



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN
PEROXIDASA EN CORTEZA CEREBRAL, HIPOCAMPO Y
AMÍGDALA DE GATOS CON EPILEPSIA INDUCIDA POR
AMPA.**

PAULINA ANGELICA COLLAO REYES

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



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN CORTEZA CEREBRAL, HIPOCAMPO Y AMÍGDALA DE GATOS CON EPILEPSIA INDUCIDA POR AMPA.

PAULINA ANGELICA COLLAO REYES

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

NOTA FINAL:

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

SANTIAGO, CHILE

2009

*Dedico esta memoria a mi esposo, madre y hermano,
Quienes son la base de lo que soy.*

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero dar las gracias a mi madre, por su esfuerzo, amor y comprensión infinita, a mi hermano quien estuvo siempre empujándome para ser la profesional que hoy soy, a mi esposo que ha sido el mejor compañero que la vida pudo regalarme y que sin condiciones ha estado en todo este largo camino.

No puedo dejar de lado al Dr. Claudio Infante, mi profesor guía, por su apoyo, su entrega de conocimiento y sus sabias palabras, que fueron factor desencadenante para terminar feliz este proceso. A los funcionarios de la Facultad de Medicina Experimental, en especial a Sr. Ismael quien generosamente fue un apoyo importante en el desarrollo experimental de este trabajo, a Jaime por su amena compañía y entrega de experiencia en los días de trabajo. Y a todos aquellos funcionaron que colaboraron de una u otra forma.

Por supuesto a mis amigos y familiares, quienes siempre tuvieron una palabra de aliento y nunca perdieron la fe en mí. Especialmente a mi buena amiga y compañera Andrea Escobar, con quien además de compartir lindo años de Universidad, largos días de trabajo, supo ser un puntal e incentivo permanente en el caminar por esta última etapa universitaria.

Finalmente de manera póstuma, al Dr. Elías Motles, una profesional admirable, con una gran sabiduría y entrega, y a quien le hubiera gustado ver este trabajo finalizado.

Gracias Sinceras a TODOS...

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMARY.....	3
INTRODUCCION.....	5
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	7
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
I. ANÁLISIS ELECTROENCEFALOGRÁFICO.....	17
II. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL.....	21
III: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GSHPX.....	22
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

RESUMEN

La Glutación peroxidasa (GSHPx) es un enzima que forma parte de un sistema antioxidante, la cual reacciona en forma efectiva contra lípidos y otros hidroperóxidos contribuyendo a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo. Los mecanismos del daño neuronal inducido por la convulsión que acompaña a la epilepsia y los desórdenes relacionados no están completamente entendidos, pero el desarrollo de modelos experimentales animales han sido de gran ayuda en la dilucidación de algunos de los eventos celulares responsables (Jiang *et al*, 2000). A nivel del cerebro humano la GSHPx es la enzima que da cuenta de la mayor parte de la actividad enzimática capaz de reducir H_2O_2 .

Debido a lo anterior este estudio tuvo como objetivo, determinar en un modelo experimental de epilepsia en gatos, la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en tres estructuras cerebrales, las cuales presentan un bajo umbral a la epilepsia, tales como la corteza cerebral, hipocampo y amígdala.

Para la realización de este estudio se trabajó con tres grupos de gatos adultos separados en: 1. grupo control, 2. grupo experimental de 24 horas y 3. grupo experimental de 5 días, a los cuales se les implantó una cánula y un electrodo en hipocampo derecho, a su vez electrodos en corteza cerebral, hipocampo izquierdo y ambas amígdalas. En los grupos experimentales de 24 horas y 5 días, se inyectó AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 – isoxazolpropionato) como agente epileptogénico, a través de la cánula implantada en hipocampo derecho, por otro lado en el grupo control se realizó el mismo procedimiento inyectando solución salina (NaCl 0,9 %). Además se realizaron registros de los cambios electroencefalográficos y conductuales en el grupo control y los grupos experimental de 24 horas y 5 días.

El grupo control y el grupo experimental de 24 horas fueron sacrificados a las 24 horas y el grupo experimental de 5 días, fue sacrificado a los 5 días post-inyección de AMPA.

Bajo anestesia profunda se extrajeron muestras de tejido de corteza cerebral, hipocampo y amígdala. Las muestras posteriormente fueron homogeneizadas para determinar la actividad enzimática de la GSHPx.

Los resultados mostraron una variación en la actividad enzimática de la GSHPx, donde se observa una disminución de la actividad a las 24 horas tanto en cortezas cerebrales y amígdalas ($p < 0,05$), con una recuperación hacia los niveles basales a los 5 días. El Hipocampo izquierdo tuvo un comportamiento similar a las estructuras anteriormente mencionadas, pero sin diferencias significativas. El Hipocampo derecho fue la única estructura que mostró un comportamiento totalmente diferente, donde la actividad de la GSHPx tendió a aumentar en el tiempo, sin diferencias estadísticas.

Los resultados en la actividad enzimática de la GSHPx concuerda con los resultados electroencefalográficos en los cuales se observan postdescargas y espigas epilépticas, posterior a la inyección de AMPA, las cuales mostraron una disminución del fenómeno epiléptico desde las 24 horas en adelante.

Estos resultados, sugieren un compromiso de la enzima en las etapas iniciales de un fenómeno epiléptico focalizado y restringido, en las estructuras estudiadas, pero aún se necesitan más estudios en los que se pueda observar el comportamiento de esta enzima, en las etapas inmediatamente posteriores a la generación del foco epiléptico.

SUMMARY

The Glutathione peroxidase (GSHPx) is an enzyme that forms part of an antioxidant system, which reacts in an effective way against lipids and other hydroperoxides, contributing to that protection of the cells of mammals against the oxidative damage.

The mechanisms of the neuronal damage, inducted by convulsion that comes with epilepsy and the related disorders are not completely understood, but the development of experimental animal models have been of great help in the explanation of some of the responsible cellular events (Jiang *et al*, 2000). The GSHPx in the human brain, is the enzyme that shows most of the enzymatic activity capable to reduce the Hydrogen peroxide (H₂O₂).

Due to what was mentioned in the previous paragraph, this study had as target, to determine in an experimental model of epilepsy in cats, the enzymatic activity of the glutathione peroxidase in three cerebral structures, which present a low threshold to epilepsy, such as cerebral cortex, hippocampus and amygdala.

For the realization of this study, three groups of adult cats were used and separated into: 1. Control group; 2. 24-hour experimental group; and 3. 5-day experimental group, to which a cannula and an electrode in the right hippocampus were implanted, as well as electrodes in the cerebral cortex, left hippocampus and both amygdalas. In both of the experimental groups, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) was injected as an epileptogenic agent, through the cannula implanted on the right hippocampus. On the other hand, in the control group the same procedure was performed, injecting saline solution (NaCl 0.9%). Besides, the changes in the electroencephalographic and conductance records in the control group and both of the experimental groups were made.

Both the control group and the 24-hour experimental group were sacrificed 24 hours after, and the 5-day experimental group was sacrificed 5 days after the post-injection of AMPA.

Under deep anesthesia, samples of the cerebral cortex, hippocampus and amygdala were extracted. The samples were homogenized later, in order to determine the enzymatic activity of the GSHPx.

The results showed a variation in the enzymatic activity of the GSHPx, where a decrease of the activity after 24 hours, in both cerebral cortex and amygdalas ($p < 0.05$), with a recovery to the basal levels after 5 days was observed. The left hippocampus had a behaviour that was similar to the structures previously mentioned, but without significative differences. The right hippocampus was the only structure that showed a totally different behaviour, where the activity of the GSHPx tended to increase as time went by, but without statistic differences.

The results in the enzymatic activity of the GSHPx agrees with the electroencephalographic results, in which post-discharges and epileptic spikes, after the injection of the AMPA, and which showed a decrease of the epileptic phenomenon from 24 hour on was observed.

These results suggest a compromise of the enzyme in the initial stages of a focused and restricted epileptic phenomenon, in the studied structures, but further studies are needed in order to observe the behaviour of this enzyme, in the stages that come immediately after the generation of the epileptic focus.

INTRODUCCION

La epilepsia es un desorden cerebral crónico que reconoce en su origen causas y patologías diferentes, donde la extensión del fenómeno de hiperexcitabilidad puede estar localizado o generalizarse al resto del SNC. La epilepsia como fenómeno de hiperexcitabilidad se puede deber a alteraciones fisiológicas, en la cual se rompe el equilibrio interactivo entre neurocircuitos excitatorios e inhibitorios. En procesos crónicos de hiperexcitabilidad la mayor liberación de neurotransmisores excitatorios puede generar fallas o desajustes en los mecanismos de degradación o recaptación de glutamato (el más abundante neurotransmisor excitatorio) y por lo tanto, cambios en la densidad y sensibilidad de sus receptores. El aumento de la actividad excitatoria inicia procesos de mayor generación de radicales libres principalmente por alteraciones en la homeostasis del ión calcio.

El estrés oxidativo juega un papel en el daño neuronal asociado a las crisis epilépticas. Se conoce que las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSHPx) controlan el daño oxidativo biológico al transformar los especies reactivas del oxígeno a sustancias más inocuas (Hussain *et al*, 1995). Las células aeróbicas contienen diversas cantidades de estas tres enzimas antioxidantes, que son necesarias para la sobrevivencia celular puesto que la inhibición de su actividad conduce a la detención de la mitosis celular y a la muerte celular.

Los mecanismos del daño neuronal inducido por la convulsión que acompaña a la epilepsia y los desórdenes relacionados no están completamente entendidos, pero el desarrollo de modelos experimentales animales han sido de gran ayuda en la dilucidación de algunos de los eventos celulares responsables (Jiang *et al*, 2000). Esta memoria de título pretende ser un aporte

al entendimiento de uno de los sistemas enzimáticos endógenos relacionados con la defensa del organismo contra los radicales libres y peróxidos.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El término epilepsia se emplea para designar procesos crónicos, repetitivos, con intervalos variables entre los períodos de manifestaciones. Un porcentaje de los casos de epilepsia aparece como complicación de una patología adquirida del sistema nervioso, ya sea secuela de un traumatismo craneano, tumores, hemorragia, infecciones o procesos degenerativos. En el resto de los casos la causa es de origen genético (Motles, 1993).

Las epilepsias se caracterizan por la capacidad de ciertas neuronas de experimentar variaciones en su excitabilidad con la aparición de cambios de depolarización paroxísticos (PDS, del inglés “*Paroxysmal Depolarization Shifts*”). Estos PDS se inician con una depolarización de la neurona más prolongada que lo normal, la cual genera una salva de potenciales de acción de alta frecuencia, acompañada de una hiperpolarización de la neurona antes de volver a su potencial de reposo (Armijo *et al*, 2002). Los factores que aumentan las corrientes depolarizadoras hacia el interior de las células (flujo de Na^+) o que deprimen los flujos de K^+ hacia el exterior de las neuronas, pueden producir depolarizaciones prolongadas que favorecen el inicio de la actividad epiléptica. Schiwindt y Crill, 1980 postulan que tanto las fluctuaciones en las concentraciones iónicas extracelulares, como las acciones de neurotransmisores y neuromoduladores, pueden alterar la función de los canales iónicos neuronales e iniciar la actividad epiléptica (Motles, 1993).

Algunas neuronas que se caracterizan por tener muy bajo umbral para disparar potenciales de acción, se localizan principalmente en la corteza cerebral, hipocampo y amígdala. Estas estructuras se muestran particularmente sensibles a la generación de epilepsia. Ellas están normalmente bajo la influencia de estímulos excitatorios glutamatérgicos e inhibitorios gabaérgicos. (Infante *et al*, 2002)

Si este equilibrio se altera, bien por sobreexcitación o bien por la reducción de la inhibición que regula los procesos de comunicación neuronal, pueden producirse descargas descontroladas de impulsos excitadores que conduzcan a una crisis epiléptica y que se manifiesten como síntomas positivos de la función asignada a ese grupo de neuronas (crisis parcial) e incluso recluten nuevos grupos neuronales y alcancen el sistema reticular ascendente de manera que se altera la consciencia del individuo (generalización de la crisis). (de Cabo *et al*, 2006)

Se denomina estrés oxidativo a la ruptura del equilibrio entre los factores de oxidación celular y los mecanismos de defensas antioxidantes. El estrés oxidativo se puede generar por disminución de los mecanismos antioxidantes o por aumento de los procesos oxidativos o la combinación de ambos fenómenos. Las reacciones de óxido - reducción son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones y pueden generar productos conocidos como radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Gonzalez – Fraguela *et al*, 2000). Los radicales libres, se producen normalmente en la célula en concentraciones bajas o moderadas como productos colaterales del metabolismo oxidativo, tanto a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Debido a su elevada reactividad, pueden combinarse con una gran variedad de biomoléculas, cambiar sus características fisicoquímicas e iniciar reacciones con sustratos importantes para la supervivencia de la célula, tales como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; las membranas celulares son particularmente vulnerables a su acción, ya que la peroxidación lipídica (PL) constituye una cascada en cadena, en la que un radical libre origina la producción de muchos otros radicales libres. (Martínez *et al*, 2004)

Las células están expuestas a la producción continua de ROS; dado el potencial dañino de estas moléculas, cabría preguntarse cómo los organismos sobreviven. La respuesta está en la existencia de una efectiva dotación molecular que protege contra el daño oxidativo. Estos

mecanismos defensivos están compuestos por sustancias de bajo peso molecular capaces de neutralizar espontáneamente a los ROS y a los productos derivados de su acción y son conocidos como “*scavengers*”. A esto se añade la existencia de enzimas que controlan la formación de especies oxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSHPx). (González *et al*, 1999). Primero la SOD convierte el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Después de esto la CAT y la GSHPx convierten independientemente el H_2O_2 en agua. Un desbalance en la proporción de SOD, GSHPx y CAT resulta en la acumulación de H_2O_2 que en presencia de Fe^{++} puede participar en la reacción de Fenton, resultando en la formación de los nocivos radicales hidroxilos ($\bullet OH$). Estos ROS son altamente reactivos y causan daño a macromoléculas tales como DNA, proteínas y lípidos (de Haan *et al*, 1995).

La GSHPx es una peroxidasa soluble, y autores como Asahi y Cisneros reconocen 3 isoenzimas, GSHPx celular (GSHPx-c), GSHPx extracelular o plasmática (GSHPx-p) y GSHPx fosfolípido hidroperoxidasa (GSHPx-PH) y cada una contiene seleno-cisteína en su centro catalítico (Asahi *et al*, 1995 y Cisneros *et al*, 1997). La GSHPx comparte su sustrato con la CAT, pero además puede reaccionar en forma efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$, H_2O_2) usando glutatión reducido (GSH), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Rodrigo y Rivera, 2003). La GSHPx y la Glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GSHPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GSHPx lo hace a bajas concentraciones (Cisneros *et al*, 1997). Por otro lado el contenido de catalasa es inferior que el contenido de GSHPx en la mayoría de las células, excepto hepatocitos y eritrocitos, y el valor de K_m de

catalasa para el H_2O_2 es más alto que aquel de la GSHPx, implicando la importancia primaria de GSHPx en la mayor parte de tejidos. (Asahi, 1995). La GSHPx da cuenta de la mayor parte de la actividad enzimática capaz de reducir H_2O_2 en el cerebro humano. La actividad de la catalasa es menor en tejido cerebral y se encuentra predominantemente en peroxisomas (Cudkowicz *et al*, 2002).

El cerebro es una estructura de alta actividad metabólica, con alto requerimiento de oxígeno que recibe una quinta parte del gasto cardiaco total y contiene altas concentraciones de hierro y sustratos fácilmente oxidables, como las catecolaminas y los lípidos poliinsaturados; por todo ello, el sistema nervioso es particularmente susceptible al ataque de los ROS (González *et al*, 2000).

Algunos trabajos de investigación realizan microinyecciones de agonistas glutamatérgicos en estructuras cerebrales (Katsumori *et al*, 1998; Infante *et al*, 2002; Motles *et al*, 2002). Estos agonistas son utilizados como agentes epileptogénicos que aumentan la excitabilidad del SNC, permitiendo el estudio de cambios funcionales y/o morfológicos, en el SNC. Uno de los agonistas glutamatérgicos es el AMPA el cual inyectado en dosis umbrales a través de una cánula intracerebral, es capaz de generar focos epilépticos atenuados.

Las principales regiones del cerebro estudiadas como focos epilépticos han sido fundamentalmente la neocorteza y el hipocampo, que además son las regiones que suelen ser estructuras blanco de cirugía en casos de epilepsias que no responden al tratamiento farmacológico. La amígdala ha recibido también una gran atención por parte de los experimentadores debido a su demostrada capacidad de transformarse en foco epileptogénico tras una estimulación repetitiva (generalmente eléctrica, pero también farmacológica o por estímulos sensoriales) procedimiento conocido como “*kindling*”.

Actualmente se desconocen los factores que transforman una parte del cerebro normal en epiléptico, por lo que el estudio de animales que presentan epilepsia resulta muy útil para el conocimiento de la fisiopatología de este grupo de enfermedades. (de Cabo *et al*, 2006).

Hasta ahora los estudios post mortem han sido extremadamente valiosos en la detección de algunos indicadores de estrés oxidativo, pero tienen el inconveniente de que no proveen información sobre la dinámica de los procesos degenerativos y de la secuencia en la cual los cambios bioquímicos ocurren. Por esta razón resulta necesario disponer de modelos experimentales en los cuales se pueda reproducir las alteraciones y el curso temporal y regional que estos procesos oxidativos siguen en los organismos afectados, de esta forma será posible comprender con mayor profundidad los fenómenos derivados de las alteraciones del metabolismo oxidativo celular y su relación con el fenómeno epiléptico (González *et al*, 1999).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en un modelo de epilepsia experimental en gato.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Generar actividad epiléptica, inducida por administración de AMPA en hipocampo derecho.
2. Analizar los cambios conductuales y electroencefalográficos asociados con la inducción epiléptica, en dos grupos experimentales de gatos, según protocolo establecido.
3. Determinar la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en corteza cerebral, hipocampo y amígdala en un grupo control y dos grupos experimentales.
4. Comparar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa entre corteza cerebral, hipocampo y amígdala de gato.

✓ MATERIAL Y METODOS

Grupos experimentales: 15 gatos adultos mestizos de ambos sexos, fueron separados en 3 grupos de 5 animales cada uno: grupo control, grupo experimental de 24 horas y grupo experimental de 5 días. El Comité de Bioética del Campus Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, autorizó los procedimientos experimentales, la mantención y cuidados de los animales, de acuerdo con normas establecidas de trabajo con animales de experimentación (Zimmerman, 1983).

Cirugía: Bajo anestesia general con Nembutal 1% (30mg/kg, i.p.) los animales fueron fijados a través de su cabeza en un equipo estereotáxico con el fin de implantar con precisión esterotáctica en el hipocampo derecho, una cánula con un electrodo adherido. De la misma forma se implantaron electrodos en hipocampo izquierdo, amígdalas y corteza cerebral. Estas estructuras fueron abordadas a través de un sistema de coordenadas estereotáxicas descritas en un Atlas histológico para cerebro de gatos (Reinoso Suarez, 1961). Tanto los electrodos como la cánula se fijaron al hueso con acrílico dental, todos los electrodos de registro fueron soldados a una base la cual a través de un cable de conexión permitió el ingreso de las señales a un electroencefalógrafo GRASS® modelo 6. Finalizada la cirugía se administró Penicilina Sódica (200.000 UI, i.m.) y en forma tópica en herida y conjuntiva ocular. Además el gato fue hidratado con suero glucosalino 60 mL, s.c. Al día siguiente se administró Penicilina Benzatina (100.000 UI, i.m.) y luego de un período de recuperación de 7 días se comenzó con la siguiente fase experimental.

Inyección de AMPA: Los animales de los grupos experimentales de 24 horas y 5 días fueron inyectados intracerebralmente con una dosis de 80 µg de AMPA (40 mM) (agonista glutamatérgico de efecto epileptogénico) en un volumen de 5 µL. Para tal efecto se utilizó una

jeringa Hamilton, la cual se introdujo en la cánula previamente implantada sobre el hipocampo derecho. La administración se realizó lentamente durante 1 minuto.

Registro de la actividad bioeléctrica: Previo a la inducción de la epilepsia se realizó durante 15 minutos un primer registro electroencefalográfico control de referencia, y luego se procedió a la inyección de AMPA o de solución salina dependiendo del grupo de animales. Inmediatamente después de la administración de AMPA o solución salina según sea el caso, se inició el monitoreo de la actividad electroencefalográfica con el fin de detectar la actividad epiléptica y en forma paralela se observó si hubo cambios conductuales inducidos por la actividad epiléptica. A los animales del grupo de 24 horas se tomaron registros continuos durante las primeras 4 horas después de la inyección de AMPA y un registro diagnóstico de 1 hora antes de su sacrificio, esto es a las 24 horas post inyección de AMPA. El grupo de 5 días se registró inmediatamente después de la inyección por un periodo de 4 horas y los días siguientes se monitoreó la actividad encefalográfica por 1 hora hasta el 5° día.

Extracción de muestras: Luego de anestesia profunda con Nembutal (60mg/kg i.p); los animales fueron colocados en el equipo estereotáxico, en donde se retiró la base de acrílico y los electrodos, luego se tomó biopsias de tejido de corteza cerebral izquierda y derecha, ambos hipocampos y ambas amígdalas. Las amígdalas fueron ubicadas estereotáxicamente a través de la marca de una aguja entintada. Finalmente los animales fueron sacrificados con bloqueo del tronco encefálico. Los tejidos fueron lavados en solución salina a 4°C, rotulados y puestos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

Preparación de los tejidos: Los tejidos fueron pesados en forma individual y puestos en tubos rotulados; se adicionó una solución “*buffer*” con inhibidores de proteasas a 4°C; se homogeneizó con Tissue Tearor TM 5 veces por 10 segundos en frío. Luego se llevó a la

centrifuga (1500 x g durante 15 min a 4°C.), la fracción sobrenadante fue alicuotada y almacenada a -80°C para la posterior determinación de la actividad enzimática de la GSHPx.

Determinación de proteínas: La determinación se realizó por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Basado en una medición espectrofotométrica a 750 nm, usando de referencia una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).

Determinación de la actividad de GSHPx: El método a utilizar fue el Gunzler (Gunzler *et al*, 1985). Este método utiliza t-butil hidroperóxido (30 mM) como substrato además de otros reactivos como: NADPH (8 mM), glutatión reducido (GSH) (0,1 M), glutatión reductasa (GSH-Rd) (50/mL). El ensayo se fundamenta en la oxidación del GSH por la glutatión peroxidasa (GSHPx) (ecuación 1) asociado al consumo de NADPH por la GSH-Rd (ecuación 2). (Ver figura N°1)

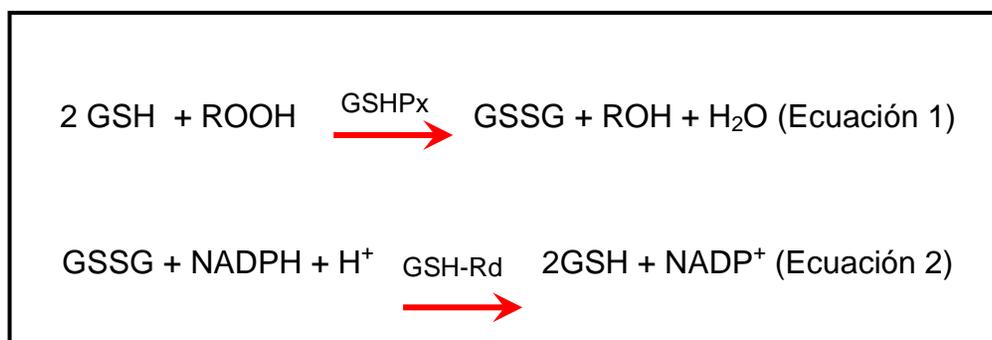


Figura 1. GSH glutatión reducido; ROOH hidroperóxido; GSHPx Glutatión peroxidasa; GSSG glutatión oxidado; ROH hidroxilo, H₂O agua; NADPH Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido; GSH-Rd Glutatión Reductasa; NADP⁺ Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato.

Mediante un espectrofotómetro modelo Shimadzu UV-150, se registraron los cambios en la absorbancia del NADPH a 340 nm en una solución que contenía fosfato potásico 50 mM a pH 7,0 con DTPA 0,5 mM. Las mediciones se realizaron cada 30 segundos durante 3 minutos a 37° C.

La actividad enzimática fue expresada en miliunidades (mU) de GSHPx/ mg de proteína. Una unidad de GSHPx se define como aquella que causa la oxidación de 1 μmol GSH (ó 0,5 μmol NADPH) por minuto. (Del Maestro *et al*, 1985).

Análisis Estadístico: Se utilizaron para el análisis estadístico las pruebas no paramétricas Mann Withney y Kruskal Wallis. Se consideró un $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

I. Análisis Electroencefalográfico

I.a. Experimento grupo control:

La inyección de solución salina (NaCl 0,9 %), en hipocampo derecho, en un volumen de 5 μ L, equivalente a lo utilizado en la inyección hipocampal de AMPA, no produjo alteraciones electroencefalográficas, en los gatos del grupo control. (Ver Figura N° 2)

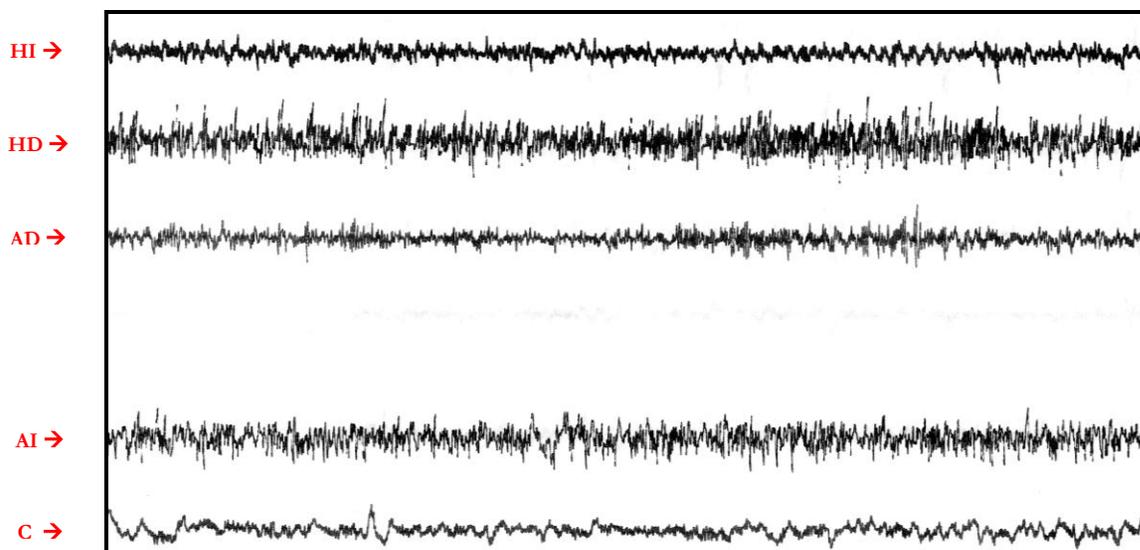


Figura 2. Electroencefalograma grupo control. HI: Hipocampo izquierdo; HD: Hipocampo derecho; AD: Amígdala derecha; AI: Amígdala izquierda; C: Corteza cerebral.

I.b. Grupos Experimental 24 horas y 5 días (efecto epileptogénico de la inyección de AMPA en hipocampo derecho).

La administración de AMPA, en hipocampo derecho, en un volumen de 5 μ L, generó rápidamente postdescargas en el grupo experimental de 24 horas y en el de 5 días. (Ver Figura N° 3).

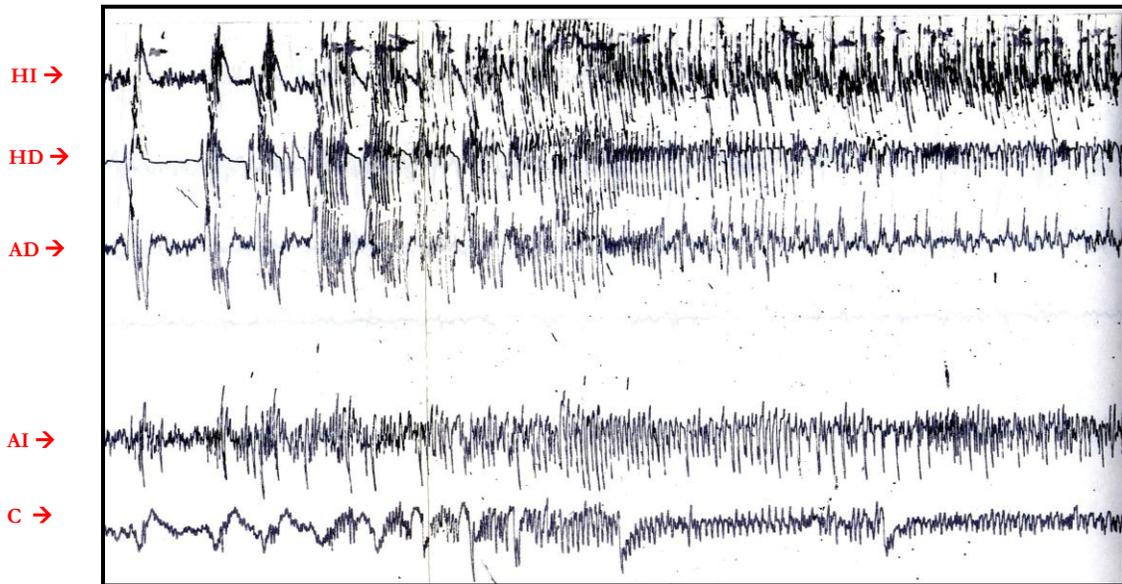


Figura 3. Electroencefalograma grupo experimental, postdescarga en las 5 estructuras. HI: Hipocampo izquierdo; HD: Hipocampo derecho; AD: Amígdala derecha; AI: Amígdala izquierda; C: Corteza cerebral.

También se pudo apreciar que inmediatamente después de la administración de 5 uL de la solución de AMPA en concentración de 16ug/uL en el hipocampo derecho, la actividad EEG se deprimió notoriamente en comparación con las otras estructuras. (Ver Figura N° 4)

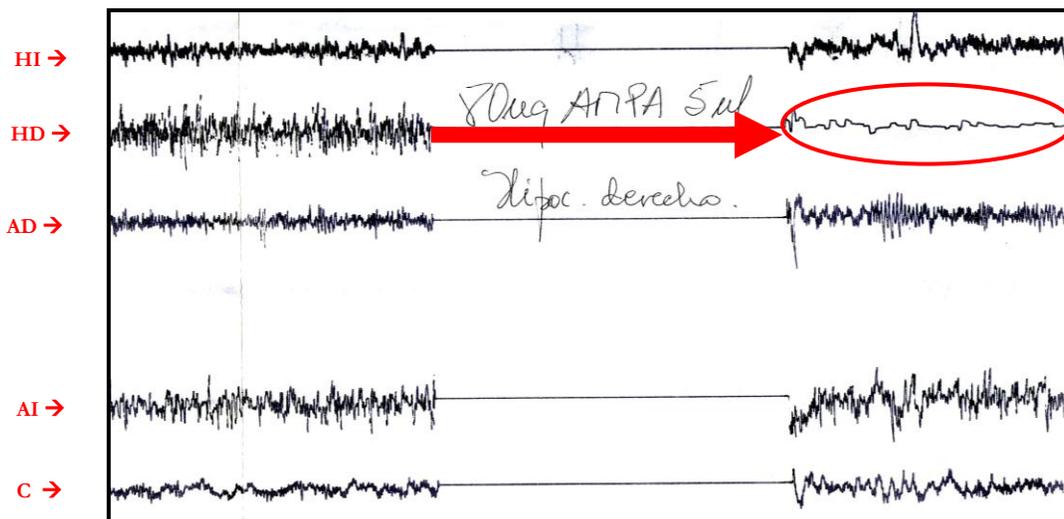


Figura 4. Aplanamiento en la lectura del hipocampo derecho inmediatamente después de la inyección de AMPA. HI: Hipocampo izquierdo; HD: Hipocampo derecho; AD: Amígdala derecha; AI: Amígdala izquierda; CF: Corteza cerebral sensorio - motora.

Caracterización de postdescargas y espigas obtenidas por inyección intracerebral de AMPA en los grupos experimentales.

Las postdescargas y espigas generadas en los grupos experimentales de 24 horas y 5 días fueron visualizadas a través del registro electroencefalográfico y se caracterizaron mediante los siguientes parámetros:

- **Latencia de la 1ª Postdescarga:** Corresponde al tiempo transcurrido entre la microinyección de AMPA y la primera postdescarga, medida en minutos. La corteza muestra un tiempo levemente mayor de latencia comparado con las otras estructuras. (Ver tabla N° 1)

Tabla 1: Valores Promedios de latencia 1º Postdescarga \pm error estándar.

Estructuras Cerebrales	Corteza Sensorio-motora	Hipocampo Derecho	Hipocampo Izquierdo	Amígdala Derecha	Amígdala Izquierda
	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES
Latencia 1º Post descarga (min.)	35 \pm 23	31 \pm 21	28 \pm 21	32 \pm 24	31 \pm 21

- **Origen de las PD:** Corresponde a la estructura en la cuales se iniciaban las postdescargas, se pudo observar que las postdescargas se iniciaron en estructuras subcorticales principalmente hipocampo.
- **Presencia de Espigas posteriores a las Postdescargas:** Después de transcurridas 24 horas desde la microinyección de AMPA, ambos grupos experimentales, grupo 24 horas y grupo 5 días, mostraron un cambio en el registro encefalográfico, donde las postdescargas fueron reemplazadas por espigas, las que se manifestaron en la mayor parte de los casos, en hipocampo derecho sitio de inyección de AMPA, en

comparación con las otras estructuras registradas. La corteza no mostró espigas posteriores (Ver tabla N° 2, Figuras 5 y 6).

Tabla 2. Presencia de espigas epilépticas posterior a la inyección de AMPA, mostrado a través del N° de animales que presentaron dicha manifestación.

N° de animales con espigas	Estructuras Cerebrales	Corteza Sensorio-motora	Hipocampo Derecho	Hipocampo Izquierdo	Amígdala Derecha	Amígdala Izquierda
N° Animales con espigas 4 hrs. post inyección. n = 8		2	6	4	4	3
N° Animales con espigas 24 hrs. post inyección. n = 8		0	5	2	1	2
N° Animales con espigas 5 días post inyección. n = 4		0	2	0	0	1

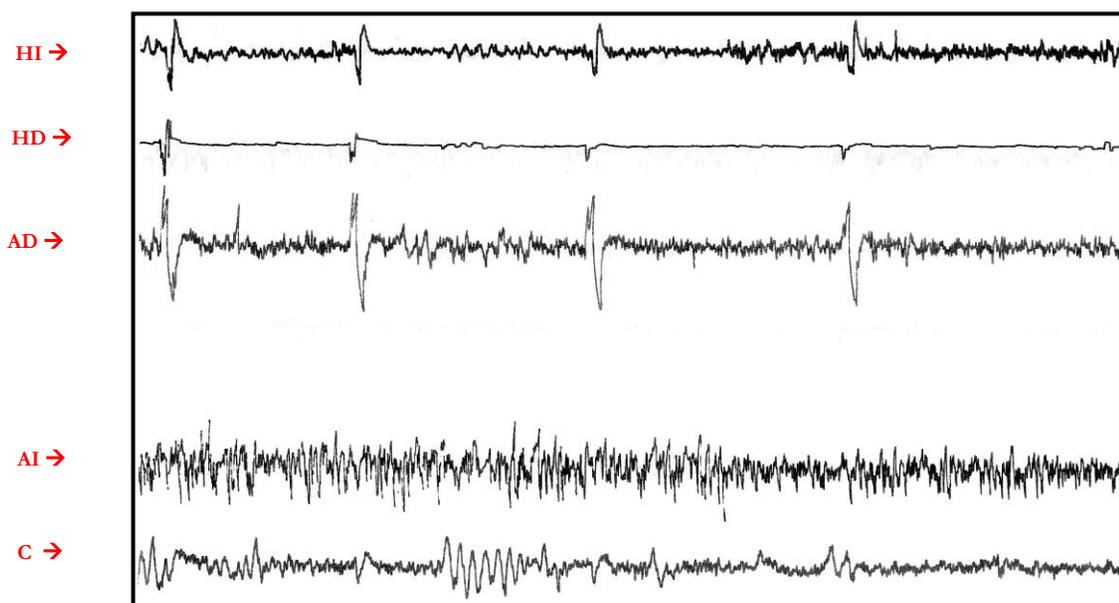


Figura 5. Espigas 24 horas post inyección en Hipocampo derecho e izquierdo y amígdala derecha. HI: Hipocampo izquierdo; HD: Hipocampo derecho; AD: Amígdala derecha; AI: Amígdala izquierda; CF: Corteza cerebral sensorio - motora.

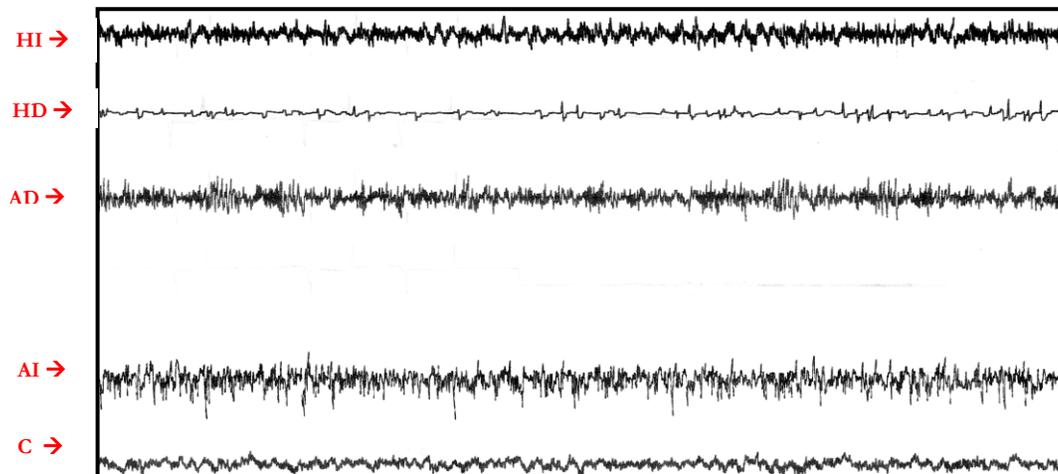


Figura 6. Espigas 5 días post inyección en hipocampo derecho. HI: Hipocampo izquierdo; HD: Hipocampo derecho; AD: Amígdala derecha; AI: Amígdala izquierda; CF: Corteza cerebral sensorio - motora.

II. Caracterización conductual.

II.a. Experimento grupo control:

En el grupo control al cual se administró solución fisiológica en hipocampo derecho, en un volumen equivalente a los grupos experimentales, no se evidenció alteraciones patológicas en el registro EEG, ni cambios conductuales.

II. b. Experimentales 24 horas y 5 días.

La inyección de 5 μ L del agonista glutamatérgico AMPA, generó espigas y postdescargas que se iniciaban principalmente en hipocampo y amígdala, en algunos casos las postdescargas se acompañaron de cambios conductuales tales como: maullidos, salivación, agresividad, estado defensivo, taquipnea, gruñidos, piloerección, rasquidos ó lamidos. Sin embargo cuando se generaron postdescargas que se generalizaron al resto de las estructuras incluyendo corteza, la mayoría de las veces aunque no siempre se registraron signos tales como: tremor, nistagmo, anisocoria, contracción párpado izquierdo, giro de la cabeza a la izquierda, clonos leves en tronco y cabeza. Trascorridas 24 horas desde la inyección de AMPA, el registro electroencefalográfico cambió evidenciándose solamente algunas espigas. La conducta de los

gatos no mostró alteraciones como las manifestadas durante las postdescargas, los gatos se encontraban tranquilos y atentos al medio.

III: Determinación de la actividad de GSHPX.

III. A Experimento grupo control:

Los valores promedios de Glutación peroxidasa en las diferentes estructuras estudiadas fueron, en corteza de $116,48 \pm 10,07$ mU GSHPx/mg prot.; hipocampo $103,07 \pm 18,99$ mU GSHPx/mg prot.; amígdala $53,03 \pm 3,17$ mU GSHPx/mg prot. (Ver tabla N° 3 y Figura N° 7)

Tabla N° 3. Valores promedio medido en mU GSHPx/mg proteína del grupo control y experimentales de 24 horas y 5 días \pm error estándar.

Estructuras Cerebrales	Actividad GSHPx (mU/mg proteínas)		
	Cortezas	Hipocampos	Amígdalas
Control	$116,48 \pm 10,07$	$103,07 \pm 18,99$	$*53,03 \pm 3,17$
Experimental 24 Horas	$80,78 \pm 5,52$	$90,26 \pm 9,44$	$*41,94 \pm 3,67$
Experimental 5 días	$93,86 \pm 8,56$	$101,86 \pm 15,43$	$*57,33 \pm 2,48$

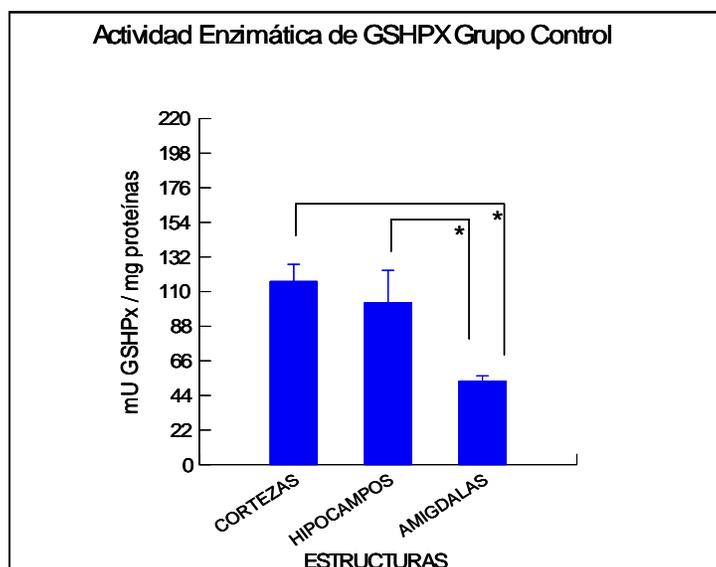


Figura N° 7. Actividad enzimática promedio de GSHPx (glutación peroxidasa) en el grupo control. (* $p < 0,05$).

A nivel basal la mayor actividad enzimática se observó en corteza cerebral e hipocampo. La amígdala en cambio presentó niveles basales de actividad enzimática, más bajo que la corteza e hipocampo, esta diferencia fue estadísticamente significativa tanto con la corteza cerebral ($p=0,001$) como con el hipocampo ($p= 0,009$). (Ver Figura N° 7)

III.B. Actividad de la enzima GSHPx en el grupo experimental de 24 horas y 5 días.

1. Cortezas Cerebrales:

La actividad promedio de la enzima en el grupo control fue $116,48 \pm 10,07$ mU GSHPx / mg proteínas; mientras la actividad promedio en el grupo experimental de 24 horas fue $80,78 \pm 5,52$ mU GSHPx / mg proteínas; por su parte la actividad promedio de la enzima en grupo experimental de 5 días fue de $93,86 \pm 8,56$ mU GSHPx / mg proteínas. Los valores de la actividad enzimática de la GSHPx muestran una tendencia a disminuir 24 horas después de la inyección de AMPA y tienden a recuperarse a los 5 días. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. (Ver Figura N° 8)

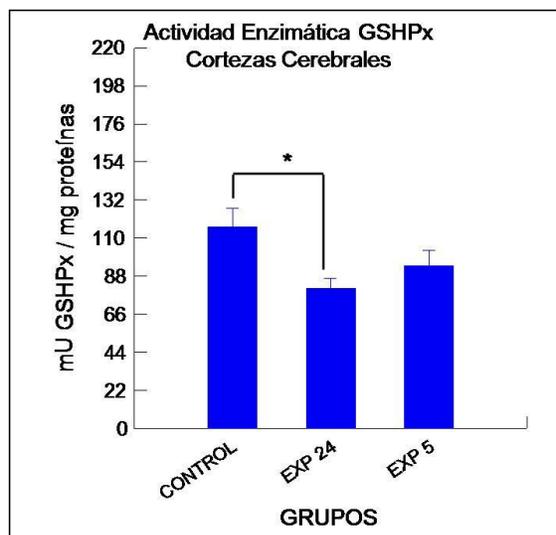


Figura N° 8. Actividad enzimática de GSHPx en corteza cerebral en los grupos: CONTROL, EXP24 (experimental de 24 horas) y EXP5 (experimental de 5 días). * $p=0,006$

2. Hipocampos:

La actividad enzimática en el hipocampo mostró diferencias a nivel de hemisferios observándose lo siguiente:

2.1 Hipocampo Derecho:

El promedio de la actividad enzimática en el hemisferio derecho fue de : $91,22 \pm 17,43$ mU GSHPx / mg proteínas; mientras que la actividad enzimática en el grupo experimental 24 horas hemisferio derecho fue: $102,94 \pm 15,89$ mU GSHPx / mg proteínas; Por su parte la actividad de la GSHPx en el grupo experimental 5 días hemisferio derecho fue: $114,04 \pm 27,80$ mU GSHPx / mg proteínas.). Es decir en el hipocampo derecho (estructura en la que se realiza la inyección de AMPA) muestra una tendencia a aumentar la actividad enzimática en el tiempo. (Ver Figura N° 9)

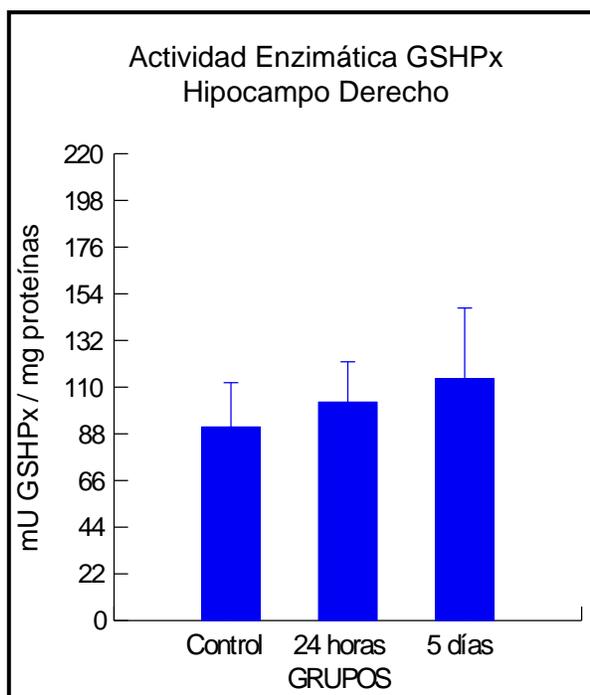


Figura N° 9. Actividad enzimática de GSHPx en hipocampo derecho en los grupos: CONTROL, EXP24 (experimental de 24 horas) y EXP5 (experimental de 5 días).

2.2 Hipocampo Izquierdo:

Por otra parte la actividad de la GSHPx en hipocampo izquierdo muestra un comportamiento similar a la actividad enzimática observada en las cortezas, esto es, se observa una tendencia a disminuir a las 24 horas y recuperarse a los 5 días (Ver Figura N° 10).

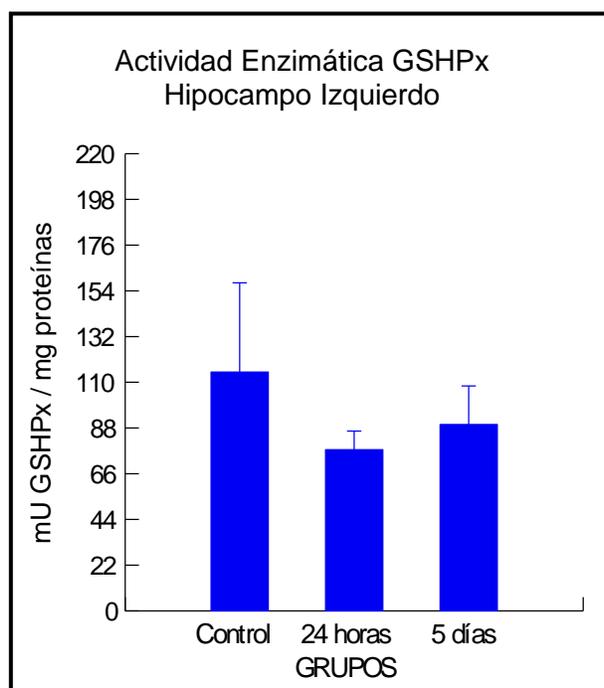


Figura N° 10. Actividad enzimática de GSHPx en hipocampo izquierdo en los grupos: CONTROL, EXP24 (experimental de 24 horas) y EXP5 (experimental de 5 días).

3. Amígdalas:

A nivel de las amígdalas la actividad enzimática promedio de la GSHPx en los gatos controles fue $53,03 \pm 3,17$ mU GSHPx / mg proteínas; en el grupo experimental 24 horas la actividad fue de $41,94 \pm 3,67$ mU GSHPx / mg proteínas; y en el grupo experimental de 5 días la

actividad alcanzó los $57,33 \pm 2,48$ mU GSHPx / mg proteínas. El comportamiento de las amígdalas es similar a las cortezas e hipocampo izquierdo mostrando disminución de los niveles a las 24 horas y tendencia a recuperar a los 5 días. (Ver Figura N° 11)

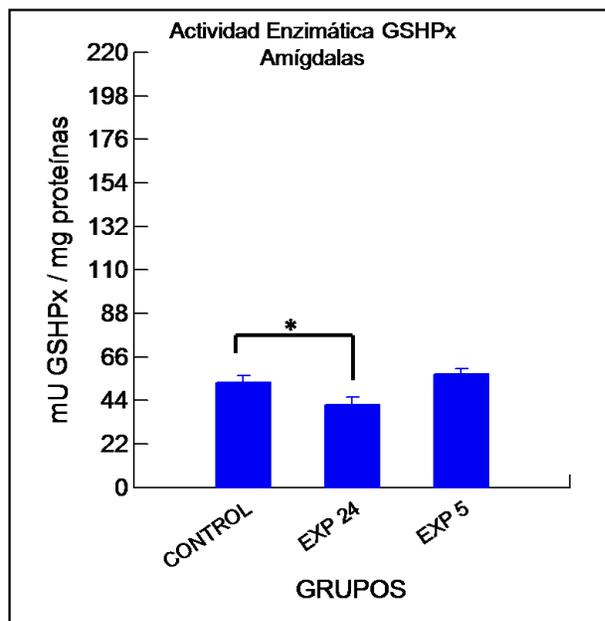


Figura N° 11. Actividad enzimática de GSHPx en amígdala en los grupos: CONTROL, EXP24 (experimental de 24 horas) y EXP5 (experimental de 5 días). ($p=0,059$ para CONTROL vs. EXP24; $*p=0,009$ para EXP24 vs. EXP5).

4. Comparación entre estructuras:

Al igual que en el grupo control (Figura N° 2), la corteza y el hipocampo presentan niveles de actividad de GSHPx mayores que amígdala, en los grupos experimentales de 24 horas y 5 días, también este resultado se observa tanto en el hemisferio derecho como en el izquierdo. ($p < 0,05$). (Ver Figuras N° 12 y 13)

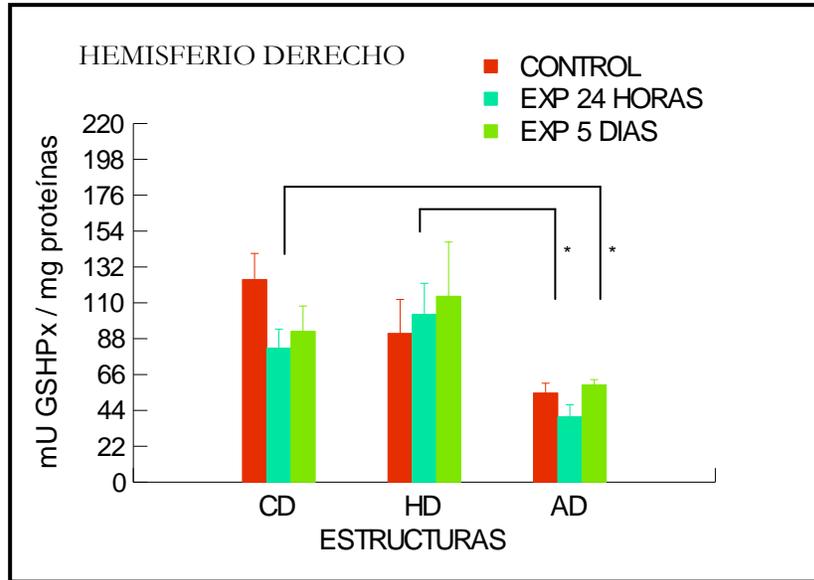


Figura N° 12. Niveles de GSHPx (glutación peroxidasa) en corteza, hipocampo y amígdala del hemisferio derecho, en el grupo control y los 2 grupos experimentales (* p < 0,05)

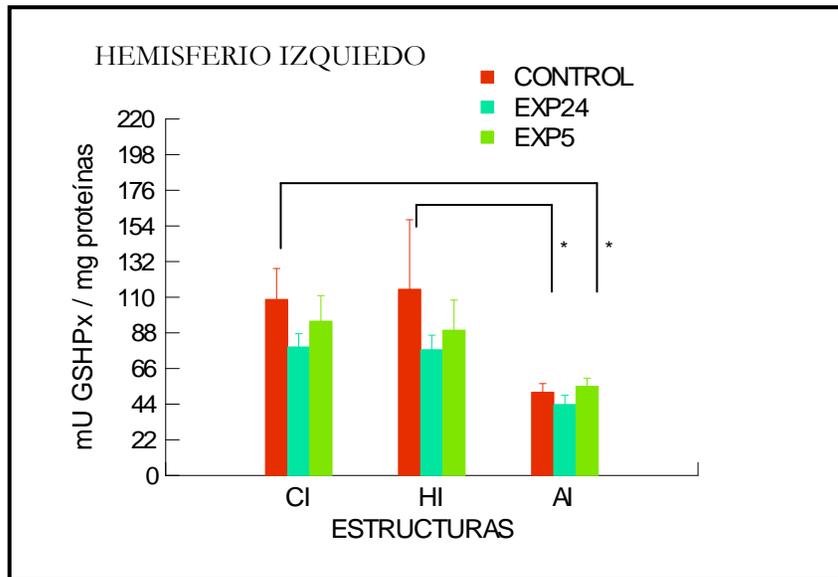


Figura N° 13. Niveles de GSHPx (glutación peroxidasa) en corteza, hipocampo y amígdala del hemisferio izquierdo, en el grupo control y los 2 grupos experimentales. (p < 0,05)

DISCUSION

Algunas neuronas se caracterizan por tener un bajo umbral para disparar potenciales de acción, estas se localizan principalmente en corteza cerebral, hipocampo y amígdala. Estas estructuras parecen ser particularmente sensible a la generación de epilepsia (Infante *et al*, 2002), en este estudio pudimos reafirmar esto, y además confirmar la capacidad epileptogénica de la inyección intracerebral del AMPA 40 mM, de generar focos epiléptico. Esta capacidad se manifestó por la generación de espigas y postdescargas que se originaron principalmente en hipocampo y amígdala cumpliendo con el primer objetivo de este estudio “Generar actividad epiléptica, inducida por administración de AMPA en hipocampo derecho”.

Dependiendo de la dosis utilizada es posible generar descargas epilépticas más bien restringidas, estudios previos muestran que AMPA tiene una capacidad mayor que otros agonistas de generar focos de epilepsia. Estos focos también se caracterizan por ser restringidos y no tienden a extenderse a corteza cerebral como lo hace el ácido kaínico (KA) (Motles *et al*, 2002). En este trabajo pudimos corroborarlo ya que como se mencionó, el foco epiléptico generado fue restringido centrándose principalmente en las estructuras subcorticales mencionadas con anterioridad (hipocampo y amígdala) y se extendió sólo en algunas ocasiones hacia la corteza cerebral cuando la intensidad de las postdescargas fueron mayores. En efecto, Liberona, utilizando el mismo modelo experimental de microinyección intracerebral de AMPA mostró que la actividad epiléptica desencadenada tuvo mayor intensidad en hipocampo y amígdala, siendo significativamente menor en corteza cerebral (Liberona, 2007). Hay autores que describen que AMPA parece ser un agente epileptogénico más poderoso que NMDA (N-metil-D-aspartato). Varios reportes coinciden con esto, por ejemplo hay autores que explican que los receptores AMPA parecen estar más involucrados en la epilepsia que los receptores NMDA. Este tipo de receptores parece estar involucrado en la iniciación y en la mantención

de los ataques epilépticos. (Katsumori *et al*, 1998). Otros estudios que involucran a los receptores AMPA y al NMDA en modelos crónicos de epilepsia del lóbulo temporal, muestra que los eventos excitatorios son regulados principalmente por receptores AMPA. (Motles *et al*, 2002)

En lo que respecta a los resultados conductuales se observó que a mayor compromiso electroencefalográfico mayor fue el compromiso conductual del animal, puesto que cuando las postdescargas comprometieron a hipocampo y amígdala las manifestaciones conductuales fueron principalmente de estados defensivos y agresivos como gruñidos, vocalización repetida, piloerección, taquipnea. Esto concuerda con numerosos estudios realizados con animales, que demuestran el papel fundamental de la amígdala en la adquisición y manifestación de respuestas a señales de peligro, un importante componente de la emoción de miedo. Por ejemplo se ha estudiado que las lesiones del núcleo central de la amígdala interfieren con el condicionamiento y manifestación conductual del miedo, (Aguado, 2002). Cuando en los EEGs se observó sólo espigas epilépticas aisladas, no se evidenció ninguna alteración de la conducta. En algunos casos en que las postdescargas llegaron a involucrar la corteza cerebral se pudieron observar además algunas manifestaciones motoras como temblor, giro de la cabeza, clonos leves del tronco y la cabeza, acompañados en algunos casos con anisocoria. Esto concuerda con otros estudios en los que se ha visto que el involucramiento de la corteza cerebral presenta los mismos síntomas como temblor de la cabeza, clonos de la musculatura facial y convulsiones discretas. (Infante *et al*, 2002). Este análisis cumple con una parte del segundo objetivo específico “Analizar los cambios conductuales asociados con la inducción epiléptica, en dos grupos experimentales de gatos, según protocolo establecido.”

Los registros encefalográficos muestran que las postdescargas generadas después de la inyección de AMPA se originaron principalmente en hipocampo. Tentativamente se puede proponer que la inyección de AMPA haya generado un trastorno irritativo local en el hipocampo derecho, el cual podría explicar este resultado, dado que inmediatamente después de la inyección de AMPA en el sitio de la inyección se observó una clara disminución de la amplitud del registro en el canal del hipocampo derecho, cabe destacar que esta irritación no produjo cambios permanentes, ya que el registro electroencefalográfico a las 24 horas, era distinguible del observado previo a la inyección, muestra que las alteraciones de éste, tienden a disminuir desde las 24 horas en adelante. Esto también sugiere que la aplicación directa de AMPA en el sitio de inyección no generó cambios en el tejido, tal como se demostró previamente en otros trabajos en los cuales se señala que el daño histológico que produce AMPA es mínimo (Motles *et al*, 2002), en comparación con los efectos devastadores del KA el cual produce un intenso daño en hipocampo con pérdida de células piramidales y neuronas granulares (Infante *et al* 2002). Puesto que el hipocampo tiene un bajo umbral epileptogénico y AMPA fue inyectado directamente en el hipocampo derecho, es plausible que la iniciación de postdescargas partiera en esta estructura.

Después de transcurridas 24 horas desde la inyección de AMPA las observaciones electroencefalográficas mostraron que las postdescargas disminuyeron y fueron reemplazadas por espigas, que en hipocampo y principalmente en el hipocampo derecho fueron más manifiestas. Por otro lado, en la corteza cerebral no se observó espigas después de las 24 horas, esto nos confirma que el foco epiléptico inducido fue restringido principalmente a las estructuras de más bajo umbral epileptogénico. Esto reafirma lo descrito en otros trabajos en que los focos epilépticos producidos en hipocampo se propagan rápidamente a la amígdala y el involucramiento de la corteza cerebral sólo ocurre ocasionalmente cuando la intensidad de la

postdescarga es incrementada en estas estructuras subcorticales. (Infante *et al*, 2002). También en estudios previos en el cual se utilizó en el mismo modelo experimental Díaz, 2005 y Liberona 2007 observaron que la máxima actividad epiléptica se produjo durante las primeras 2 horas después de la inyección de AMPA; a partir de entonces comenzó a disminuir en forma progresiva de tal forma que a las 24 horas y particularmente a los 5 días posteriores a la inyección sólo se detectaron algunas espigas en el electroencefalograma (Díaz, 2005; Liberona ,2007). Es decir que el fenómeno epiléptico generado fue disminuyendo notoriamente con el transcurso del tiempo, lo que nos indica que el cuadro además de restringido, se encontraba en extinción. Este análisis completa el segundo objetivo específico de este trabajo, “Analizar los cambios electroencefalográficos asociados con la inducción epiléptica, en dos grupos experimentales de gatos, según protocolo establecido.”

Cumpliendo con el tercer y cuarto objetivo de este estudio “Determinar la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en corteza cerebral, hipocampo y amígdala en un grupo control y dos grupos experimentales y comparar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa entre corteza cerebral, hipocampo y amígdala de gato”; se puede mencionar con respecto a los resultados en la actividad enzimática de la GSHPx, que las cortezas cerebrales y las amígdalas mostraron una disminución de la actividad enzimática ($p < 0,05$) a las 24 horas post-inyección de AMPA y una posterior recuperación hacia los niveles basales de actividad enzimática a los 5 días, por otro lado, el hipocampo izquierdo mostró una tendencia similar pero sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados nuevamente sugieren que para amígdala y corteza el proceso epiléptico después de las 24 horas estaba desapareciendo. Otros estudios en epilepsia experimental en ratas han mostrado una disminución del 30 % en la actividad de GSHPx en la corteza durante la crisis epiléptica. (Lores A et al, 1998). Por otro lado hay

estudios que han descrito que los niveles de la GSHPx después de la isquemia focal cortical en ratas, a las 72 horas (3 días) recién son suficientes para proteger al tejido contra el daño oxidorradicálico, ya que antes se encuentran disminuidos (Cisneros, et al, 1997). Esto nos puede indicar que la GSHPx disminuiría en los periodos inmediatos a los eventos epileptogénicos y que después de un tiempo recuperaría sus niveles concordando en parte con lo visto en este estudio. Otros autores han sugerido que el estrés oxidativo desempeña un papel en la lesión neuronal asociada a episodios convulsivos por epilepsia. Se considera que la GSHPx es fundamental para la defensa de las neuronas contra la formación de radicales de oxígeno y los procesos peroxidativos. Se ha observado una reducción del 30% en la actividad de la GSHPx en la corteza cerebral de ratas inyectadas con sustancias convulsionantes. (Gutierrez et al, 2005)

En contraposición, hay estudios en que las injurias que colocan a las neuronas bajo la acción del estrés oxidativo, pueden causar un incremento compensatorio en la expresión de la GSHPx. Por ejemplo en estudios en el cual midiendo la actividad de las enzimas de antioxidante, GSHPx, y CAT en el tejido cerebral cortical después de contusión cortical experimental. Se observó un aumento al doble de GSHPx. (Goss, et al 1997). Por otro lado en otro estudio en el que se ha visto que el stress por "*footsbock*" en la corteza prefrontal produjo aumentos en la actividad de la GSHPx a las 0, 15, 30 y 60 minutos después del stress. (Gonenc et al, 2000) Esto nos podría sugerir nuevos estudios en los que se tomen biopsias inmediatamente después de la generación del foco epiléptico, en este estudio no es posible corroborar este dato, dado que las muestras fueron tomadas 24 horas después de la inducción del foco epiléptico.

Otra observación interesante en este estudio fue que la única estructura que mostró un comportamiento en la actividad enzimática distinto al resto de las estructuras estudiadas, fue el

hipocampo derecho, en el cual se observó una tendencia a aumentar de actividad enzimática, esto podría deberse a que esta estructura tenía implantada una cánula y por lo tanto y por lo tanto haber generado algún daño. Sin embargo, el grupo control que también tenía implantada una cánula y no mostró ninguna alteración electroencefalográfica. Este resultado descarta la posibilidad que la tendencia a aumentar la actividad de la enzima pueda deberse a la lesión provocada por la cánula. Por otro lado en estudios previos en los cuales se midió la NOS (óxido nítrico sintasa) también relacionados a estrés oxidativo donde se utilizó el mismo modelo experimental de inducción del foco epiléptico, muestra que el daño estructural que provoca la cánula en el hipocampo y los electrodos en todas las estructuras es despreciable en cuanto a inducir diferencias en la actividad de la NOS (Liberona, 2007). Si podría explicarse dado que en estudios anteriores se ha observado que hipocampo es más sensible al AMPA que amígdala. (Motles *et al*, 2002) sumado a esto está la alta densidad de receptores AMPA descritos en el hipocampo (Babb *et al*, 1996). Además de lo anterior, y como se mencionó de manera tentativa en los resultados electroencefalográficos, el efecto irritativo local del AMPA en hipocampo derecho, que lo mantuvo mayor tiempo con espigas epilépticas, puede ser lo que explique la mayor permanencia de espigas epilépticas comparado con el resto de las estructuras estudiadas.

Por otro lado se ha descrito que el Óxido Nítrico (NO) inhibe la actividad de la GSHPX es así como Asahi, muestra que GSHPx es inactivada por NO, con una sensibilidad 5 veces más alta que GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Esta inactivación sería inducida por la unión directa de NO al residuo aminoacídico en la molécula. La inactivación de GSHPx fue reversible. Ya que GSHPX es una seleno-enzima en la cual la seleno-cisteína funciona como el centro catalítico de la reacción de peroxidación, por lo que el residuo de seleno-cisteína es un candidato para la modificación con NO. (Asahi, 1995). En el estudio previo realizado por

Liberona, quien midió la actividad de la NOS muestra que la actividad de esta enzima disminuyó significativamente en hipocampo y amígdala izquierda a las 24 horas y 5 días y en hipocampo derecho a los 5 días, sin embargo estos datos no nos reafirman que a este nivel de actividad epiléptica focalizada y restringida, el NO bloquee la acción de la GSHPx. Por otro lado el hecho que esta disminución de la actividad de la NOS persistiera a los 5 días no obstante que el fenómeno epiléptico se encuentre en extinción podría estar indicando que la NOS a diferencia de la GSHPx tendría una mayor sensibilidad que la GSHPx para detectar estrés oxidativo.

Otros autores relacionan la acción colectiva de Glucocorticoides (GCs) en el SNC es paradójica a niveles basales los GCs son esenciales para el desarrollo neuronal, la plasticidad y la sobrevivencia, mientras que un exceso de GCs o de stress puede generar atrofia de procesos dendríticos, inhibir neurogénesis y casos más extremo ser neurotóxicos. (Reagan *et al*, 1997). Los GCs disminuyen la actividad de la enzima GSHPx en el hipocampo, en vivo, después de la administración de un excitotóxico como es la inyección con KA. (McIntosh *et al*, 1998). En este caso al igual que el anterior no podemos corroborar esta información debido a que el fenómeno epiléptico de este estudio a diferencia de nuestro diseño experimental, corresponde a un modelo de epilepsia generalizado con convulsiones.

Un tema que no se puede dejar de lado es que la GSHPx es una enzima Se-dependiente y que utiliza también glutatión (GSH) como cofactor y que las variaciones de estos componentes son un factor que puede alterar su actividad. Por ejemplo Gutierrez *et al*, 2005 indica que la actividad de la GSHPx depende mucho del estado de selenio en el organismo. Por otro lado se ha visto que la actividad convulsiva en los pacientes epilépticos y en modelos experimentales de epilepsia influye sobre el metabolismo de algunos oligoelementos esenciales como el Zinc,

Hierro, Selenio, Cobre y Manganeseo en el cerebro y en tejidos periféricos. Sin embargo poco se sabe acerca de la relación entre la actividad epiléptica y los oligoelementos esenciales (Gutierrez *et al*, 2005).

Estudios realizados en ratas por Wilmore, 1981 y Hirate, 2002 para demostrar una alteración en el metabolismo del selenio en la génesis y el comportamiento de la epilepsia no son concluyentes. Sin embargo, permiten plantear la hipótesis de que una disminución en el aporte de selenio puede causar una disminución del contenido de GSHPx en el foco epileptogénico, con un consiguiente incremento de radicales libres, lo que a su vez, causaría degeneración neuronal a través de la peroxidación de los lípidos de membrana (Wilmore *et al*, 1981; Hirate *et al*, 2002).

La comparación de la actividad de la GSHPx con otra enzima antioxidante como la CAT, indican que la GSHPx es más prevalente en el cerebro que la CAT (Puttfracken *et al*, 1993) y que tiene mayor afinidad al peróxido de hidrógeno que la CAT (Izawa *et al*, 1996), pero se satura más rápido. Esta alta afinidad/baja capacidad de la GSHPx probablemente se refleja por su exigencia del GSH como un cofactor. (Wang 2003).

Finalmente a modo de resumen, en este estudios pudimos observar que los cambios electroencefalográficos inducidos por AMPA generaron un proceso epiléptico transiente con la aparición inicial en las primeras 24 horas de postdescargas y espigas epilépticas; estas modificaciones electroencefalográficas se hicieron menos frecuentes con el paso de los días y a los 5 días el fenómeno epiléptico estaba en extinción. Por su parte la actividad de la enzima GSHPx mostró tendencia a disminuir a las 24 horas para volver a los 5 días a los niveles de actividad observados en los animales controles.

La tendencia a la caída en la actividad enzimática de la GSHPx observada a las 24 horas podría ser el efecto de rebote frente a un probable aumento de la actividad de la enzima en las

primeras horas después de la inyección de AMPA. Esta interpretación es coherente con los resultados electroencefalográficos obtenidos en las primeras dos horas post inyección en donde se observaron patrones de descarga epiléptica y luego la desaparición de estas descargas a los 5 días post inducción de la epilepsia. La normalización de la actividad electroencefalográfica a los 5 días, descrita en esta memoria, es claramente coincidente con la normalización en ese momento con la actividad enzimática de la GSHPx.

No podemos descartar que puedan existir otros factores que modifiquen la actividad de la enzima por lo que se necesitan de más estudios que puedan ayudar a definir la fisiopatología de estos mecanismos como podrían ser estudios complementarios de los niveles de Se, GCs, GSH. Además de la determinación de la actividad enzimática de la GSHPx en los primeros momentos después de la inducción de la epilepsia.

CONCLUSIONES

1. La administración de AMPA 40 mM en hipocampo derecho generó actividad epiléptica, la cual fue focalizada y restringida.
2. Los cambios conductuales observado en los animales fueron coincidentes con el análisis electroencefalográfico de las estructuras subcorticales.
3. Al electroencefalógrafo se observaron cambios coincidentes con un foco epiléptico con postdescargas o espigas, las que fueron más manifiestas las primeras horas post-inyección de AMPA y que a partir de las 24 horas solo se tradujeron en espigas en las estructuras subcorticales y no en corteza.
4. La actividad enzimática de la GSHPx en cortezas cerebrales, amígdalas e hipocampo izquierdo mostraron una disminución a las 24 horas con una recuperación a los 5 días a los niveles basales, lo que coincide con lo observado en el electroencefalograma.
5. Al comparar la actividad de la enzima GSHPx tanto en la condición basal como experimental, entre corteza cerebral, hipocampo y amígdala se observó que la amígdala fue la estructura que siempre presentó menor actividad de la enzima.
6. Los resultados sugieren una participación de enzimática de la GSHPx en las etapas iniciales del proceso epiléptico, en la condición de epilepsia localizada.

BIBLIOGRAFIA

Aguado, L. 2002 Procesos cognitivos y sistemas cerebrales de la emoción. Rev. de Neurol. 34: 1161-1170.

Armijo, J.A.; Valdizán, E.M.; de las Cuevas, I.; Cuadrado, A. 2002. Avances en la fisiopatología de la epileptogénesis: aspectos moleculares. Rev. de Neurol. 34: 409-429.

Asahi, M.; Fujii, J; Suzuki, K.; Geuk Seo, H.; Kuzuya, T.; Hori, M.; Tada, M.; Fujii, S.; Taniguchi, N. 1995 Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide J. Biol. Chem. 270: 21035–21039.

Babb, T; Mathern, G; Leite, J; Pretorius, J; Yeoman, K; Kuhlman, P. 1996 Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainite rat hippocampal epilepsy. Epilepsy Res. 26: 193-205.

Cisneros, E. 1997. Enzimas que participant como barreras fisiológicas para eliminar los radicals libres: Glutación peroxidasa. Rev Cubana Invest Biomed 16: 10 - 15

Cudkowicz, M.E.; Pastusza, K.A.; Mathews, R.K.; Pasinelli, P.; Jiang, D.; Brown, R.H. 2002. Survival in transgenic ALS mice does not vary with CNS glutathione peroxidase activity. Neurol. 59: 729-734.

de Cabo, C; Villanueva, P; Prieto, A. 2006. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. Rev. de Neurol. 42: 159-168

de Haan, JB.; Cristiano, F.; Iannello, RC.; Kola, I 1995. Cu/Zn- superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. Biochem. Mol. Biol. Int. 35: 1281-1297.

Del Maestro, R. F. and McDonald, W. 1985. Oxidative enzymes in tissue homogenates. In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research . ed. R. A. Greenwald, Florida: Boca Raton. pp. 294–295.

Díaz M. 2005 Comparación de la cantidad de isoformas de óxido nítrico sintaza en hipocampo, amígdala y corteza cerebral de gatos sometidos a una condición experimental de epilepsia. Memoria de título para optar al título de Médico veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de ciencias Veterinarias. Universidad de Chile.

Flohé, L.; Günzler, W. A.. 1984. Assay of glutathione peroxidase. Methods enzymol. 105: 114-121

Gönenc, S; Acikgöz, O; Kayatekin, B; Uysal, N; Akhisaroglu, M. 2000 Effect of footshock stress on superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities and thiobarbituric acid reactive substance levels in the rat prefrontal cortex and striatum. Neurosci. Lett. 289: 107-110.

González, M. E.; Castellano, O.; González-Hoyuela, M.1999. Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. Rev. de Neurol. 28: 504-511.

González, M. E.; Robinson, M. A.; Delgado, R. 2000. Estudio de indicadores de estrés oxidativo en monos viejos. Rev. de Neurol. 31: 1012-1015.

Goss, J; Taffe, K; Kochanek, P; DeKosky, S. 1997 The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. Exp. Neurol Jul; 146: 291-294.

Gunzler, W. A. and Flohe, L. 1985. Glutathione peroxidase. In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research . ed. R. A. Greenwald, Boca Raton, Florida pp. 285–290.

Gutiérrez, A; Moreno, C; González R. 2005 Alteración de la concentración de selenio en la epilepsia. Rev. de Neurol. 40: 111- 116.

Hirate M, Takeda A, Tamano H, Enomoto S, Oku N. 2002 Distribution of trace elements in the brain of EL (epilepsy) mice. Epilepsy Res; 51: 109-116.

Hussain, S.; Slikker, W.; Ali, S.F. 1995. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. Int. J. Dev Neurosci. 13:811-817.

Infante, C, Cartier, L; Motles, E. 2002 Comparative study of the epileptogenic effect of kainic acid injected into the cerebral cortex, hippocampus and amígdala in adult cats chronically implanted. Archives Italiennes de Biologie, 140: 31-40.

Izawa, S; Inoue, Y; Kimura, A. 1996 Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide : analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 320: 61-67.

Jiang, D.; Akopian, G.; Ho, Y.; Walsh, J.; Andersen, J. 2000 Chronic brain oxidation in a Glutathione Peroxidase knockout mouse model results in increased resistance to induced epileptic seizures. Exp. Neurol. 164: 257-268.

Katsumori, H; Minabe, Y; Osawa, M; Ashby CR Jr. 1998 Acute effects of various GABA receptor agonists and glutamate antagonists on focal hippocampal seizures in freely moving rats elicited by low-frequency stimulation. Synapse. 28:103-109.

Liberona, M. 2007 Efecto de la generación de un foco epiléptico por AMPA sobre la actividad Oxido 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.

Lores Arnais, S; Travasio, M; Llesuy, S; Rodriguez de Lores Arnais, G. 1998 Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. Neurochem Res. 23: 1477-1483.

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.

McIntosh, L; Cortopassi, K; Sapolsky, R. 1998 Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain Res.* 791: 215-222

Martinez, C; Pita, E; Sanchez, Y, Rodriguez, C. M; Agil, A. 2004. Peroxidación lipídica en pacientes epilépticos adultos tratados con ácido valproico. *Rev. de Neurol.* 38: 101-106.

Motles, E. 1993. Epilepsia y Estados convulsivos. **En:** 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

Puttfarcken, P; Getz, R; Coyle, J. 1993 Kainic-acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluene and U78517F in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res.* 624: 223-232.

Reagen, L; McEwen, B. 1997 Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* 13:149-167.

Reinoso-Suárez, F. 1961. Topographische Hirnatlas der Katze. Darmstadt, Merck.

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. Universidad de Chile, Facultad de Medicina. Laboratorio de Fisiopatología Renal, ICBM. 1-35p.

Schwindt y Crill. 1980. Role of a persistent inward current in motor neuron bursting during spinal seizures. J. Neurophysiol. 43: 1296-1318.

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: 1527 - 1534

Wilmore L, Rubin J. 1981 Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. Neurology 31: 63-69.

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