfuerzo y humildad y a mi querido José por su compañía y apoyo, dedico este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Importante reconocimiento espero dejar a mi profesor guía, Sr. Claudio Infante quien asumió la tarea de supervisar esta memoria. Sus oportunos consejos que dejaban una acertada opinión permitieron pulir y culminar este trabajo.

Para el Dr. Elías Motles, profesor que guió en sus inicios este trabajo y que en forma permanente demostró interés en la culminación de este.

Junto con las vivencias durante la época de estudio, desarrollo de este trabajo y etapa laboral le agradezco a Paulina Collao Reyes, su apoyo incondicional, disposición, perseverancia y capacidad analítica. La impronta que dejó Paulina en este trabajo la debo mencionar ya que generosamente colaboro en la grafica de esta memoria.

Al personal de la Facultad de Medicina Oriente de la Universidad de Chile que participo en forma directa o indirecta en este trabajo les agradezco su colaboración al, Sr. Jaime Rosell, Don Ismael, Sra. Lily y Don Hernán.

Para Gina, que no esta con nosotros; sin embargo, recibí de ella permanentes alicientes para terminar este trabajo.

Y en recuerdo de todos mis queridos “niños” que me acompañaron antes, durante y después de este largo proceso formativo.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

La epilepsia en animales y humanos se relaciona con la lesión oxidativa producida por el fenómeno de excitotoxicidad. Esta situación puede generar alteraciones en los mecanismos antioxidantes. En este trabajo se determinó la participación de una de las enzimas antioxidantes, específicamente la Catalasa que neutraliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizando la reacción hacia la formación de agua y oxígeno.

En esta tesis se evaluó la actividad de esta enzima en Hipocampo, Amígdala y Corteza cerebral de gatos; las cuales son estructuras altamente interconectadas y de bajo umbral epileptogénico. Para tal efecto se utilizó como modelo animal de epilepsia experimental la microinyección en el hipocampo un agente epileptogénico como el AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico).

Se utilizaron 3 grupos de animales, en dos grupos de animales experimentales y en un grupo control se implantó estereotáxicamente electrodos en Corteza cerebral, Amígdala e Hipocampo. Además se implantó una cánula en Hipocampo derecho la cual sirvió de guía para la posterior microinyección del agente proepiléptico. Los grupos experimentales fueron inyectados con AMPA y el control con solución salina. El grupo control y uno de los grupos experimentales fueron sacrificados a las 24 horas; el segundo grupo experimental fue sacrificado a los 5 días pos inyección. En los tres grupos de animales se realizaron registros encefalográficos y conductuales antes y después de la microinyección. Al momento del sacrificio se extrajeron muestras bilaterales de las estructuras implantadas para la posterior determinación espectrofotométrica de la actividad de la enzima Catalasa. El estudio mostró que la administración de AMPA en la dosis umbral para desencadenar post descargas epilépticas fue capaz de generar focos epilépticos, los cuales tendieron a extinguirse a medida que transcurre el tiempo.

En los animales controles los niveles de actividad enzimática de la Catalasa fueron diferentes para las diferentes para estructuras estudiadas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad enzimática de Amígdala y Corteza y entre Amígdala e Hipocampo.

Al comparar la actividad de la enzima del grupo control con respecto a los grupos experimentales se observó una tendencia al aumento en el tiempo de la actividad enzimática; sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Así, este modelo epiléptico fue lo suficientemente atenuado en intensidad y duración como para poder detectar cambios estadísticamente significativos en los niveles de actividad de la Catalasa.

SUMMARY

The epilepsy in animal and humans is related with the oxidative injury produced by the phenomenon of excitotoxicity. This situation can generate alterations in the mechanisms antioxidants, specifically the Catalase that neutralizes the hydrogen peroxide (H_2O_2) catalyzing the reaction to the formation of water and oxygen.

In this thesis the activity of this enzyme in the Hippocampus, Amygdala and Cerebral cortex of cats is evaluated; which are structures that are highly interconnected and low epileptogenic threshold. For that effect, the microinjection of an epileptogenic agent such as the AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid) in the Hippocampus was used as the model animal of experimental epilepsy.

Three groups of animals were used. In two of the groups of experimental animals and in one control group stereotaxically electrodes in the cerebral cortex, amygdala and Hippocampus were implanted. Besides, a cannula was implanted in the right Hippocampus, which helped as a guide for the later microinjection of the pro epileptic agent. The experimental groups were injected with AMPA and the control with saline solution. The control group and one of the experimental groups were sacrificed 24 hours after; the second experimental group was sacrificed five days after the post injection. In the three groups of animals, encephalographic and conductual records were performed after and before the microinjection.

At the moment of sacrifice, bilateral proofs of the implanted structures were extracted in order to get the later spectrophotometric determination of the activity of the Catalase enzyme.

The research showed that the administration of the AMPA, in a minimum dose to unlock the post epileptic discharges, was capable to generate epileptic focuses, which tended to extinguish as time went by.

In the control animals, the levels of the enzymatic activity of the Catalase were different for the multiple structures studied. Statistical significant differences between the enzymatic amygdala and cerebral cortex and between amygdala and Hippocampus were observed.

When the activity of the enzyme of the control group was compared with the one of the experimental groups, a tendency in the increase of time of the enzymatic activity was observed. However, these differences did not reach statistic significativity. So, this epileptic model was sufficiently diminished in terms of intensity and length for me to detect statistically significant changes in the levels of the activity of the Catalase.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un desorden electrofisiológico crónico caracterizado por ataques repetitivos con intervalos de tiempo variables entre los períodos de manifestación. Una proporción de ellos aparece como una complicación asociada a una patología adquirida por el sistema nervioso. El resto de los casos constituye un grupo en el que la causa es de origen genético. Cualquiera sea el origen causal se reconoce como origen del cuadro convulsivo un estado de hiperexcitabilidad neuronal. La epilepsia en animales y en humanos puede provocar muerte de neuronas específicas por excitotoxicidad. Concomitantemente al fenómeno de muerte neuronal intervienen mecanismos de plasticidad neuronal, que reducen la inhibición gabaérgica junto a la proliferación de neuronas excitadoras que generan hiperexcitabilidad permanente (Armijo *et al.*, 2002).

La lesión oxidativa posterior a la crisis energética producida por el fenómeno de excitotoxicidad epiléptica, considera el desbalance de los mecanismos antioxidantes endógenos con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen a los radicales libres. Las defensas antioxidantes incluyen enzimas y moléculas. Las enzimas antioxidantes (Superoxido dismutasa, Catalasa y Glutatión peroxidasa) constituyen la primera línea de defensa contra los radicales libres y esta acción se lleva a cabo neutralizando a estas especies químicas reactivas mediante la conversión en otras, de efecto menos dañino.

El daño oxidativo se produce debido al desbalance entre la generación de ROS y la actividad de las defensas antioxidantes celulares. Cuando la generación de ROS excede la capacidad de defensa intracelular y los mecanismos de reparación o el funcionamiento de

defensas antioxidantes está deteriorado, puede generarse daño celular y trastornos funcionales.

Los radicales libres surgidos a causa de la excitotoxicidad epiléptica, como por el envejecimiento, asociado al debilitamiento de los sistemas de tamponamiento están comprometidos en diversas patologías, que incluyen la arteriosclerosis, diabetes mellitus, traumas, enfermedades inflamatorias, cáncer y epilepsia.

El sistema nervioso central es extremadamente sensible al daño causado por los radicales libres, dada su relativa baja capacidad antioxidante y alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. El efecto más importante de los radicales libres en el tejido cerebral es la lipoperoxidación lo que provoca desorganización de la membrana celular alterando severamente la estructura y función celular.

En atención a lo anterior nos interesa evaluar en las diferentes regiones cerebrales la actividad de la enzima antioxidante Catalasa, en un modelo experimental de epilepsia mediante la microinyección en Hipocampo derecho de un agente epileptogénico como el AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico), un agonista glutamatérgico.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

La epileptogénesis es el proceso por el que una estructura nerviosa normal se vuelve hiperexcitable hasta el punto de producir espontáneamente descargas epilépticas. En el sentido amplio se puede considerar el término de epileptogénesis como el origen y desarrollo de las epilepsias tanto genéticas como adquiridas. Los orígenes de la epilepsia son múltiples desde la aparición de fenómenos de hiperexcitabilidad localizado (epilepsia focal) hasta el compromiso de todas las estructuras cerebrales en el cual, un foco recluta neuronas normales en un proceso de sincronización y propagación de la descarga que provoca la crisis generalizada (Armijo *et al.*, 2002). En cualquiera de estos casos, todos muestran una alteración electroencefalográfica común.

Por lo tanto, la hiperexcitabilidad neuronal y la sincronización son los procesos que a nivel celular explican los hallazgos electroencefalográficos. La recolección de la actividad integrada de muchas neuronas, revelan como signo patognomónico de epilepsia la espiga o la espiga –onda. La espiga corresponde a una onda de evolución rápida, mono o bifásica. Puede registrarse con macroelectrodos colocados sobre el cuero cabelludo o con electrodos implantados en estructuras cerebrales profundas, ya sea durante un acto operatorio en humanos o animales de experimentación. Con frecuencia esta onda rápida es seguida por una onda lenta. Las ondas rápidas pueden presentarse aisladamente, con cierta regularidad o no, especialmente en períodos de intervalo entre las crisis o bien pueden presentarse agrupadas, durante un período variable de tiempo, produciendo lo que se llama postdescarga, que por lo general coinciden con la aparición de las manifestaciones clínicas, las cuales no necesariamente son manifestaciones convulsivas (Motles, 1993).

La espiga aparece en el electroencefalograma (EEG) cuando un grupo de neuronas se despolarizan de forma sincronizada y disparan una ráfaga de potenciales de acción de alta frecuencia. Esta despolarización de gran magnitud se conoce como potencial despolarizador paroxístico (PDP), y está seguida de una hiperpolarización que se refleja en el EEG como la onda lenta que sigue a la espiga, finalmente la neurona vuelve a su potencial de reposo (Contreras, 2000).

En la mayoría de las neuronas estudiadas, el PDP corresponde a un enorme potencial sináptico excitador, mediado por los neurotransmisores glutamato, aspartato y acetilcolina. (Motles, 1993). De ellos el glutamato desempeña un papel importante en la iniciación, propagación y mantenimiento de las crisis epilépticas (Medina *et al.*, 2007). El inicio de la descarga se atribuye a la activación de canales de sodio asociados a receptores glutamatérgicos no NMDA (N-metil-D-aspartato) como AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico) o kainato (KA) que permite una rápida entrada de sodio que despolariza la membrana. La despolarización mantenida y la descarga de frecuencia rápida, elementos que están en la base del fenómeno epiléptico, se atribuyen a la estimulación de receptores glutamatérgicos NMDA que provocan una lenta entrada de calcio, así como a corrientes de calcio voltaje dependientes (Armijo *et al.*, 2002).

Las principales regiones del cerebro estudiadas como focos epilépticos han sido fundamentalmente la neocorteza, el hipocampo y la amígdala. A nivel experimental, estas estructuras poseen la capacidad de transformarse en foco epileptogénico tras una estimulación repetitiva (generalmente de tipo eléctrica, farmacológica o por estímulos sensoriales), esta condición se conoce como *kindling* (De Cabo *et al.*, 2006).

La complejidad del proceso epiléptico ha llevado a diseñar modelos animales experimentales que utilizan diversos procedimientos tal como la administración sistémica, tópica cortical o intracerebral de penicilina G potásica el cual es un potente agente convulsivante usado especialmente como modelo de epilepsia focal en gatos (Tanaka *et al.*, 1989). Otro procedimiento es la microinyección intraperitoneal o intracerebral de ácido kaínico, sustancia epileptogénica neuroexcitante (Tanaka *et al.*, 1985). También hay modelos animales que apuntan a zonas encefálicas con mayor vulnerabilidad tal como Hipocampo unilateral de gatos (Tanaka *et al.*, 1982) y ratas (Feldblum *et al.*, 1987) con el objeto de estudiar el desarrollo de los ataques límbicos. La inyección intraamigdalóidea de ácido quisqualato en gatos; el cual es un potente neuroexcitante y análogo heterocíclico del ácido kainico, es capaz de producir estatus epilépticos de estructuras límbicas (Kajijima *et al.*, 1983). El *kindling* es otro modelo que simula las epilepsias parciales complejas donde la estimulación eléctrica repetitiva de una región cerebral, induce un estado de hiperexcitabilidad permanente (Medina *et al.*, 2007), similares a los estados convulsivos y las convulsiones febriles prolongadas.

Si la intensidad de la crisis, se prolonga en el tiempo, entonces sobreviene el *estatus epilepticus*, produciéndose hipoxia tisular, ya que; el flujo sanguíneo no es capaz de equilibrar las demandas de oxígeno (Motles, 1993). De esta forma, así como en otras lesiones neurológicas necróticas, tal como procesos hipóxico-isquémicos e hipoglicemia resultan en una lesión excitotóxica, que generará la liberación excesiva del principal neurotransmisor excitatorio, es decir, glutamato. Esta situación, normalmente conduce al aumento en la entrada de calcio y una excesiva movilización de calcio citosólico en la neurona post-sináptica con alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial. La

desregularización de los niveles de calcio intracelular puede llevar a la generación de eventos degenerativos, incluyendo daño al citoesqueleto y degradación proteica.

Esta crisis energética y alteraciones en diversos sistemas bioquímicos propician la generación de ROS, cuya importancia biológica estriba en que pueden alterar la estructura de las membranas celulares, producir daño en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular. De los anteriores, el evento mas importante parece ser la lipoperoxidación, el cual se traduce en daño a la membrana celular, cambiando la presión osmótica celular provocando cambios en la carga neta de la célula y depletando componentes purificadores endógenos, llevando a edema y eventualmente a la muerte celular (Devi *et al.*, 2006).

En general, el sistema nervioso central es particularmente susceptible al daño por las ROS debido a sus altos requerimientos energéticos, por ejemplo en humanos, el cerebro metaboliza el 20% del oxígeno total corporal (Frey *et al.*, 2006) y utiliza alrededor del 20% de la glucosa circulante, considerando que posee el 2% del peso corporal (Makar *et al.*, 1994). También posee una elevada concentración tisular de hierro, alta composición de ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos y niveles relativamente bajos de algunos sistemas antioxidantes (Capote-Rodríguez *et al.*, 1998).

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con un electrón desapareado en la órbita externa, los que se comportan como verdaderos misiles biológicos, ya que no tienen receptores específicos, sino que atacan o inestabilizan todo lo que encuentran enfrente, mediante acciones directas o indirectas, reversibles o irreversibles sobre los tejidos (Rodrigo y Rivera, 2003). Entre los principales radicales libres y ROS se encuentran el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), al radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), al radical peroxinitrito (NOOO^\bullet), al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO). La vida media de estas moléculas

varía de unos cuantos nanosegundos y horas en las especies más estables (Medina *et al.*, 2007).

Los efectos biológicos de los radicales libres son controlados *in vivo* por un amplio rango de sistemas antioxidantes tal como la vitamina E, vitamina C, vitamina A, y glutatión. Las enzimas antioxidantes tal como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px), y la catalasa (CAT) proveen mecanismos detoxificantes que protegen al SNC contra las ROS (Correa *et al.*, 2004).

El anión superóxido es generado por múltiples vías enzimáticas y no enzimáticas y es el punto de partida para la cascada de estrés oxidativo. Los sistemas detoxificantes enzimáticos como la SOD, pueden convertir el superóxido a peróxido de hidrógeno. Esta molécula es menos dañina ya que no es un radical libre, pero en presencia de iones metálicos como el Fe^{3+} , Cu^+ ó Mn^+ puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a través de la reacción de Fenton (Rodrigo y Rivera, 2003). Otras de las enzimas antioxidante son la CAT o la GSH-Px, las cuales transforman el peróxido de hidrógeno en agua antes que se formen los radicales hidroxilos (Wang *et al.*, 2003).

Röhrdanz *et al.*, (2001) describió que lesiones necróticas, que aparecen en la neurona bajo el estrés oxidativo, tal como la exposición a H_2O_2 en cultivos de células astrogiales de rata pueden causar un aumento compensatorio en la expresión de CAT o GSH-Px.

Es conocida la capacidad de la CAT por convertir el peróxido de hidrogeno a agua y oxígeno (actividad catalítica), y en presencia de bajas concentraciones de peróxido de hidrogeno oxidar alcoholes de bajo peso molecular (actividad peroxidativa) (Vetrano *et al.*,

2005). Esta enzima es mucho más importante en degradar el H_2O_2 en neuronas, mientras que el sistema glutatión parece tener un rol mucho más significativo en las células gliales.

La CAT es una enzima tetramérica de 60 kDa formada por cuatro subunidades idénticas (Rodrigo y Rivera, 2003). Dado su pequeño tamaño, se la considera formando parte de un microperoxisoma. Se ubica a nivel celular en la fracción peroxisomal de la neurona y de la glia (Schad *et al.*, 2003).

Diversos estudios han enfatizado que esta enzima puede ser considerada como un bioindicador de la lesión oxidativa en diferentes áreas del cerebro (Atli *et al.*, 2006). La actividad de la GSH-Px y la CAT parecen estar involucradas en el mecanismo responsable de la eliminación de las ROS durante el establecimiento del estatus epiléptico en el hipocampo (Freitas *et al.*, 2005).

OBJETIVO GENERAL

Determinar en el cerebro de gatos domésticos con epilepsia experimental la actividad de la enzima antioxidante Catalasa en Corteza cerebral, Hipocampo y Amígdala bilaterales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar actividad epiléptica experimental focal inducida a través de la administración cerebral del agonista glutamatérgico AMPA en Hipocampo de gatos.
- Analizar los cambios conductuales y electroencefalográficos asociados con la inducción epiléptica luego de la administración de AMPA, en dos grupos experimentales.
- Determinar y comparar la actividad enzimática de la Catalasa en Corteza cerebral, Hipocampo y Amígdala bilaterales en dos etapas diferentes del desarrollo de la epilepsia, a las 24 horas y 5 días post inducción de la epilepsia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales:

Se utilizaron para este estudio 12 gatos domésticos adultos mestizos de ambos sexos, mantenidos en condiciones estándares de laboratorio. Ciclo luz-oscuridad, libre acceso al agua y a la comida.

El proyecto y protocolo de investigación fue sometido a evaluación por el Comité de Bioética del Campus Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que autorizó los procedimientos experimentales, mantención y cuidados de los animales.

Grupos experimentales:

Los animales fueron separados en 3 grupos de 4 animales cada uno: grupo control, grupo con epilepsia experimental de 24 horas y grupo con epilepsia experimental de 5 días después de la inducción de epilepsia por AMPA. (Tabla 1)

Tabla 1. Grupos de animales y protocolos experimentales.

Grupos	Droga inyectada (i.c)*	Volumen / Dosis	Nº de días sacrificio
1.- Control	Suero NaCl 0,9%	5 µl	1 día
2.- 24 horas	AMPA**	80 µg / 5 µl	1 día
3.- 5 días	AMPA**	80 µg / 5 µl	5 días

*= intracerebral.

**= ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico, agonista glutamatérgico, agente inductor epiléptico.

Cirugía:

Bajo anestesia general con Nembutal (30mg/kg, i.p.), el animal fue ubicado en un aparato estereotáxico con el propósito de implantar una cánula en Hipocampo derecho que sirvió de guía para la inyección de AMPA; esta cánula tenía adosado un electrodo que permitió registrar la actividad eléctrica en la proximidad del sitio de la inyección. También se implantaron electrodos en Hipocampo izquierdo, Amígdalas y Corteza Cerebral. Estas estructuras fueron implantadas siguiendo las coordenadas de un atlas estereotáxico (Reinoso-Suárez, 1961). Todos los electrodos y la cánula de inyección luego de ser fijados al hueso con acrílico dental, fueron conectados a una base desde donde un cable permitió el ingreso de las señales a un equipo electroencefalográfico. Finalizada la cirugía se administró Penicilina Sódica intramuscular (200.000 UI), en forma tópica en la incisión y en la conjuntiva ocular. Además se hidrató al animal con Suero Glucosalino subcutáneo (60 ml). Al día siguiente se administró Penicilina Benzatina intramuscular (100.000 UI) y se espero un período de recuperación de 7 días para comenzar con la siguiente fase de experimentación.

Microinyección de AMPA:

A los animales de los grupos experimentales de 24 horas y 5 días se les inyectó 80 µg de AMPA en un volumen de 5 µl de solución salina en dosis única. La inyección se hizo a través de la cánula ubicada en Hipocampo derecho. A los animales del grupo control se les inyectó 5 µl solución salina (NaCl 0,9%) en dosis única. El tiempo de administración del agonista glutamatérgico AMPA y de la solución salina fue de 1 minuto.

Registro de la actividad electroencefalográfica:

Mediante un equipo electroencefalográfico (GRASS® modelo VI) se realizó un primer registro control antes de la inyección de AMPA o de solución salina, este registro sirvió de referencia. Inmediatamente después de la administración de AMPA o solución salina, se inicio el monitoreo de la actividad electroencefalográfica y simultáneamente se registraron las manifestaciones clínicas inducidas por AMPA o solución salina; tal como vocalizaciones, clonos, nistagmos, anisocoria, posición de los miembros con respecto al eje del cuerpo, tamaño pupilar, etc. A los animales del grupo experimental de 24 horas se les tomaron registros durante las primeras 4 horas después de la inyección de AMPA y se les realizó un registro electroencefalográfico de una hora previo a la eutanasia. El grupo de animales de 5 días se registró inmediatamente después de la inyección monitoreándose por 1 hora. Los días siguientes se monitoreó la actividad electroencefalográfica por una hora cada día hasta el 5° día, momento en el cual se realizó un registro diagnóstico de 1 hora previo a la eutanasia.

Extracción de muestras:

Previa anestesia profunda con Nembutal (60mg/kg i.p); los animales fueron ubicados en un aparato estereotáxico en donde se retiro la base de acrílico y los electrodos, para luego extraer muestras de tejido en el siguiente orden: Corteza cerebral izquierda y derecha, Hipocampo y Amígdala de ambos lados. Para localizar la ubicación de ambas Amígdalas, de ubicación intracerebral profunda, se realizó marcas estereotáxicas de la estructura, mediante una aguja entintada con tinción de Nissl. Finalmente los animales fueron sacrificados rápidamente mediante el bloqueo del tronco encefálico. Los tejidos fueron lavados en solución salina a 4°C, rotulados y envasados en un contenedor con nitrógeno

líquido para su traslado y almacenados en un congelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Preparación de las muestras:

Cada estructura fue pesada en forma individual y ubicada en tubos rotulados a los que se les adicionó una solución “buffer” de homogeneización, pH: 7,4 el cual esta compuesto de:

Tris-HCl 50 mM y EDTA 0,1 mM.

Se adicionó $2\mu\text{l}$ (diluidos en agua destilada) de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas por cada ml de “buffer” de homogeneización: Leupeptin 2 mM, Pepstatin 1 mM, y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM.

El “buffer” de homogeneización con inhibidores de proteasas se utiliza en una proporción de 1:4 veces el peso del tejido (g).

Enseguida se homogeneizó con un Tissue Tearor™ 5 veces por 10 segundos con intervalos de 10 segundos, este procedimiento se realizó en un recipiente con hielo manteniendo una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Luego se centrifugó a $1500\times g$ durante 15 min. (4°C), la fracción sobrenadante fue alicuotada con micropipeta a microtubos previamente rotulados y almacenada a -80°C para la posterior determinación enzimática.

Determinación de la actividad de CAT:

La actividad enzimática de la CAT en el sobrenadante se determinó por el método descrito por Aebi (1984), en el cual se mide la extinción espectrofotométrica del H_2O_2 en buffer fosfato 50mM pH 7,0 a 240 nm durante un minuto, expresada en: U CAT / mg proteína. Las diferencias en las absorbancias por unidad de tiempo es una medición de la actividad de la CAT. Una unidad de CAT fue definida como la cantidad de enzima que descompone 1 mol de H_2O_2 (Aebi, 1984).

La actividad de la CAT se determinó en un medio que contiene los siguientes reactivos:

1. Buffer fosfato 50mM pH 7,0 en 1000ml de agua destilada =2,670g de KH_2PO_4 y 5,409g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2. Tritón-etanol 10% en buffer fosfato 50mM pH 7,0 = 1ml etanol absoluto (Ethanol absoluto, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 46.07 g/Mol), 1ml Tritón (Tritón X-100) y 8 ml de buffer fosfato 50 mM pH 7,0.
3. Peróxido de hidrógeno 30 mM (Perdrogen ® 30% H_2O_2 , 34,01 g/Mol) = Se diluyo 85µl de peróxido de hidrógeno 30% en 25ml de buffer fosfato 50mM pH 7,0.

El procedimiento continuo con la dilución de 900µl de homogeneizado más 100µl de Tritón-etanol el que se agitó en Vortex en un micro tubo y se dejó reposar 30 minutos sobre hielo.

Se escogió la dilución con buffer fosfato 50mM pH 7,0 en proporción 1:20; es decir, se mezcló 500µl de muestra ya diluida e incubada con Tritón -etanol más 10ml de buffer.

El ensayo enzimático de la muestra continua con la mezcla de 500 µl muestra (diluida) más 250 µl de buffer, el cual se transfiere a cubeta de cuarzo con capacidad de 750 µl y se hace

un barrido en un espectrofotómetro equipado con una unidad de registro automático por 1 minuto.

La reacción se inicio con la adición de 500 μ l de muestra (dilución) más 250 μ l de H₂O₂ 30 mM, se agitó en Vortex y se transfirió inmediatamente a la cubeta de cuarzo para registrar las lecturas a 240 nm con intervalos de 5 ó 10 segundos, durante 1 minuto

Determinación de proteínas:

La determinación de proteínas totales se realizo por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Este procedimiento se basa en mediciones espectrofotométricas a 750 nm, usando de referencia una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).

Análisis Estadístico:

Los valores obtenidos fueron expresados como promedio o mediana y el rango de variación como error estándar. Para el análisis estadístico de utilizó las pruebas no paramétricas de Mann Withney y Kruskal Wallis, según corresponda. Se consideró un $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

1. Caracterización electroencefalográfica.

1.1 Grupo experimental control:

La inyección intracerebral de la solución salina (NaCl 0,9 %) en dosis única minutos antes del registro, en un volumen equivalente al utilizado en la inyección intracerebral de AMPA, no provocó modificaciones en el registro electroencefalográfico (Figura 1).

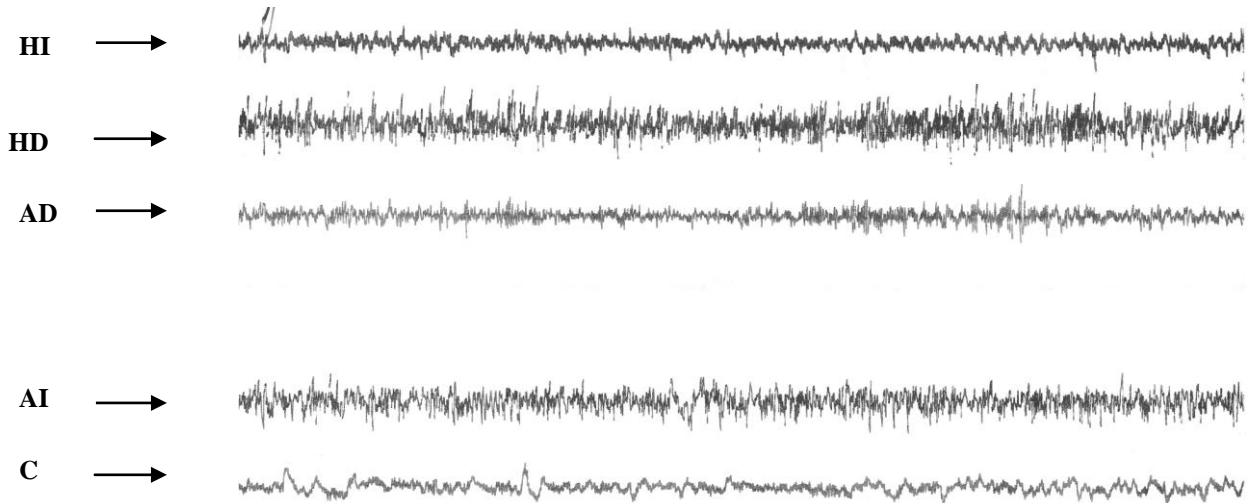


Figura 1: Efecto de la administración de solución salina (NaCl 0,9 %) en dosis única minutos antes del registro en Hipocampo derecho en el grupo control. **HI** = Hipocampo izquierdo; **HD** = Hipocampo derecho; **AD** = Amígdala derecha; **AI** = Amígdala izquierda; **C** = Corteza

1.2 Grupos experimentales post inyección de AMPA intracerebral:

Como se muestra en la Figura 2 la inyección intracerebral de AMPA en Hipocampo derecho, en dosis única minutos antes del registro; generó espigas, poli espigas o post descargas en el EEG, que comprometieron principalmente a los hipocampos y amígdalas, en la mayoría de los animales inyectados con AMPA.

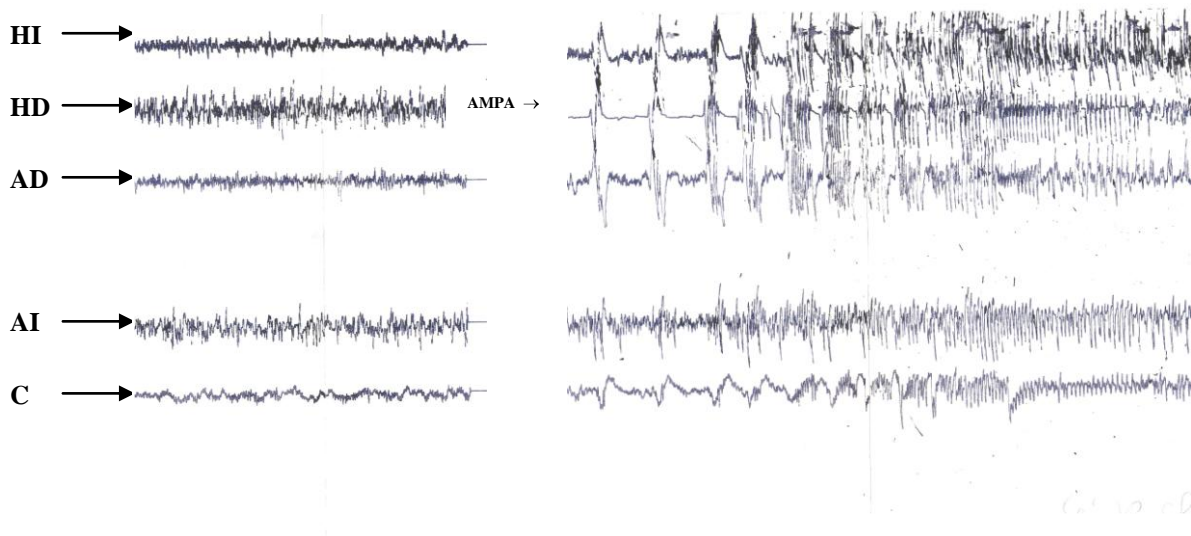


Figura 2: Efecto de la administración del agonista glutamatergico AMPA en Hipocampo derecho, en dosis única minutos antes del registro. **HI** = Hipocampo izquierdo; **HD** = Hipocampo derecho; **AD** = Amígdala derecha; **AI** = Amígdala izquierda; **C** = Corteza.

La Tabla N° 2 muestra el análisis de los EEGs de los grupos experimentales para los canales de registro de Corteza, Hipocampo derecho, Hipocampo izquierdo, Amígdala derecha y Amígdala izquierda, así los parámetros se definieron como:

1. Latencia de la primera post descarga, que corresponde al tiempo que transcurre desde la microinyección de AMPA hasta la aparición de la primera post descarga medida en minutos, los resultados muestran valores promedio de latencia similares. Se puede destacar que el hipocampo izquierdo fue la primera estructura en presentar una post descarga a los 28 ± 60 minutos mientras que la corteza evidenció este parámetro más tardíamente (35 ± 62). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas entre las 5 estructuras para el tiempo de latencia desde la primera post descarga.

2. Duración de la 1ª post descarga medida en segundos, que corresponde al tiempo transcurrido entre el inicio de la 1ª post descarga y el aplanamiento del registro. La corteza presentó una mayor duración en comparación con el resto de las estructuras analizadas, sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 2: Promedio y error estándar (ES) de Corteza cerebral e Hipocampo y Amígdala de ambos hemisferios, para los tres parámetros analizados.

Promedio y error estándar (ES)					
Parámetros	Corteza	Hipocampo	Hipocampo	Amígdala	Amígdala
		derecho	izquierdo	derecha	izquierda
	Promedio ± ES	Promedio ± ES	Promedio ± ES	Promedio ± ES	Promedio ± ES
Latencia 1° post descarga (min.)	35±23	31±21	28±21	32±24	31±21
Duración 1° post descarga (seg.)	63±20	59±18	54±19	58±21	56±19

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

Después de transcurridas 24 horas desde la microinyección de AMPA, los grupos experimentales, de 24 horas y el grupo de 5 días, mostraron una atenuación de la actividad epiléptica puesto que las postdescargas iniciales fueron reemplazadas por espigas, las cuales se presentaron solamente en Hipocampo y Amígdala (Figura 3 y 4).

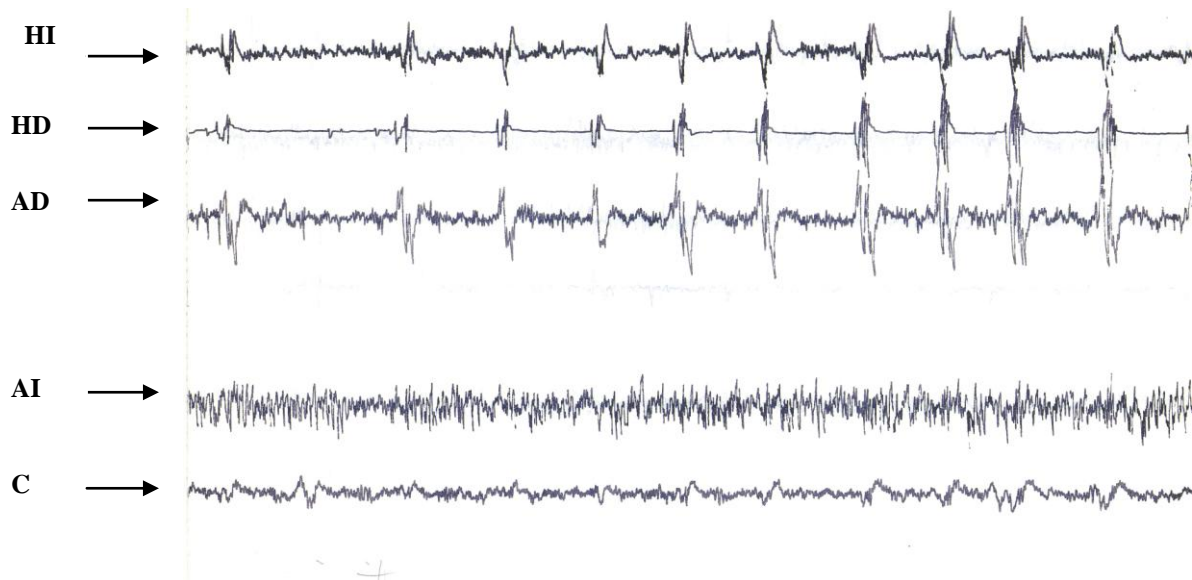


Figura 3: Registro electroencefalográfico del grupo experimental a las 24 horas de la administración del agonista glutamatérgico AMPA en Hipocampo derecho, en dosis única; en el cual se muestra la presencia de algunas espigas de carácter epiléptico. **HI** = Hipocampo izquierdo; **HD** = Hipocampo derecho; **AD** = Amígdala derecha; **AI** = Amígdala izquierda; **C** = Corteza.

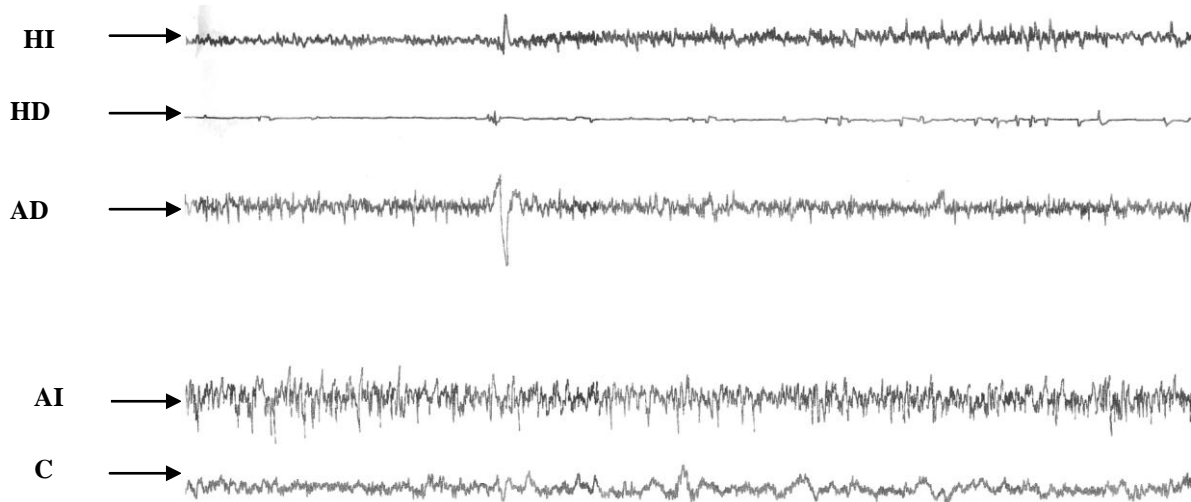


Figura 4: Registro electroencefalográfico a los 5 días post administración del agonista glutamatergico AMPA en Hipocampo derecho, en dosis; en el grupo experimental en el cual se muestra la presencia de algunas espigas aisladas. **HI** = Hipocampo izquierdo; **HD** = Hipocampo derecho; **AD** = Amígdala derecha; **AI** = Amígdala izquierda; **C** = Corteza.

2. Caracterización conductual.

En el grupo control al cual se le administró solución fisiológica en el Hipocampo derecho en un volumen equivalente a los grupos experimentales, no se evidenció alteraciones patológicas en el registro EEG, ni cambios conductuales observables. La inyección de 5 μ L del agonista glutamatérgico AMPA, generó postdescargas y espigas que se iniciaron principalmente en hipocampo y amígdala, estas alteraciones electroencefalográficas se acompañaron de cambios conductuales tales como: giros de cabeza hacia la izquierda, lamidos, rasquidos, vocalización, agresividad, estado defensivo, aumento de la frecuencia respiratoria, tremor, salivación, pilo erección y en algunas ocasiones gruñidos y maullidos. Durante la generación de postdescargas que se generalizaron al resto de las estructuras incluyendo corteza cerebral, se registraron signos tales como: nistagmo, anisocoria y clonos leves en tronco y cabeza acompañados de gruñidos y clonías de parpado izquierdo. A las 24 horas se evaluó en conjunto con el EEG las manifestaciones conductuales de los animales los cuales se observan tranquilos, atentos al medio e ingiriendo alimento. Lo mismo se observó en el grupo de 5 días post inyección en los cuales se observaron espigas en el EEG, no manifestando alteraciones en el comportamiento.

3. Determinación de la actividad enzimática de la CAT.

3.1 Grupo control:

Los niveles basales de la actividad de la CAT en las diferentes áreas estudiadas muestran una marcada diferencia entre ellas, se observaron diferencias significativas de la actividad basal de la Amígdala derecha versus Hipocampo derecho, Corteza derecha e izquierda (Figura 5).

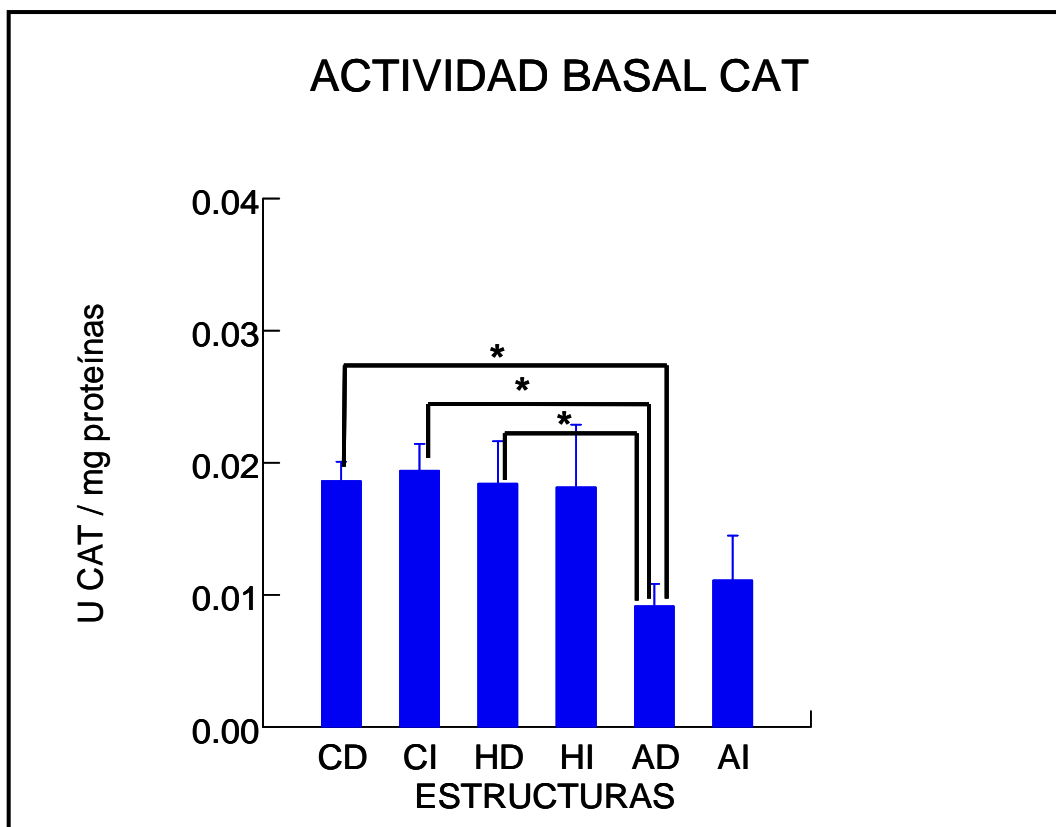


Figura 5: Comparación de la actividad basal de CAT en U CAT/ mg proteína, en las siguientes estructuras: **CD** = Corteza derecha y **CI** = Corteza izquierda; **HD** = Hipocampo derecho; **HI** = Hipocampo izquierdo; **AD** = Amígdala derecha; **AI** = Amígdala izquierda (* $p < 0,05$).

3.2 Grupos experimentales mediante inyección de AMPA intracerebral:

La determinación espectrofotométrica de la actividad de la enzima CAT, mediante el método descrito por Aebi, se realizó en muestras obtenidas a partir de Corteza cerebral, Hipocampo y Amígdala de ambos hemisferios. Las comparaciones se realizaron entre los grupos experimentales con epilepsia con respecto al grupo control.

Los valores de la actividad espectrofotométrica de la Catalasa en las diferentes estructuras se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Promedio y error estándar de actividad de CAT U/mg proteína en Corteza cerebral, Hipocampo y Amígdala de ambos hemisferios.

Actividad de CAT en U/mg proteína						
	Corteza	Corteza	Hipocampo	Hipocampo	Amígdala	Amígdala
Grupos	Derecha	Izquierda	Derecho	Izquierdo	Derecha	Izquierda
	Promedio±ES	Promedio±ES	Promedio±ES	Promedio±ES	Promedio±ES	Promedio±ES
Control	0,019±0,001	0,019±0,002	0,018±0,003	0,018±0,004	0,009±0,001	0,011±0,003
24 horas	0,018±0,001	0,018±0,001	0,022±0,005	0,019±0,002	0,008±0,001	0,008±0,002
5 días	0,021±0,002	0,021±0,001	0,025±0,002	0,021±0,001	0,010±0,001	0,010±0,000

En la Corteza derecha los niveles del grupo control fueron de $0,019 \pm 0,001$ valor que no mostró variación a las 24 horas post inyección y solo se observa una tendencia al aumento a los 5 días después de desencadenada la actividad epiléptica; pero no alcanzaron significación estadística.

En la Corteza izquierda el valor para el grupo control fue similar al de la Corteza derecha (Figura 6 a y b).

En Hipocampo derecho el valor para el grupo control fue de $0,0018 \pm 0,003$ con una tendencia al aumento a las 24 horas ($0,022 \pm 0,005$) y a los 5 días de iniciada la actividad epiléptica ($0,025 \pm 0,002$); no mostrando diferencias significativas.

En Hipocampo izquierdo el valor para el grupo control fue de $0,0018 \pm 0,004$ valor que no mostró variación a las 24 horas post inyección y solo se observó una tendencia al aumento a los 5 días de iniciada la actividad epiléptica ($0,021 \pm 0,001$); estos valores no poseen diferencias estadísticamente significativas (Figura 7 a y b).

La actividad de la enzima en Amígdala derecha para el grupo control fue de $0,009 \pm 0,001$; luego a las 24 horas disminuyó levemente a $0,008 \pm 0,001$ para aumentar levemente a los 5 días a $0,010 \pm 0,001$; estas variaciones no fueron significativas.

La actividad en Amígdala izquierda en el grupo control correspondió a $0,011 \pm 0,003$; luego a las 24 horas disminuyó a $0,008 \pm 0,002$ para aumentar a los 5 días a $0,010 \pm 0,000$; estas variaciones no fueron significativas (Figura 8 a y b).

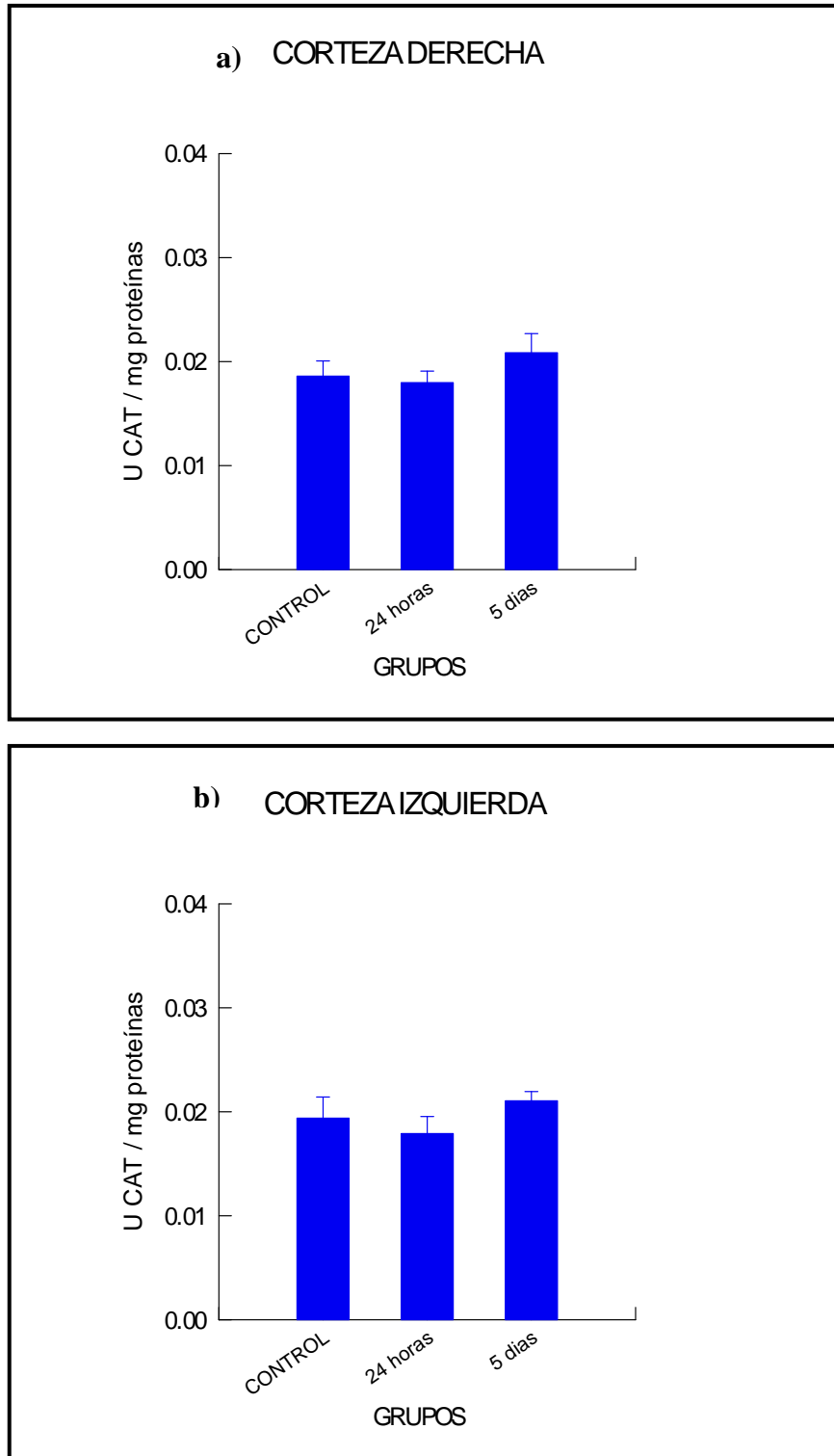


Figura 6: Comparación de la actividad de CAT en U CAT/ mg proteína, entre el grupo control y los grupos con 24 horas 5 días post inyección en las siguientes estructuras: a) Corteza derecha, b) Corteza izquierda. No se observó diferencias significativas.

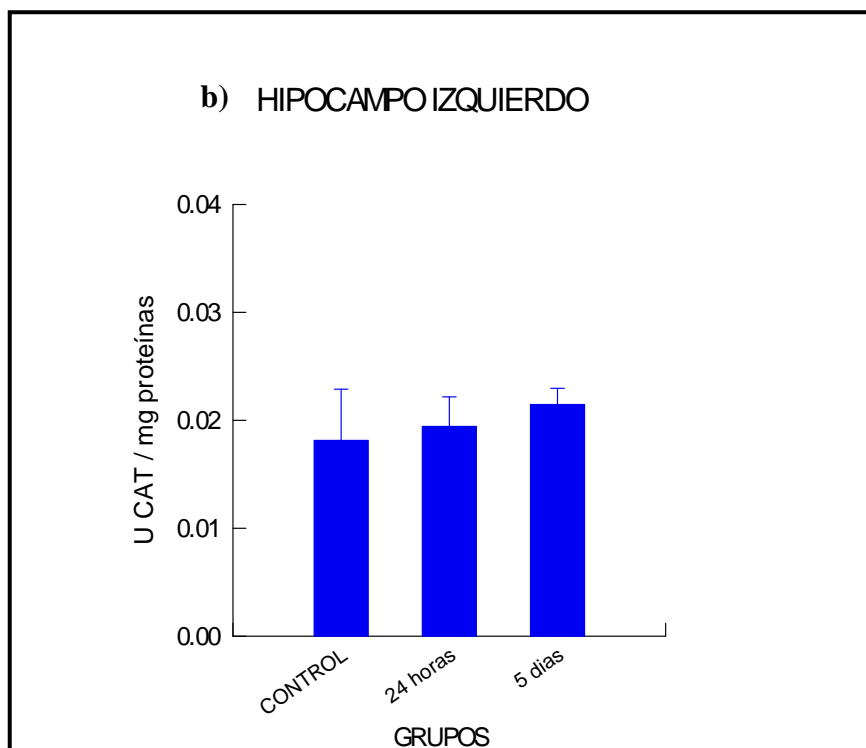
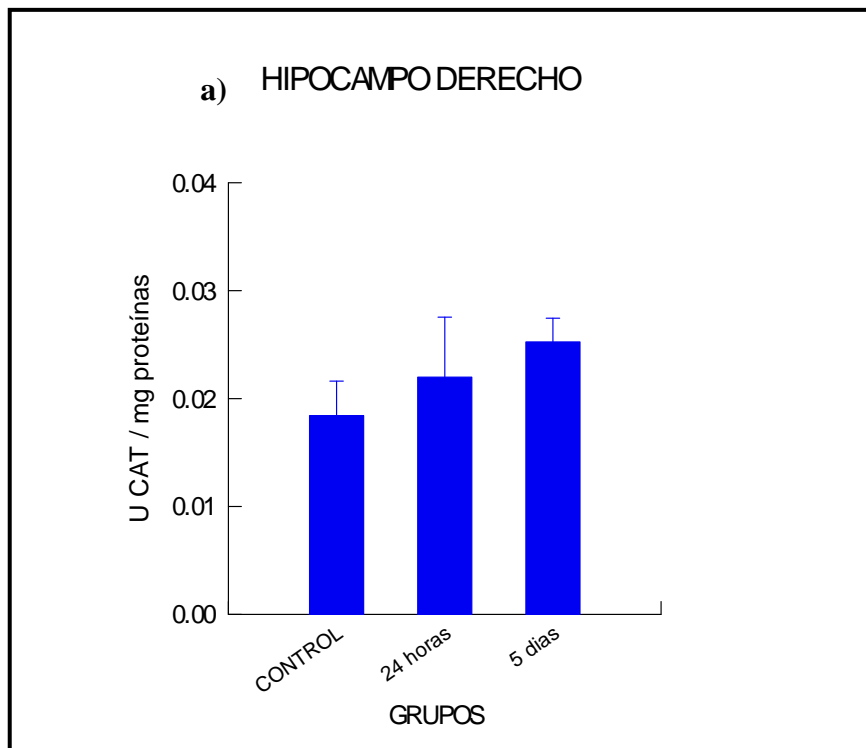


Figura 7: Comparación de la actividad de CAT en U CAT/ mg proteína, entre el grupo control y los grupos con 24 horas 5 días post inyección en las siguientes estructuras: a) Hipocampo derecho, b) Hipocampo izquierdo. No se observó diferencias significativas, solo una tendencia al aumento.

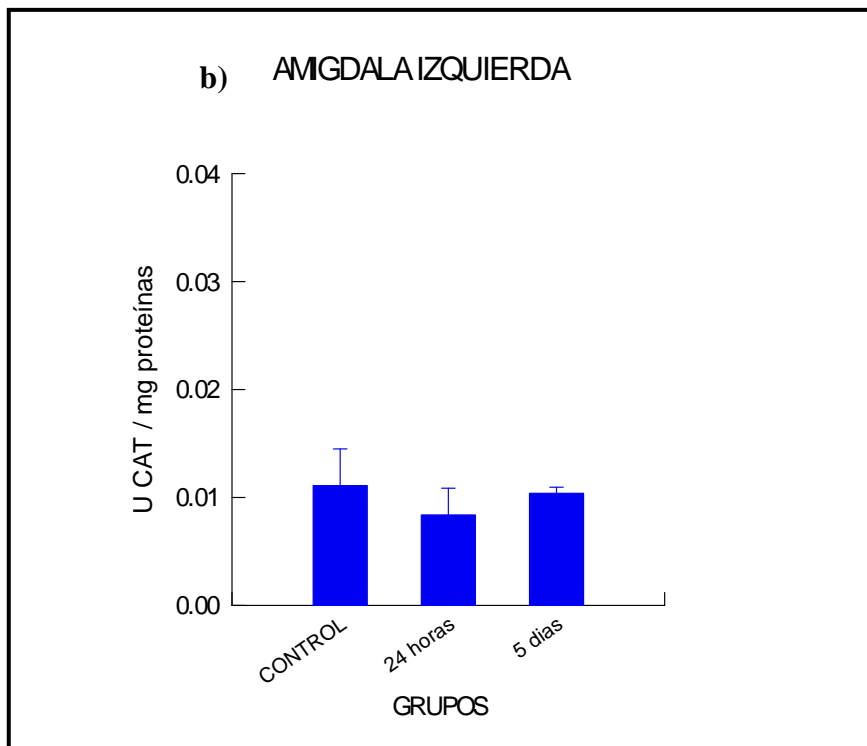
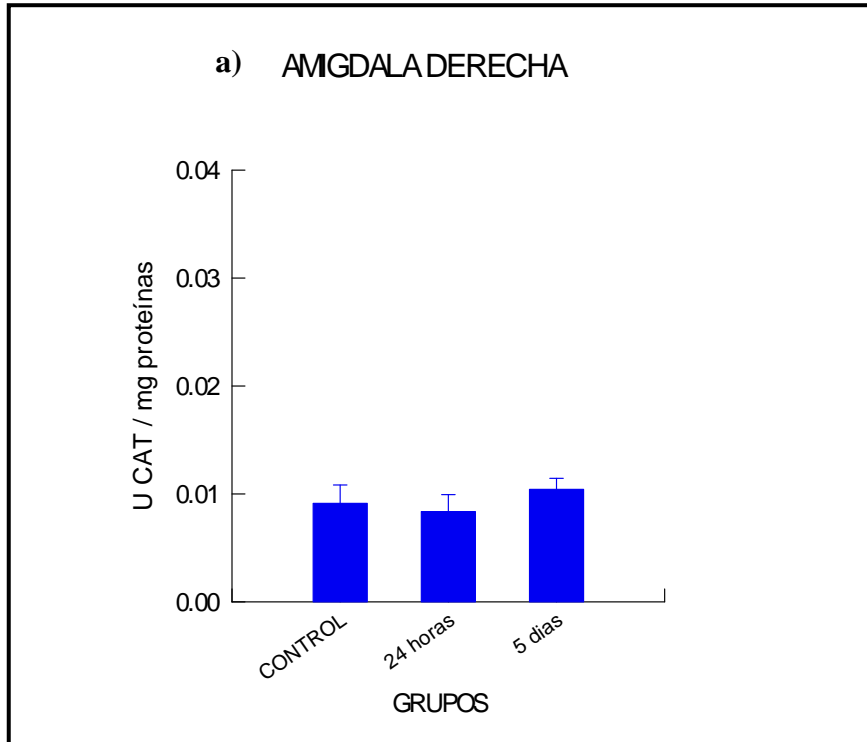


Figura 8: Comparación de la actividad de CAT en U CAT/ mg proteína, entre el grupo control y los grupos con 24 horas y 5 días post inyección en las siguientes estructuras: a) Amígdala derecha, b) Amígdala izquierda. No mostró diferencias significativas.

DISCUSIÓN

La epilepsia es una de las enfermedades crónicas neurológicas más comunes, caracterizada por ataques recurrentes los cuales pueden llevar a la generación de ROS en el cerebro. Se estima que su incidencia va entre 30 y 120 por 100.000 habitantes, dependiendo de si es un país desarrollado o no. La prevalencia de las epilepsias alrededor del mundo es aproximadamente de 5-8 casos por 1.000 habitantes, concentrándose mayoritariamente en países en vías de desarrollo. En Chile es de 17-21/1.000 habitantes (Mesa *et al.*, 2007).

La inyección de 80 μ g de AMPA en un volumen de 5 μ l de solución salina a través de una cánula de inyección ubicada en Hipocampo derecho, provocó focos epilépticos en la zona de inyección y en áreas interconectadas corticales y subcorticales. La zona de iniciación de la 1° descarga epiléptica correspondió a hipocampo seguido de amígdala, siendo la corteza cerebral la última estructura en iniciar una postdescarga epiléptica. Estos resultados concuerdan con otros estudios en donde la administración en bajas dosis de un agonista glutamatérgico como el ácido kaínico al igual que AMPA, desencadenó las 1° postdescargas en orden similar (Infante *et al.*, 2002). Por otra parte, estudios previos en donde se utilizó AMPA como inductor de epilepsia experimental, mostró valores similares entre las 5 estructuras, en donde la corteza cerebral fue la última estructura en iniciar una postdescarga (Díaz, 2005).

El estudio mostró que, la administración de AMPA en la dosis umbral empleada fue capaz de generar focos epilépticos que tienden a extinguirse, a medida que transcurre el tiempo.

Es posible considerar que, el efecto epileptogénico generado haya sido el resultado del efecto traumático de la cánula implantada crónicamente, sin embargo, los animales controles a los cuales también se les implanto una cánula, no presentaron indicadores de

actividad epiléptica. Cortes histológicos realizados en un trabajo anterior (Motles *et al.*, 2002) orientados en detectar eventuales lesiones en el sitio de ubicación de la cánula para inyección y microelectrodos de registros; demostraron que la lesión por AMPA es moderada, comparada con el intenso daño producido por la inyección intrahipocampal de otro agonista glutamatérgico, como el ácido kaínico, en bajas dosis.

Estudios adicionales indican que los receptores AMPA son más relevantes en la inducción de la actividad epiléptica que en la mantención de ella (Barna *et al.*, 2000). Por eso, la mayor actividad epiléptica, medido por el número de postdescargas, se presentó en las primeras 24 horas, luego de la inyección de AMPA, las que luego comenzaron a disminuir y luego a desaparecer, siendo reemplazadas por algunas espigas aisladas las que persistieron en forma esporádica.

La evolución clínica de los animales fue claramente coherente con la evolución electroencefalográfica, puesto que, cuando aparecieron las descargas, en la mayoría de los animales se observó rotación contralateral de cabeza, vocalizaciones y salivación. En otro grupo de animales con el mismo modelo experimental (Liberona, 2007), se observó reacciones viscerales similares a lo observado en el presente trabajo. En un modelo de estatus epiléptico en ratas inducido por ácido kaínico en amígdala, se observó manifestaciones conductuales que iban desde convulsiones motoras a respuestas de temor (Tuunanen *et al.*, 1996). En nuestro estudio, cuando las descargas involucraron la corteza cerebral se observaron diversos síntomas motores, tales como, clonos leves de tronco y cabeza, nistagmo, anisocoria en algunos casos, maullidos por algunos segundos. Sin embargo, la característica de convulsiones motoras que progresan a estatus epiléptico no se observaron en nuestro estudio. Si comparamos, las alteraciones conductuales, como las observadas en otros trabajos en los cuales se utilizó ácido kaínico como agente

epileptogénico (Tanaka *et al.*, 1982) se observó en forma progresiva el establecimiento de estatus epilépticos focales, estatus límbicos, ataques límbicos y secundariamente convulsiones generalizadas, las cuales desencadenaron la muerte del animal. En esta tesis, se logró el objetivo principal de generar una actividad epiléptica moderada y circunscrita a unas pocas estructuras, de modo de poder evaluar si en esas condiciones experimentales, era posible detectar diferencias en los niveles de una de las enzimas antioxidantes como la Catalasa.

Es interesante destacar que en la condición control se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la Catalasa entre las amígdalas y cortezas cerebrales y entre las amígdalas e hipocampos. Estas diferencias desaparecieron después de establecido el proceso epiléptico. Estos resultados apuntan a un aumento relativo en el tiempo en la actividad de la Catalasa, en aquellas estructuras con más bajos niveles de actividad enzimática, tal como la Amígdala. Del mismo modo, la actividad de la enzima en ambos hipocampos mostró tendencia al aumento en la determinación de las 24 horas y la de los 5 días.

Si se comparan los estudios previos realizados con el mismo modelo animal en el cual se determinó la actividad de otra enzima del estrés oxidativo como la Oxido nítrico sintasa total (NOS) en Hipocampo, Amígdala y Corteza cerebral (Liberona, 2007), se observó que la actividad enzimática total de la NOS en las estructuras analizadas que presentaron diferencias estadísticas significativas, fueron todas por disminución de la actividad de la enzima. De esta forma la aplicación de AMPA generó cambios regionales y temporales en la expresión de la NOS, sin embargo el presente estudio no mostró cambios en la actividad

de la CAT, lo cual se podría explicar debido a que los niveles de actividad de la CAT aumentan cuando se trata de un proceso epiléptico más intenso.

Los estudios de distribución de la Catalasa en el SNC de rata por procedimientos inmunocitoquímicos, demuestran que, las células de la región CA3 del hipocampo e interneuronas GABAérgicas de la formación hipocámpal son ricas en Catalasa (Moreno *et al.*, 1995). Puesto que el Hipocampo es una estructura muy sensible a procesos isquémicos, hipóxicos y epilépticos, es posible sostener que el umbral de actividad de la Catalasa sea bajo. La localización de mRNA de la Catalasa en cerebros de ratas adultas; por medio de la aplicación de un método mejorado inmunohistoquímico detecto cantidades sustanciales en células piramidales hipocámpales (Schad *et al.*, 2003).

Aquellos modelos experimentales que conducen a generar indicadores de estrés oxidativo en condición epiléptica máxima, han detectado aumentos regionales significativos de hasta 5 veces de la CAT, con la administración de ácido kainico en corteza cerebral (Akçay *et al.*, 2005). La administración de pilocarpina, un potente convulsivante que genera convulsiones y estatus epilépticos, registra aumentos de 28% en corteza cerebral (Tejada *et al.*, 2006) y aumentos en la actividad de la CAT hipocámpal de hasta un 88% con la misma droga (Freitas *et al.*, 2005), ó asociada a Vitamina C en ratas adultas (Xavier *et al.*, 2007). La caracterización de los niveles enzimáticos en el tiempo, tras la administración de ácido kaínico detecto aumentos significativos de la CAT, a los 5 días post aplicación en el sistema límbico (Bruce *et al.*, 1995), no obstante lo anterior, se debe considerar que el ácido kaínico es 15 veces más poderoso que AMPA en la generación de focos epilépticos (Motles *et al.*, 2002). Así, la determinación a nivel regional y temporal de la CAT en el SNC, por medio de AMPA, explica que, las condiciones experimentales en nuestro modelo indujeron

actividad epiléptica moderada y controlada, lo que explicaría la débil expresión detectada espectrofotométricamente de esta enzima.

Si comparamos los dos sistemas enzimáticos que degradan el H_2O_2 , la GSH-Px muestra predominio de acción en el cerebro sobre la CAT y tiene mayor afinidad para el peróxido de hidrógeno que la CAT, pero es más rápidamente saturable (Wang *et al.*, 2003). Campese *et al.*, (2007) caracterizó la expresión regional de la CAT y otros sistemas antioxidantes en cerebro de ratas normales, encontrando que es menos abundante en corteza cerebral y cerebelo y más abundante en el puente, hipotálamo y médula ósea. Si se diferencia por tipo celular su importancia varía, así, la Catalasa es mucho más importante para depurar el H_2O_2 en neuronas, mientras que el sistema glutatión parece tener un rol más significativo en las células gliales (Schad *et al.*, 2003).

La cualidad de alta afinidad *v/s* baja capacidad de la GSH-Px repercute en sus altos requerimientos para reducir al glutatión como cofactor. Las lesiones necróticas provocan una disminución en los niveles de glutatión, y esto limita la capacidad de la GSH-Px para proveer protección antioxidante prolongada. En contraste, la CAT no solo no requiere de un cofactor, sino que aparece como una de las enzimas más eficientes, ya que, no puede ser saturada a ninguna concentración de peróxido de hidrógeno, catalizando su conversión en H_2O y O_2 . Así, la CAT constituye una defensa de baja afinidad *v/s* alta capacidad (Wang *et al.*, 2003).

En resumen, el ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección en situaciones de bajos niveles de estrés oxidativo, pero la CAT es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo (Rodrigo y Rivera, 2003).

De acuerdo con estos antecedentes, nuestro modelo fue lo suficientemente atenuado ya que solo se detectaron tendencias de modificación de la actividad de la Catalasa en los grupos experimentales.

No obstante lo anterior la información predominante indica que, la CAT parece jugar un rol secundario en la detoxificación de radicales libres comparado con otros órganos.

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos nos permiten señalar que:

- Los receptores AMPA son probablemente más dominantes en la iniciación que en la mantención de la actividad epiléptica.
- En síntesis los resultados obtenidos revelan que la administración intracerebral de 80 µg de AMPA en los dos grupos experimentales, genero actividad epiléptica con tendencia a la atenuación de los síntomas conductuales y electroencefalográficos.
- La aplicación unilateral de AMPA intrahipocampal, no generó cambios estadísticamente significativos en la actividad enzimática de la Catalasa, en las dos etapas del desarrollo de la epilepsia.
- Este modelo fue lo suficientemente atenuado y solo permitió detectar tendencias de cambios en los niveles de actividad de la Catalasa.

BIBLIOGRAFÍA

- **AEBI, H.** 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- **AKCAY, Y. D.; YALCIN. A.; SOZMEN. E. Y. 2005.** The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. *Cell Mol Biol Lett.* 10(2):321-9
- **ARMIJO, J. A.; VALDIZÁN, E.M.; CUEVAS, de las I.; CUADRADO, A.** 2002. Avances en la fisiopatología de la epileptogénesis: aspectos moleculares. *Rev. Neurol.* 34(5):409-429.
- **ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TUKEL, S., CANLI, M. 2006.** Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 143(2):218-24.
- **BARNA, B., SZASZ, A., VILAGI, I., SCENTE, M. 2000.** Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat. *Brain Res Bull.* 51(3):241-8
- **BRUCE, A.J.; BAUDRY, M. 1995.** Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic Biol Med.* 18(6):993-1002.
- **CAMPESE, V. M.; SINDHU, R. K.; YE, S.; BAI, Y.; VAZIRI, N. D.; JABBARI, B. 2007.** Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res.* 1134(1):27-32.

- **CAPOTE-RODRÍGUEZ, K.; CÉSPEDES, E.; ARENCIBIA, R.; GONZALEZ-HOYUELA, M. 1998.** Indicadores de estrés oxidativo en el cerebro de rata durante el envejecimiento. Efecto del factor de crecimiento nervioso. *Rev. Neurol.* 27(157): 494-500.
- **CONTRERAS, D. 2000.** Modelos experimentales en epilepsia. *Rev Neurol.* 30 (4): 370-376
- **CORREA, M.; ROIG-NAVARRO, A. F.; ARAGON, C. M. G. 2004.** Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci.* 74(16): 2009-2021.
- **DE CABO, C., VILLANUEVA-HERNANDZ, P., PRIETO-MARTÍN, A. 2006.** Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol.* 42: 159-168
- **DEVI, A.; JOLITHA, AB.; ISHII, N. 2006.** Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med.Sci.Monit.* 12(4):124-129.
- **DÍAZ, M. 2005.** Comparación de la cantidad de isoenzimas de oxido nítrico sintasa en hipocampo, amígdala y corteza cerebral de gatos sometidos a una condición experimental de epilepsia. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile.

- **FELDBLUM, S.; ACKERMANN, RF. 1987.** Increased susceptibility to hippocampal and amygdala kindling following intrahippocampal kainic acid. *Exp Neurol.* 97(2):255-69
- **FREITAS, R.; VASCONCELOS, S.; SOUZA, F.; VIANA, G.; FONTELES, M. 2005.** Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS J.* 272(6):1307-12.
- **FREY, B.; VALVASSORI, S.; RÉUS, G.; MARTINS, M.; PETRONILHO, F.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. 2006.** Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *Psychiatry Neurosci.* 31(5): 326–332.
- **INFANTE, C.; CARTIER, L.; MOTLES, E. 2002.** Comparative study of the epileptogenic effect of kainic acid injected into the cerebral cortex, hippocampus and amygdala in adult cats chronically implanted. *Arch Ital Biol.* 140(1):31-40
- **KAIJIMA, M.; TANAKA, T., OHGAMI, S.; YONEMASU, Y. 1983.** Rapid hippocampal kindling following intraamygdaloid injection of quisqualic acid in cats. *No To Shinkei.* 35(6):569-74
- **LIBERONA, M. 2007.** Efecto de la generación de un foco epiléptico por AMPA sobre la actividad óxido nítrico sintasa en hipocampo, amígdala y corteza cerebral de gatos. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile.
- **LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951.** Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- **MAKAR, T. K.; NEDERGAARD, M.; PREUSS, A.; GELBARD, A. S.; PERUMAL, A. S.; COOPER, A. J. L. 1994.** Vitamin E, Ascorbate, Glutathione, Glutathione Disulfide, and Enzymes of Glutathione Metabolism in Cultures of Chick Astrocytes and Neurons: Evidence that Astrocytes Play an Important Role in Antioxidative Processes in the Brain. *J. Neurochem.* 62(1):45-53.
- **MEDINA, L.; GUERRERO, H.; CANALES, A.; MORALES, A.; FERIA, A. 2007.** Características estructurales y funcionales de los transportadores de glutamato: su relación con la epilepsia y el estrés oxidativo. *Rev Neurol.* 45: 341-52
- **MESA, T.; MESA, J. T.; GUARDA, J.; MAHALUF, F.; PAUCHARD, F.; UNDURRAGA, F.; ASMAD, C.; SILVA, G. 2007.** Costes directos de la epilepsia en una población chilena. *Rev Neurol.* 44 (12): 710-714
- **MORENO, S.; MUGNAINI, E.; CERU, M.P. 1995.** Immunocytochemical Localization of Catalase in the Central Nervous System of the Rat. *J Histochem Cytochem.* 43(12):1253-67
- **MOTLES, E. 1993.** Epilepsia y Estados convulsivos. Fisiopatología del Sistema Nervioso. Editorial Mediterraneo. Santiago, Chile. pp 218-230.
- **MOTLES, E.; CARTIER, L.; INFANTE, C. 2002.** Induction and blockade of epileptic foci by intracerebral injection of glutamatergic agonists and antagonists in freely moving cats. *Arch Ital Biol.* 140(1):41-50
- **REINOSO-SUAREZ, F. 1961.** Topographischer Hirnatlas der katze für Experimentale Physiologische Untersuchungen. Merck, Darnstadt F.R.G.

- **RODRIGO, R.; RIVERA, G. 2003.** Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. Monografía. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina. Lab. Fisiopatología Renal, ICBM. 1-35p.
- **RÖHRDANZ, E.; OHLER, S.; TRAN-THI, Q.H.; KAHL, R. 2001.** Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch Toxicol.* 75(3):150-8
- **SCHAD, A.; FAHIMI, H. D.; VÖLKL, A.; BAUMGART, E. 2003.** Expression of Catalase mRNA and Protein in Adult Rat Brain: Detection by Nonradioactive In Situ Hybridization with Signal Amplification by Catalyzed Reporter Deposition (ISH-CARD) and Immunohistochemistry (IHC)/ Immunofluorescence (IF). *J. Histochem Cytochem.* 51:751-760.
- **TANAKA, S.; KAIJIMA, M.; TANAKA, T., KUNIMOTO, M.; YONEMASU, Y. 1989.** Acute effect of penicillin G on feline models of focal epilepsy. *No To Shinkei.* 41(3):293-8.
- **TANAKA, S.; KAIJIMA, M.; YONEMASU, Y.; CEPEDA, C. 1985.** Spontaneous secondarily generalized seizures induced by a single microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 61(5):422-9.
- **TANAKA, T.; KAIJIMA, M.; DAITA, G.; OHGAMI, S.; YONEMASU, Y.; RICHE, D. 1982.** Electroclinical features of kainic acid-induced status epilepticus

in freely moving cats. Microinjection into the dorsal hippocampus. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 54(3):288-300.

- **TEJADA, S.; ROCA, C.; SUREDA, A.; RIAL, R.V.; GAMUNDI, A.; ESTEBAN, S. 2006.** Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments. *Brain Res Bull.* 69(5):587-92.
- **TUUNANEN, J.; HALONEN, T.; PITKÄNEN, A. 1996.** Status epilepticus causes selective regional damage and loss of GABAergic neurons in the rat amygdaloid complex. *Eur J Neurosci.* 8(12):2711-25.
- **VETRANO, A.; HECK, D.; MARIANO, T.; MISHIN, V.; LASKIN, D.; LASKIN, J. 2005.** Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J. Biol. Chem.* 280 (42): 35372-35381.
- **WANG, H.; CHENG, E.; BROOKE, S.; CHANG, P.; SAPOLSKY, R. 2003.** Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults. *J. Neurochem.* 87(6):1527-1534.
- **XAVIER, SM.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D. O.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, A. A.; FREITAS, R. M. 2007.** Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci Lett.* 420(1):76-9.