

1993 - A

Reg. No. 085370596

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Manipulación de la Barrera Hemato-Encefálica
para la Implementación de Modelos Alternativos
de Inducción de Crisis Convulsivas**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Biología

P R E S E N T A :

Arturo Carlos II Becerra Bracho

Guadalajara, Jalisco, Junio de 1993

A MI FAMILIA

Lo más valioso que tengo en esta vida.

A MIS AMIGOS

Todos aquellos que me consideran como tal.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroquímica del area de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara, Bajo la dirección del M. en C. Alberto Morales Villagran y la asesoría del M. en C. Carlos Beas Zarate.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y METODOS	28
RESULTADOS	36
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	46
RELACION DE FIGURAS	54

A B R E V I A T U R A S

BHE	Barrera Hemato-Encefálica
Ca ⁺⁺	Ión Calcio
EEM	Error Estandar de la Media
GABA-[³ H]	Ácido Gama-Amino Butírico marcado con tritio.
GMS	Glutamato Monosódico
IMB	Iodo Metil Bicuculina
I.P.	Intraperitoneal
K ⁺	Ión Potasio
L-GMS	L-Glutamato Monosódico
M	Molar
μl	Microlitros
N	Normal
SENaCl	Solución equimolar de NaCl a la de Glutamato Monosodico de 5 mg/g.
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SSF	Solución Salina Fisiológica

I N T R O D U C C I O N

1. GENERALIDADES

La actividad del sistema nervioso central (SNC) ha despertado gran interés en el estudio científico y debido a la complejidad de las funciones, elementos y mecanismos que lo conforman, ha obligado a implementar diversos tipos de herramientas que auxilian a los diferentes grupos de investigadores a responder las interrogantes acerca del sistema nervioso.

El sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos del medio externo e interno (López Antúnez, 1983). El sistema nervioso regula e integra el resto de los sistemas del organismo y es el responsable del desarrollo y cualidades intelectuales del ser humano (Barr, 1979). Comúnmente se divide en sistema nervioso central, sistema nervioso periférico (SNP), y sistema nervioso autónomo (SNA); el SNC esta constituido por el encéfalo que se encuentra contenido en el cráneo y la médula espinal alojada en el conducto raquídeo los cuales en conjunto representan el nivel integrativo, el SNP comprende los nervios craneales y espinales mientras que el SNA o neurovegetativo se encuentra parcialmente localizado en el SNC y SNP, se subdivide en parasimpático y simpático e interviene en la regulación en la actividad de las vísceras (López Antúnez, 1983).

La epilepsia es una afección crónica de etiología diversa caracterizada por crisis recurrentes, debidas a que en el SNC se generan descargas excesivas de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con

manifestaciones clínicas y paraclínicas. El estudio de la epilepsia depende en su mayoría de los modelos en animales que hasta el momento se han desarrollado acerca de esta patología. De tal manera que se han implementado diversos modelos o procedimientos experimentales que buscan reproducir las características más importantes que se asocian a un tipo particular de crisis convulsivas, generalmente de tipo epiléptico. Se ha generado gran cantidad de información tanto directa como indirecta acerca de los procesos que ocurren en el SNC, superando al trabajar con animales, la limitante natural y ética de estudiar los procesos epilépticos en humanos (Robert S., 1989; Purpura y col., 1972).

Muchas especies de animales desarrollan crisis espontáneas (Loscher y Schmidt, 1988) sin embargo estos casos son esporádicos y poco usuales para la experimentación. El gran número de modelos deriva de que ninguno de los existentes es lo suficientemente confiable en la reproducción de la epilepsia clínica.

Existen muchos modelos de crisis convulsivas que de epilepsia, considerando la crisis epiléptica como crónica recurrente y espontánea. Por lo que en lugar de usar el título de "modelo animal de epilepsia" debería utilizarse el término "modelo animal de crisis de desorden neuronal" ya que este define con mayor precisión a los modelos existentes (Robert S., 1989).

Los modelos epilépticos en animales son agrupados, conforme el tipo de convulsión que presentan, en la actualidad se encuentran al menos seis tipos:

- Convulsión parcial simple.

En esta categoría los modelos son análogos en la producción de descargas a las heridas corticales agudas. Estas crisis ocurren en los abscesos intracraneales, traumas o hematomas. En heridas clínicas como éstas se han presentado crisis crónico-recurrentes, aparentemente espontáneas.

Estos modelos de este tipo de convulsión se obtienen con la aplicación tópica de convulsionantes tales como Penicilina, bicuculina; así como por estimulación eléctrica aguda.

1.1 Convulsionantes tópicos

Penicilina focal. El método más popular para el estudio de crisis simple parcial ha sido por aplicación tópica de este convulsionante. Este antibiótico común fue descubierto como convulsionante tópico, durante una neurocirugía donde se decidió aplicar penicilina al cerebro para prevenir una infección (Prince D.A., 1968). El modelo de aplicación tópica de penicilina ha sido uno de los modelos más importantes para investigar las preguntas existentes sobre la epilepsia y sus bases neuronales. (Robert S., 1989).

Convulsionantes químicos focales. Diversas drogas han sido utilizadas para la producción de focos agudos incluyendo bicuculina, Picrotoxina, Estrignina, drogas Colinérgicas y nicolinérgicas (Cavalheiro, 1982). El primero de estos tres, junto con la penicilina, antagonizan la acción inhibitoria del neurotransmisor GABA. Esto ha contribuido a que la epilepsia se vea como un resultado de la desinhibición. (Robert S., 1989)

1.2 Estimulación eléctrica aguda.

Otro modelo común para la producción de crisis simple parcial, es por medio de la estimulación eléctrica directa del tejido cortical. Tal y como lo observó décadas atrás Adrian, E.E., (1936), de tal manera que pulsos eléctricos repetitivos pueden inducir descargas agudas que persisten por algunos segundos o minutos después de la estimulación eléctrica.

2.- Convulsión crónica parcial simple.

Se genera con implantación cortical de metales tales como Cobalto, Tungsteno, Zinc, Hierro, e Hidróxido de aluminio, así como la inyección de anticuerpos ganglionares.

2.1 Implantación cortical de metales.

Hidróxido de aluminio. Los modelos de epilepsia más comunes son producidos por la implantación de metales en el cerebro, ya que generan crisis simples parciales, espontáneamente recurrentes. El prototipo de este grupo de modelos, es el modelo de gel de hidróxido de aluminio descubierto por Kopeloffs, (1955), y elaborado por investigadores de la Universidad de Washington, bajo la dirección de Arthur Ward. Una preparación típica de 4% de hidróxido de aluminio es inyectada dentro de la neocorteza de monos, junto con pocos sitios adyacentes. Un modelo similar puede producirse en gatos. (Feria-Velasco y col., 1980). Las crisis recurrentes espontáneas y generalizadas surgen uno o dos meses después de la inyección y persisten a lo largo de algunos años.

2.2 Otros metales: Cobalto, Tungsteno, Zinc, y Acero.

Implantaciones corticales de otros metales, tales como el Cobalto, Tungsteno y Zinc (Dow y Fernandez-Guardiola, 1962; Pei y col., 1983), pueden producir modelos crónicos o subagudos de crisis recurrentes en animales. Ninguno de estos modelos está documentado tan extensivamente como el modelo de aluminio en monos. Sin embargo, los receptores de GABA se encuentran en menor cantidad en la región del foco producido por Cobalto en la corteza motora de la rata, dos o tres semanas después del establecimiento del mismo (Pitkanen, 1987).

Acero y otras formas de hierro o sulfatos férricos pueden también inducir crisis recurrentes cuando son inyectados dentro de la corteza de mamíferos (Lange y col., 1980; Levitt, 1981).

2.3 Heridas criogénicas.

Uno de los modelos que no requiere de la inyección de drogas exógenas dentro del cerebro es el modelo de congelación o lesión criogénica, el cual produce crisis crónicas simples parciales (Hanna G.R., 1973; Loiseau H., 1987). Lesiones con cloruro de etilo o trauma frío por nitrógeno líquido, producen fuertes daños epileptogénicos, las crisis aparecen en pocas horas y persisten por algunos días.

2.4 Inyección de anticuerpos ganglionares.

Karpiak y col., (1976), produjeron crisis por una inyección de anticuerpos ganglionares del cerebro dentro de la corteza de la rata, después de 24 hrs. de la inyección

aparecen espigas en la misma región, las descargas EEG se vuelven más generalizadas y más repetidas después de noventa días de la primera inyección. Difícilmente se encuentran manifestaciones clínicas en los animales bajo este modelo.

3.- Crisis tónico-clónicas generalizadas.

Este tipo de convulsiones pueden ser inducidas bajo tres lineamientos: a) GENÉTICAMENTE; "Babuino" (Papio papio) fotosensible, convulsiones audiogénicas en ratones (Mus musculus), ratas (Ratus noruegicus) genéticamente predispuestas, Gerbil mongoliano (Meriones unquiculatus) y Drosófila (Drosophila melanogaster. b) CONVULSIONANTES QUIMICOS; Pentilentetrazol, Picrotoxina, Bicuculina, Penicilina y otros. c) DESARREGLO METABÓLICO; Hipoxia, Hipoglucemia, Uremia, altas temperaturas, etc.

3.1 Genéticamente.

Este tipo de modelo en animales no es el más adecuado para el estudio de las convulsiones primarias generalizadas, espontáneas, recurrentes y tónico-clónicas (gran mal). Porque ideopáticamente el gran mal se observa sólo en componentes genéticos, varios investigadores han intentado desarrollar modelos de aberrantes genéticos de mamíferos; incluyendo Babun (Papio papio), Gerbil mongoliano, ratones, ratas, y hasta Drosófila (Drosophila melanogaster). Cada uno de estos modelos tiene diferencias importantes con relación al gran mal clínico.

3.1.1 Babuino fotosensible. Este modelo desafortunadamente es muy caro y difícil de mantener. En 1966 Killam y colaboradores (Killam y col., 1967) descubrieron que el Babuino

de Senegal podría sufrir convulsiones generalizadas tónico clónicas en respuesta a la estimulación intermitente de luz (EIL) a una frecuencia de 25 destellos por segundo. El modelo del Papio papio fue descrito en detalle por Naquet y Meldrum (1972). Las primeras EIL producen parpadeos y luego algunos clonos en el cuerpo y en la cara, los espasmos tónicos o las convulsiones tonico-clónicas. pueden seguir y persistir después de terminados los destellos lumínicos.

3.1.2 Convulsiones audiogénicas en ratones. Algunos laboratorios han logrado desarrollar cepas puras de ratones con fenotipos específicos de respuesta al sonido. Existen doce tipos de cepas de ratones que presentan convulsiones espontáneas y cinco que desarrollan convulsiones evocadas por estimulación sensorial. El modelo de epilepsia generalizada más popular en roedores, es el de ratones con crisis convulsivas, inducidas por estimulación auditiva.

3.1.3 Ratas genéticamente predisuestas. Conductual y electrofisiológicamente la rata es más familiar que el ratón como animal de laboratorio, y afortunadamente las ratas también exhiben crisis convulsivas lo que permite trabajarlas como modelo epiléptico. Existe un número considerable de cepas de ratas genéticamente predisuestas a sufrir crisis convulsivas, y que son susceptibles a las convulsiones inducidas por sonido, altas temperaturas, y estimulación eléctrica o química, este grupo de cepas ha sido extensivamente estudiado en el colegio de medicina de la Universidad de Illinois por Job Dailey, Laird y col., (1986).

3.1.4 Gerbil mongoliano. Otro de los modelos en roedores que desarrollan convulsiones es ejemplificado por el Gerbil

mongoliano. El Gerbil exhibe convulsiones generalizadas tónico-clónicas, en un ambiente de estrés, generado por simple manipulación o agitación del animal. Este modelo tiene especial aplicación y demanda en la prueba de fármacos anticonvulsionantes, desafortunadamente en la revisión hecha por Makaskui y caplan, (1983), la utilidad del modelo del Gerbil es limitada por la variabilidad del umbral de crisis y el período de las convulsiones.

3.2 Convulsionantes químicos.

Numerosos compuestos químicos pueden producir convulsiones generalizadas, cuando se administran sistémicamente. Sin embargo no todos son de interés para el estudio de la epilepsia (Robert S, 1989). Generalmente, los compuestos más utilizados bajo este mecanismo, son: Pentilentetrazol, picotroxina, bicuculina, metionina y penicilina.

El pentilentetrazol es el agente prototipo como convulsionante sistémico, el cual es un derivado del tetrazol. El pentilentetrazol produce actividad convulsiva en ratones, ratas, gatos y primates, generando mioclonos, seguidos por convulsiones tónico clónicas generalizadas.

La aplicación sistémica de la penicilina es un modelo tónico-clónico, sin embargo se ha utilizado como un agente productor de convulsiones focales agudas en la corteza. Los datos clínicos indican que las altas dosis sistémicas en humanos, pueden producir mioclonos, convulsiones tónico clónicas generalizadas y cefalopatías (Robert S., 1989). Existen otros convulsionantes sistémicos de uso frecuente,

tales como picrotoxina, estriocnina, bicuculina, metionina, sulfoximina y algunos anestésicos generales, sin embargo el uso de estos convulsionantes como modelos depende principalmente del tipo de investigación a realizar (Gulati y col., 1985; Hahn F., 1960).

3.3 Desarreglo metabólico.

Ocasionalmente en practicas clinicas, donde se ha generado un desorden metabólico, se han presentado crisis convulsivas, esto ha planteado la posibilidad de desarrollar modelos convulsivos a partir de desarreglos metabólicos, donde la hipoxia, hipoglucemia, uremia y altas temperaturas son las principales alteraciones generadas, para el uso de estos modelos.

4.- Convulsiones parciales complejas.

La separación de los modelos de convulsiones parcial simple y simple parcial compleja es totalmente artificial, ya que las diferencias de los modelos radican sobre el lugar del cerebro en donde se aplica el fármaco, más que sobre diferencias intrínsecas del modelo. este tipo de convulsiones se obtiene con el uso de fármacos tales como: ácido kainico y toxina tetánica, por inyección en el área Tempestas, o por estimulación eléctrica (Kindling) (Robert S., 1989).

El ácido Kainico es uno de los convulsionantes más utilizados para la producción de convulsiones parciales complejas. El ácido kainico es un análogo del glutamato el cual es neurotransmisor excitatorio, el interés en el uso de este fármaco radica en su capacidad selectiva de lesión en

células del cerebro (Coyle j. y col., 1978). El modelo recurrente de convulsiones parciales complejas puede producirse por la inyección de toxina tetánica en el hipocampo de ratas o gatos (Mellanby y col., 1984). El carácter de convulsión parcial compleja resulta de la localización de la inyección, usualmente en estructuras límbicas. El ácido kaínico y la toxina tetánica, tanto como bicuculina, carbacol, glutamato, aspartato y N-metil-D-aspartato producen convulsiones parciales complejas cuando son aplicados por inyección en el area tempestas.

Otro método para la provocación de este tipo de convulsión, es la estimulación eléctrica denominada "Kindling", la cual se produce por la repetición de descargas eléctricas en alguna de varias partes del cerebro, y que genera excitabilidad eléctrica en el mismo, este efecto fue descubierto por Delgado y col. (1958), y posteriormente fue establecida la metodología por Goddard en (1967).

5.- Ausencia generalizada.

La ausencia clínica es caracterizada por la pérdida parcial o completa de la conciencia. Este fenómeno es de difícil identificación y es observado solamente por EEG. No existen modelos de animales con estas condiciones exactas, sin embargo existen algunos modelos aproximados que se consiguen con la estimulación Talámica, y el uso de Penicilina sistémica, o la aplicación de Hidroxibutirato, así como modelos genéticos de roedores.

6. Status epilepticus.

Muchos convulsionantes químicos pueden producir el status cuando son aplicados en grandes cantidades en roedores, ejemplos de estos convulsionantes lo son : el ácido kainico, NMDA, bicuculina y pentilentetrazol. Sin embargo la alta administración del fármaco generalmente desencadena una muerte rápida en el animal. La estimulación recurrente y aplicación tópica de cobalto y ácido homocisteico sistémicamente son otros métodos utilizados para la generación de este tipo de crisis (Purpura D.P., 1972).

La utilización de modelos epileptiformes presenta tres aplicaciones fundamentales:

a).- El ensayo de drogas anticonvulsionantes que pudieran tener una acción efectiva en la terapéutica de las crisis convulsivas en humanos.

b).- El estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación y autosupresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsionantes.

c).- El estudio de los mecanismos neuronales que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad del SNC y de la actividad motora (Solis y Arauz., 1986).

2. BARRERA HEMATOENCEFALICA

El fenómeno de barrera hematoencefálica sucede cuando una sustancia que se encuentra en la sangre pasa del espacio centrovascular al parénquima cerebral a una velocidad considerablemente menor del tiempo que aquella que pasa de la sangre al espacio perivascular de otras regiones del cuerpo. Esto es en igualdad de condiciones de ionización a pH fisiológico, y una concentración plasmática normal (Feria y Tapia, 1986)

Las células endoteliales que conforman a los capilares en el cerebro presentan el fenómeno de BHE y se caracterizan por la presencia de uniones estrechas que impiden el paso de sustancias con un peso molecular mayor a 40,000 daltones (M). Los capilares de dicha zona son de tipo no fenestrado por tal motivo los sistemas de poros son notablemente diferentes a otros tejidos endoteliales (Nilton W., 1991).

Los capilares cerebrales se encuentran incompletamente rodeados por pericitos envueltos en material de membrana basal. Inmediatamente por fuera de este complejo se encuentran de manera continua prolongaciones y expansiones citoplasmáticas de astrocitos (fig. 1), que como terminales perivasculares se ponen en evidencia mediante el empleo de impregnaciones metálicas (Feria y Tapia, 1986).

La manipulación del fenómeno de BHE ha permitido su estudio, además de favorecer la disminución y especificación del trabajo vesicular en las células endoteliales, la importancia en el fenómeno de BHE radica en el tejido endotelial y sus uniones estrechas. Algunos daños pequeños por manipulación pueden afectar las células endoteliales del

intersticial. Sin embargo la mayoría de las moléculas no pueden pasar directamente por la membrana semipermeable, sólo dos mecanismos pueden permitir el acceso: formación de túbulos vesiculares, y la apertura de las uniones estrechas (Brightman M.W., 1967), el incremento en el número de poros endoteliales y vesículas, induce hipertensión y exposición hiperosmótica (Nilton W., 1991)

El estudio de la BHE se basa en modelos de animales con apertura de la BHE. En datos preliminares para el estudio de la selección de cierto agente anestésico en ratas, se comprobó que el agente afecta la BHE. Dichos estudios se realizaron bajo el seguimiento de un colorante (azul de Evans.), esto generó un estudio seguro de la apertura de la BHE (Purpura D.P., 1972). Sin embargo existen ciertos factores que afectan la apertura de la BHE ya que se ha comprobado que tanto anestésicos, sexo, presión atmosférica, hora del día, ciclos hormonales, y hemoconcentración varían considerablemente los resultados de la apertura (Edward A. y col., 1991).

A N T E C E D E N T E S

MANIPULACION DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFALICA

En la década de los setentas, existía el concepto popular de que en neuro-oncología el papel de la BHE era irrelevante, ya que en tumores malignos también se encontraba afectada y no presentaba un eficiente fenómeno de barrera, sin embargo hay pruebas de que esto no es totalmente correcto (Vick y Bigner., 1977). No es claro que tan intacta permanece la BHE en tumores cerebrales, al parecer existen varios grados de afectación en la misma dentro de tumores en el SNC (Bergstrom, 1983; Groothuis y col., 1982 y 1984). Esto fue un apoyo para explicar las observaciones de vesículas dentro de tumores cerebrales que presentaban fenestraciones y tejido endotelial discontinuo. Las alteraciones vasculares ayudaron a explicar que la peroxidasa de raíz fuerte penetraba en tumores experimentales, lo que sugirió que el papel de la BHE era mucho más complejo de lo que se esperaba (Brightman M.W., 1977), lo que generó una búsqueda de modelos para estudio de la BHE, retomando técnicas de apertura de la BHE diseñadas años atrás.

Desde la década de los cuarenta Broman y Olsson, (1991) reportaron modelos de animales con una apertura de BHE por diferencias osmóticas. La técnica para ratas inicialmente descrita por Rapoport fue extensivamente estudiada y usada en numerosos experimentos relacionados con la BHE. Actualmente existen considerables mejoras a las técnicas reportadas por Rapoport donde se utiliza, como sustancia hipertónica, una solución de manitol infundida a través de la arteria carótida (Gulati y col.,1985). La mayoría de animales en estos experimentos, han sido caninos, sin embargo, no deja de ser un proceso algo caro y difícil ya que la carótida de los caninos es muy pequeña y la incorporación de la cánula

es por medio de fluoroscopia.

Se han desarrollado técnicas de apertura de BHE a través de la fosa posterior en perros, sin embargo este procedimiento no ha sido totalmente descrito. Existen técnicas que utilizan sistemas intrarteriales transfemorales con agentes de infusión dentro de la arteria vertebral. La mayoría de estos procedimientos conllevan métodos de perfusión lo que complica dichas técnicas ya que en consecuencia los caninos son ocasionalmente sobreperfundidos resultando una excesiva apertura de la BHE. El modelo de transmisión reversible de apertura de BHE por procesos osmóticos en la fosa posterior en perros resultó de una experiencia clínica fortuita, durante una infusión de manitol vía arteria carótida generando la apertura de la BHE. Por otro lado, la infusión de manitol dentro de la arteria vertebral es crítica, ya que un incremento en la infusión resulta en anomalías fisiológicas significativas (Nilton W., 1991; Gulati y col., 1985).

Estudios realizados en el laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas, sugieren que una solución hipertónica de NaCl tienen un papel importante en procesos de liberación de neurotransmisores, en sustancia nigra y un efecto considerable sobre la BHE. En el trabajo titulado "Liberación de (3H)-gaba en la sustancia nigra de rata bajo efecto del l-glutamato monosódico (GMS)." (datos no publicados) se encontró que la disminución en la liberación de gaba-(3H) era significativa tanto para el GMS como para la solución equimolar de cloruro de sodio. Por otro lado en estudios preliminares a este trabajo de tesis sobre la acción del GMS en la BHE, se encontró que una dosis de solución equimolar junto con una dosis menor de glutamato produce el mismo efecto

convulsivo, que el GMS. Estos estudios llevaron a la conclusión de que el GMS pasa la BHE por efecto de la alta presión osmótica que genera.

P L A N T E A M I E N T O
D E L
P R O B L E M A

La epilepsia es sin duda uno de los grandes problemas de salud para la humanidad y en particular de nuestra sociedad (750,000 casos en 1985 para nuestro país), tanto por su alta prevalencia e incidencia, como por sus consecuencias médicas y sociales. El enfermo epiléptico sigue siendo hasta la fecha objeto de discriminación en nuestra sociedad. Motivos suficientes para que esta patología sea estudiada a conciencia.

El estudio de la Epilepsia depende actualmente de el uso de modelos experimentales, mucho del conocimiento actual sobre la epilepsia se deriva directa o indirectamente de los modelos experimentales en animales. Actualmente existen alrededor de seis grupos de modelos epilépticos provocados por 47 métodos o sustancias convulsionantes diversas (Robert S., 1989).

La inducción del proceso epiléptico por aplicación tópica de sustancias irritantes, tiene como objetivo alterar una zona restringida del tejido nervioso, así como encontrar características irritantes y propiedades convulsivas de sustancias que no pasan BHE. Una desventaja que tienen los modelos experimentales epileptiformes en los cuales se emplea un agente irritante en forma aguda, es la limitación del análisis de la conducta del animal debido a las restricciones experimentales, por otro lado los animales utilizados son anestesiados e inmovilizados y requieren de cuidados especiales, como la constante vigilancia de la presión arterial y la temperatura.

En 1945, Walker y Johnson, (1972), fueron los primeros en comunicar los efectos convulsionantes de la penicilina el cual es un importante productor de crisis y que es utilizado por aplicación tópica, ya que este fármaco no pasa la BHE. En

1942, Kopeloff y sus colaboradores, (1955), describieron el uso de crema de alúmina como modelo experimental epileptiforme por aplicación tópica. En 1960 él mismo utilizó el cobalto con aplicación local en la corteza cerebral. Posteriormente se han agregado un grupo de fármacos con propiedades convulsivas pero que no pasan la BHE.

Existen muchas sustancias que tienen propiedades convulsivas, pero debido a sus propiedades físico-químicas no pasan la BHE. Por tal motivo se dificulta el estudio de sus mecanismos de acción. En otro caso dichas sustancias son administradas por técnicas de aplicación tópica, lo cual encarece los métodos y complica sus procedimientos, a lo que se agregaría que los modelos experimentales epileptiformes tienen como desventaja la limitación de análisis de la conducta del animal debido a las restricciones experimentales así como el traumatismo causado al mismo.

Por tal motivo, el desarrollo de técnicas que permitan la apertura de la BHE para el paso de sustancias convulsionantes, incrementa el número de modelos experimentales epileptiformes ya existentes, lo cual aumenta las posibilidades de estudio de dicha enfermedad, con reducción importante en costos y simplificación de técnicas en los modelos antes mencionados, además el uso indiscriminado que en muchas ocasiones se le da a la penicilina, permite contemplar posibles riesgos colaterales en el individuo que puede regular el uso de este antibiótico.

H I P O T E S I S

Si la administración de sustancias hiperosmóticas produce la apertura de la barrera hemato-encefálica y existen sustancias convulsivas que no pasan BHE o lo hacen de manera muy lenta, tal como lo son la penicilina, Iodo-metil bicuculina, y glutamato monosódico, luego entonces, el tratamiento previo con una solución hiperosmótica de cloruro de sodio, vía intraperitoneal, reduce la dosis efectiva para la producción de crisis convulsivas, así como el tiempo de latencia de aparición de dichas crisis por estos convulsionantes.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL

Producir la apertura de la barrera hemato-encefálica mediante la administración de solución salina hiperosmótica e inducir posteriormente crisis convulsivas con aplicación i.p. de penicilina, iodo-metil bicuculina, y glutamato monosódico.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Determinar la concentración molar de NaCl que permita la aparición de crisis convulsivas, al administrar penicilina y produzca el mínimo de muertes en los animales tratados.

2.- Determinar dosis y tiempo de latencia en las crisis producidas por el GMS bajo previo tratamiento de soluciones hiperosmóticas.

3.- Determinar el paso del convulsionante, iodo-metil bicuculina (IMB) al sistema nervioso central por aparición de crisis convulsivas, bajo previa administración de soluciones hiperosmóticas.

M A T E R I A L
Y
M E T O D O S

Para alcanzar los objetivos del presente trabajo, se emplearon ratas macho de la cepa wistar, de 60 a 85 días de edad, en condiciones de bioterio (luz-oscuridad 12-12 horas, temperatura 23 ± 1 C, libre acceso al agua y alimento.). Ningún animal fue tratado más de una vez.

Los compuestos y soluciones fueron preparados de la siguiente manera:

A. 2.95 M NaCl al 17.23 % en agua bidestilada y desionizada.

B. 3.24 M NaCl al 18.93 % en agua bidestilada y desionizada.

C. 3.54 M NaCl al 20.68 % en agua bidestilada y desionizada.

D. 3.83 M NaCl al 22.38 % en agua bidestilada y desionizada.

E. 4.13 M NaCl al 24.13 % en agua bidestilada y desionizada.

F. 3.09 M NaCl al 18.05 % en agua bidestilada y desionizada.

G. 3.17 M NaCl al 18.52 % en agua bidestilada y desionizada.

H. GMS, Se preparo al 50 % en agua bidestilada y desionizada.

I. Penicilina, 1'000,000 de U. de penicilina G sódica en 2 ml de agua bidestilada.

J. iodo-metil-Bicuculina, Dosis 3 mg, 3 mg de IMB en 200 μ l de agua bidestilada y desionizada.

Dosis 1 mg, 1 mg de iodo-metil-Bicuculina en 200 μ l de agua bidestilada y desionizada.

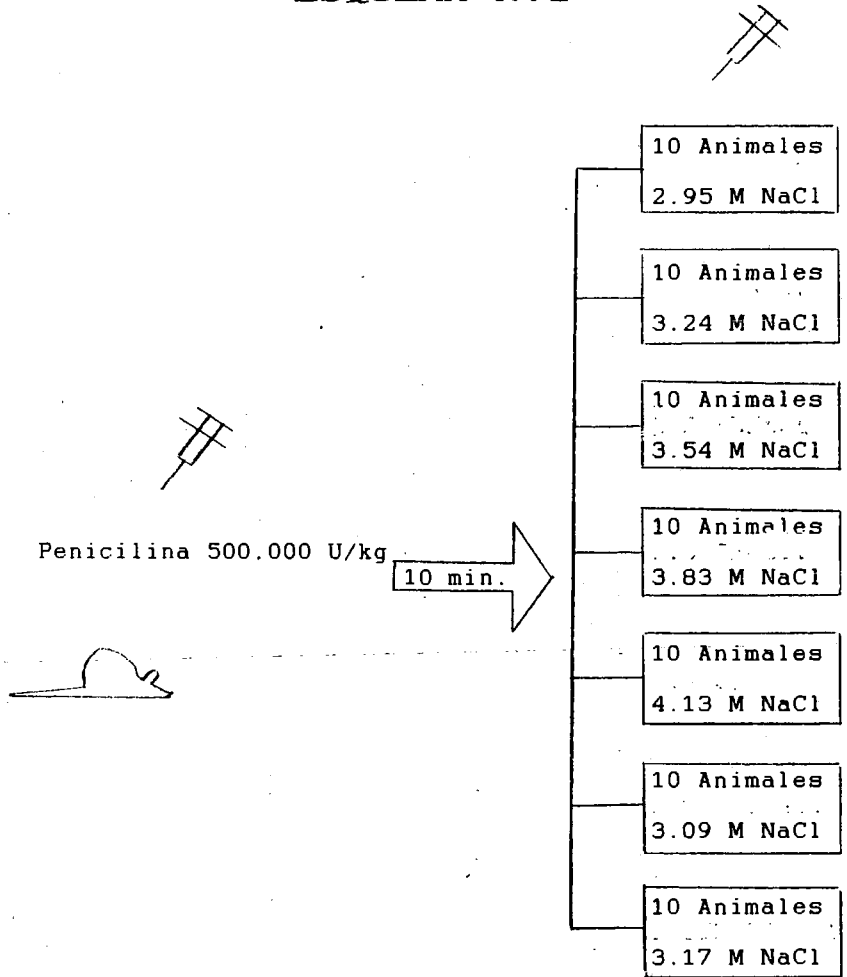
Para encontrar la concentración de NaCl que permita la aparición de crisis convulsivas y un mínimo de muerte en los animales tratados, se dió un pretratamiento de penicilina de 500,000 U/kg de peso vía i.p. (Esquema 1). Al transcurrir 10 minutos de aplicado el pretratamiento, por la misma vía se administró una solución de NaCl, variando su concentración desde la dosis equimolar a una solución de GMS al 50% hasta 1.1x, 1.2x, 1.3x, y 1.4x la concentración equimolar de GMS, que corresponde 2.95, 3.24, 3.54, 3.83, 4.13 molar, respectivamente. En base a los resultados obtenidos bajo estas concentraciones se aplicaron concentraciones intermedias entre 1.0 y 1.1, considerando las concentraciones 3.09, 3.17 molar. Se tomó un grupo testigo por cada concentración a los cuales se les inyectó vía i.p. la misma concentración de la solución de NaCl que el grupo experimental representado. Aparte se consideró otro grupo testigo al que se le inyectó 500,000 U/kg (Esquema 2). Se tomó registro del tiempo de latencia, tipo de crisis, y la presencia de muerte del animal.

Para el estudio de la dosis y tiempo de latencia en las crisis producidas por el GMS, se aplicó un pretratamiento de solución hiperosmótica de NaCl vía i.p. a una concentración de

2.9 M. 10 min. después se administró una solución de GMS al 50% a una dosis de 5 mg/g, 2.5 mg/g y 0.25 mg/g (Esquema 3). Tomando registro de los tiempos de latencia, y la muerte de el animal. Como testigo se designó un grupo al que se le inyectó la dosis efectiva de GMS de 5mg/g de peso, así como 2.5 mg/g y 0.25 mg/g (Esquema 4).

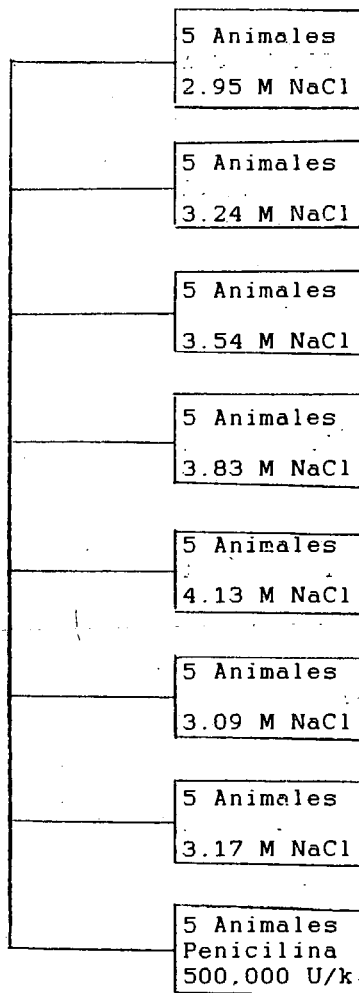
Para determinar el paso de la iodo-metil-Bicuculina al SNC por aparición de crisis convulsivas, se aplico un pretratamiento de solución hiperosmótica de NaCl vía i.p. a una concentración de 2.9 M. 10 min. después se aplicó una solución de IMB a una dosis de 3 mg, conjuntamente con un segundo tratamiento de NaCl 2.9 M; de igual manera se aplicó en otro grupo experimental el mismo sistema pero a una dosis de 1 mg de IMB y por ultimo en otro grupo se empleó una dosis unica de NaCl 2.9 M como pretratamiento previo a la inyección i.p. de un mg de IMB que se realizó 10 min. después (Esquema 5). Para este apartado se utilizaron tres grupos testigos, el primero con una doble inyección de SENaCl (2.9 M) con 10' de diferencia, dos grupos más fueron utilizados con una inyección única de 3 mg y 1 mg de IMB respectivamente (Esquema 6).

ESQUEMA N. 1



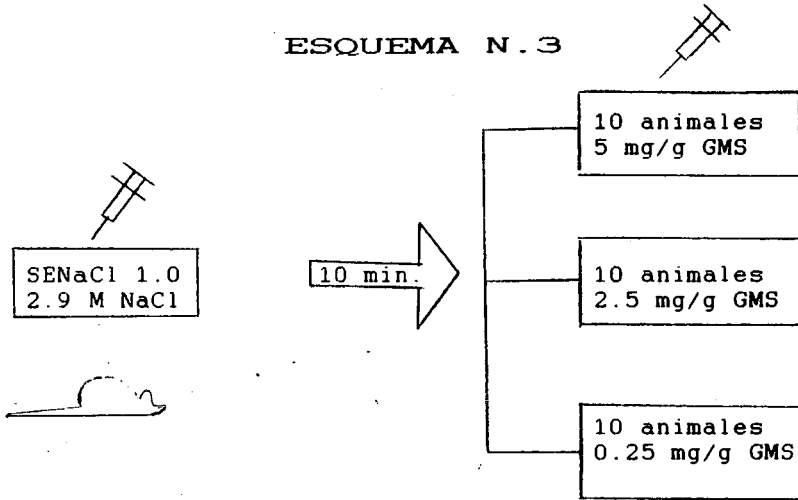
Serie experimental N.1

ESQUEMA N. 2



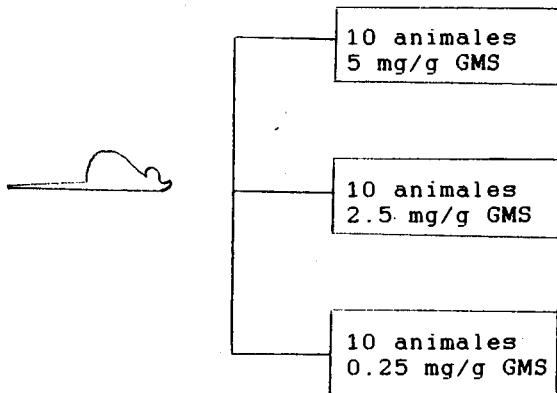
Testigos de la serie experimental N.1

ESQUEMA N.3



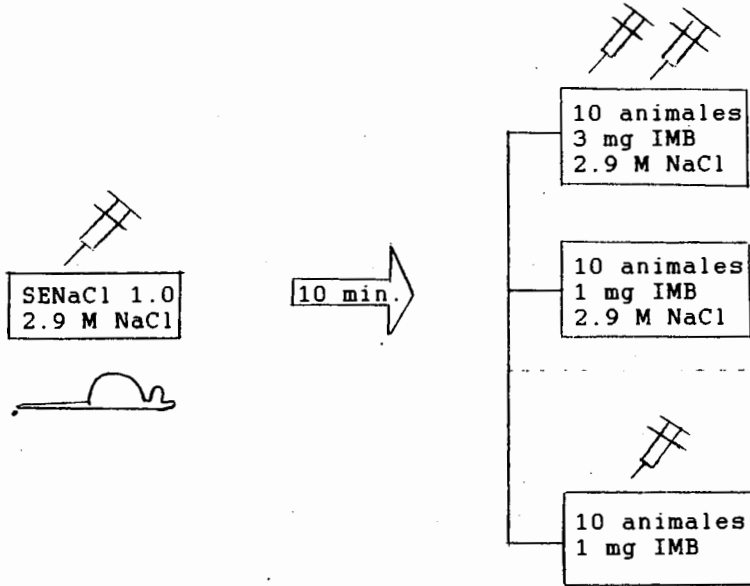
Serie experimental n.2

ESQUEMA N.4



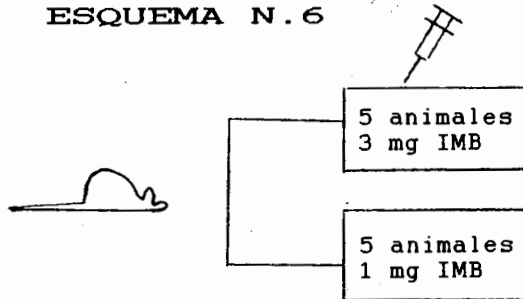
Controles de la serie experimental n. 2

ESQUEMA N.5



Serie experimental n. 3.

ESQUEMA N.6



Controles de la serie experimental n. 3

R E S U L T A D O S

Parámetros analizados.

Los parámetros evaluados en los experimentos, fueron los tiempos de latencia, intensidad de las crisis y tiempo en que muere el animal. Donde el tiempo de latencia comprende a partir del momento en que finaliza el tratamiento, hasta que se presenta la primer crisis convulsiva generalizada. La intensidad de las crisis fueron descritas como, pre-crisis los bamboleos y mioclonos y como crisis se incluyen los tonos, clonos y las tónico-clónicas (este parámetro se utilizó para demostrar la existencia o no de las crisis) y por último se verificó el tiempo en que muere el animal en el caso en que esto sucedió.

Resultados obtenidos

Al aplicar la metodología para encontrar la concentración de NaCl necesaria, para producir crisis convulsivas administrando penicilina, con un mínimo de mortandad en los animales tratados, se observó lo siguiente (fig 2): que a apartir de la concentración de 3.83 M (1.3 veces SENaCl) en adelante (4.13 M, 1.4 veces SENaCl) se produce un 100 % de mortalidad en los animales tratados, con un 100 % de presencia de crisis convulsivas (clónicas y tónico clónicas) (Figs.3,4). La concentración de 2.9 M (1.0 veces SENaCl) fue en la que se registró menor porcentaje de muertes (50 %) sin embargo la presencia de crisis sólo se reportó en el 20 % de los animales tratados (fig.5). En la concentración de 3.24 M (1.1 veces SENaCl) se encontró un 50 % de muerte y un 90 % en presencia de crisis convulsivas (Fig.6). En 3.54 M (1.2 SENaCl) se reporto un 90 % de mortalidad y un 90 % de animales que convulsionan (fig.7). Todas las crisis fueron tónico-clónicas, con o sin presencia de "sacudidas de perro mojado"

Bajo estos resultados se encontró una tendencia hacia una relación directa de la concentración, con la producción de crisis y con el porcentaje de muertes, por lo que se procedió a la aplicación de tratamientos con las concentraciones 3.09 M (1.05 SENaCl) y 3.17 M (1.075 SENaCl) previendo encontrar mejores resultados, en donde se obtuvo 20 % de crisis y 50 % de mortalidad (fig.8 y Fig.9) para ambos .

Al buscar reducir dosis y tiempos de latencia en las crisis producidas por el GMS bajo previo tratamiento con soluciones hiperosmóticas, se obtuvo que a un pretratamiento de SENaCl con 10 minutos previos a la inyección i.p. de 5 mg/g de GMS, el tiempo de latencia se disminuyó de 50 ± 5 min. (tiempo promedio de latencia en 5 mg/g) a $6.33 \pm .75$ min.. Al disminuir la dosis a la mitad de GMS (2.5 mg/g) con el mismo pretratamiento, se encontró un tiempo de latencia $11.33 \pm .89$ min. . A una dosis 20 veces menor a la dosis efectiva (5 mg/g) el tiempo de latencia reportado fue de 23 ± 6.35 min. (Fig 10).

Al determinar el paso de la IMB al SNC por aparición de crisis convulsivas, se observó que al contrario de lo que se presenta en el grupo testigo (sin aparición de crisis convulsivas), los grupos experimentales presentaron crisis convulsivas, de la siguiente manera: con un pretratamiento de 2.9 M de NaCl y previo de 10 min. a la aplicación de 3 mg de IMB y una segunda dosis de 2.9 M de NaCl, se presentaron crisis convulsivas con un tiempo de latencia $4.33 \pm .33$ min. en 100 % de los animales tratados.

Al reducir la dosis de IMB a un 1 mg con el mismo tratamiento, se generaron crisis a los $7.25 \pm .84$ min. en el 100 % de los animales. A un pretratamiento de 2.9 M de NaCl 10

min. antes de la inyección única de 1 mg de IMB (sin una segunda dosis de NaCl 2.9 M), se obtuvieron crisis a los 16 ± 2.8 min. de la aplicación de la IMB, pero con un 20 % de convulsiones tónico-clónicas y el 80 % restante presentó solo mioclonos y temblores. (Fig. 11).

Con el propósito de observar algún posible efecto de la solución hiperosmótica de NaCl (2.95 M) y del GMS sobre la concentración de los electrolitos Na^+ y K^+ en plasma, se realizó un estudio de cuantificación de estos por flamometria, en donde se encontraron diferencias significativas en el aumento de concentración de Na^+ y K^+ en los animales experimentales con relación al testigo con todos los tiempos examinados (15', 30', y 50' después de la aplicación de GMS) La concentración del Na^+ y K^+ plasmático fue en su máxima concentración particularmente en el tiempo en donde se desarrollan las crisis convulsivas (50') (figuras 12 y 13).

D I S C U S S I O N

El haber encontrado una relación entre la concentración de la solución hiperosmótica, con la producción de crisis y con el porcentaje de muertes, nos sugiere que aumentando la concentración de NaCl puede abrirse la BHE. Pero a concentraciones mayores de 3.83 molar la muerte es inminente en el 100% de los animales, mientras que a concentraciones de 2.95 molar hacia abajo, aparentemente no se genera una apertura de la BHE en el 100%, ya que solo en algunos organismos se logra la producción de crisis convulsivas, esto se debe probablemente a los factores que influyen en la apertura de la BHE es decir, presión atmosférica, hora del día, ciclos hormonales y la hemoconcentración. La concentración de 3.24 molar fue la de mayor adecuación en el modelo con penicilina, ya que en este se obtuvo el menor porcentaje de muertes (50%), para un porcentaje adecuado en la presencia de crisis convulsivas (90%). Sin embargo para el establecimiento de un modelo con algún otro convulsionante, la concentración de 3.24 molar debe ser tomada como base inicial, ya que consideramos que de acuerdo a las características físico-químicas del convulsionante a utilizar, la concentración podría variar para obtener mejores resultados (menos mortalidad y mayor porcentaje de crisis).

La dosis efectiva de GMS (vía i.p.) para la producción de crisis convulsivas es de 5mg/g, dicha dosis se obtiene de una solución al 50 % p/v de GMS que posee una concentración de 2.9 molar. Si aplicamos una dosis de 0.25 mg/g de GMS de esta misma solución (50 % p/v de GMS), el volumen inyectado vía i.p. será 20 veces menor que la dosis efectiva (5 mg/g), y la concentración de 2.9 molar a un volumen tan reducido, no

produce un efecto permeabilizante en la BHE, por tal motivo no se observa el efecto convulsivo del GMS. Sin embargo si se produce la apertura de la BHE con un vehículo de NaCl con una concentración de 2.9 molar, a un volumen equivalente de la dosis de 5 mg/g (1% del peso del animal en volumen) y aplicamos la dosis de 0.25 mg/g de GMS, se observara la capacidad de la droga (GMS) para la producción de crisis convulsivas. De tal manera que la dosis de 5 mg/g de GMS (de una solución al 50 % p/v) es efectiva, por que al mismo tiempo de contener al convulsionante, es un vehículo hiperosmótico que genera la apertura de la BHE. Por lo tanto el GMS es capaz de producir crisis convulsivas en dosis de hasta 0.25 mg/g vía i.p., si previamente se produce una apertura de la BHE.

La IMB es un fármaco que no pasa BHE, por lo que al ser aplicado i.p a una dosis de 3 mg, no se presenta ninguna alteración visible. Al ser aplicado el pretratamiento de la solución hiperosmótica de NaCl se genera una permeabilidad en la BHE, lo que permite la entrada del convulsionante (IMB), y por lo tanto la aparición de crisis convulsivas. Sin embargo 1 mg de aplicación i.p. en el animal con este pretratamiento de solución hiperosmótica de NaCl (doble tratamiento) es suficiente para generar un modelo convulsivo, ya que las crisis se presentan en 100% de los animales tratados.

Las sustancias hiperosmóticas tienen capacidad de modificar la BHE y el NaCl en altas concentraciones (2.9 molar en adelante) es un vehículo hiperosmótico eficiente en la manipulación de la BHE. Cabe mencionar que el NaCl no presento crisis por si solo en ninguno de los controles, sin embargo presento una aletargamiento en algunos de los animales, por otro lado se ha descrito que en ratones (Mus musculus) de la

cepa Balb/c se han producido crisis con SENaCl (Castellanos R.,1992), por lo que no se descarta que el NaCl tenga efectos de tendencia a la producción de crisis, por si solo en otras especies.

C O N C L U S I O N E S

1- La penicilina administrada por via intraperitoneal, produce crisis convulsivas si previamente se produce la manipulaci3n de la BHE, por una soluci3n hiperosm3tica de NaCl a una concentraci3n de 3.83 M en adelante (4.13) administrada v3a i.p. .

2- Con un pretratamiento de soluci3n hiperosm3tica de NaCl 2.9 M , la dosis efectiva de GMS en la producci3n de crisis v3a i.p. (5 mg/g de GMS), se reduce a 0.25 mg/g de GMS. Al utilizar un doble pretratamiento de soluci3n hiperosm3tica, los tiempos de latencia disminuyen significativamente.

3- La IMB al ser aplicada v3a i.p. produce crisis convulsivas en dosis desde 1 mg, si previamente se produce la manipulaci3n de la BHE, por un doble tratamiento de soluci3n hiperosm3tica de NaCl 2.9 M.

B I B L I O G R A F I A

01 Adrian E.D., (1936) The spread of activity in the cerebral cortex, *J. Physiol*, 88: 127-161.

02 Bergstrom M, Collins F, Ehrin E, et al. (1983) "Discrepancies in brain tumor extent as shown by computed tomography and positron emission tomography using [⁶⁷Ga] EDTA, [⁶⁷Ga] Glucose, and [¹¹C] orionine. *J. comput assist Tomogr* 7:1062-1066.

03 Brightman M. W.: (1977) "MORPHOLOGY OF BLOOD-BRAIN INTERFACES". In Bito LA, Davson H, Fenstermacher JD (eds): *The Ocular and Cerebrospinal Fluids*. *Exp Eye Res* 25:1-25.

04 Cavalleiro, E.A., Riche, D.A. and La Salle, G.L.G. (1982) "Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures" *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 54:581-589.

05 Coyle J.T., Molliver, M.E. and Kuhar M.J. (1978). *In situ* injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of passage. *J. Comp. Neurol.*, 180:301-323.

06 Dow R.S., Fernandez-Guardiola A. and Manni E. (1962). The production of experimental cobalt epilepsy in the rat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 14:399-407.

07 Edward A. Neuwelt and Peggy A. Barnett. (1991) "BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION IN THE TREATMENT OF BRAIN TUMORS". (Eds) Raven press. Oregon Health Sciences University. 17:195-261

08 Feria-Velasco A., Olivares N., Rivas F., Velasco M. and Velasco F. (1980). Alumina cream-induced focal motor epilepsy in cats. IV. Thickness and cellularity of layers in the perilesional motor cortex. *Arch. Neurol.* 37:287-290.

09 Féria. V.; y Tapia A. G. (1986) "ESTRUCTURA DE LOS ELEMENTOS TISULARES CENTRALES QUE INTERVIENEN EN EL FENOMENO CONVULSIVO". en: *Epilepsia, Un Enfoque Multidisciplinario*. Féria V. A.; Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu. F. Edit. Trillas, S. A. México, D.F. Cap.2:67-68.

10 Goddard G.V. (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature (Lond.)* 214:1020-1021.

11 Gloor, P., Oliver, A., Quesney, L. F. and Andermann F. (1982). The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy, *Ann. Neurol.* 12:129-144.

12 Groothuis D.R., Fischer J.M., Lapin G. et al. (1982). Permeability of different experimental brain tumor models to horseradish peroxidase. *J. Neuropathol Exp Neurol* 41:164-185.

13 Groothuis D.R., Molnar P., Blasberg R.G. (1984). Regional blood flow and blood-to-tissue transport in five brain tumor models. In Rosenblum M. Wilson C.B. (eds): *Progress in Experimental Tumor Research: Brain Tumor Biology*. Vol. 27. Karger, New York, :132-153.

14 Gulati A.; Agarwal S.K.; Shukla R. and Srimal C. (1985) "THE MECANISM OF OPENING OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER BY HIPERTONIC SALINE" *Neuropharmacology* vol. 24 No. 9:909-913

15 Hahn F. (1960). *Analeptics, Pharmacol. Rev.*, 12: 447-530.

16 Hanna G.R. and Stalmaster R.M. (1973). *Cortical epileptic lesions produced by freezing. Neurology* 23:918-925.

17 Kang Y.S., Terasaki T., Ohnishi T. and Tsuji A. (1990). *In Vivo and in Vitro Evidence for a Common Carrier Mediated Transport of Choline and Basic Drugs through the Blood-Brain Barrier. J. Pharmacobio-Dyn.*, 13:353-360.

18 Karpiak S.E., Graf L. and Rapport M.M. (1976). *Antiserum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. Science* 194:735-737.

19 Killam K.F., Killam E.K and Naquet R. (1967). *An animal model of light-sensitive epilepsy. Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 22:497-513.

20 Kopelof, L.M., Chusid, J.G., and Kopelof N. (1955). *Epilepsy in Macacca mulatta after cortical or intracerebral alumina. Arch. Neurol Psychiatry* 74:523-526.

21 Lange S.C., Neafsey E.J. and Wyler A.R. (1980). *Neuronal activity in chronic chloride epileptic foci in cats and monkey. Epilepsia.* 21:251-254.

22 Levitt, P. and Noebels J. (1981). *Mutant mouse tottering selective increase of locus ceruleus axons in a defined single-locus mutation. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 78: 4630-4643.

23 Loiseau H., Averet N., Arrigoni and Cohadon F. (1987). The early phase of cryogenic lesions: and experimental model of seizures updated. *Epilepsia*, 28:251-258.

24 Loscher, W.L. and Schmidt, D. (1988) "Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drug?". A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.*, 2:145-181.

25 Majkowski, J and Kaplan, H., (1983), Value of Mongolian gerbils in antiepileptic drug evaluation, *Epilepsia*, 24:609-615.

26 Mellanby, J., Hawkins, C., Mellanby, H., (1984), Tetanus toxin as a tool for studying epilepsy, *J. Physiol.*, 79:207-215.

27 Milton W. Brightman (1991) "THE ANATOMIC BASIC OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER". (Eds) Raven Press. Oregon Health Sciences University, 15:98-143.

28 Nauget R. and Meldrum, B.S., (1972), Photogenic seizures in baboon. in D.P. Purpura, J.K. Penry, D.E. Tower (Eds.). *Experimental models of epilepsy- A Manual for the Laboratory Worker*, Raven, New York, :373-406.

29 Neuwelt E.A., Frenkel E.P., Diehl J.T., et al. (1980). Reversible osmotic blood-brain barrier disruption in humans: Implications for the chemotherapy brain tumors. *Neurosurgery*. 7:44-52.

30 Neuwelt E.A., Frenkel E.P., Rapoport S., et al. (1980).
Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on
methotrexate pharmacokinetics in the dog.
Neurosurgery. 7:36-43.

31 Neuwelt E.A., Maravilla K.R., Frenkel E.P., et al. (1980).
Use of enhanced computerized tomography to evaluate osmotic
blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery*. 6:49-56.

32 Neuwelt E.A., Frenkel E.P., Diehl J.T., et al. (1981).
Monitoring methotrexate delivery in patients with malignant
brain tumors after osmotic blood-brain barrier disruption.
Ann Intern Med. 94:449-454.

33 Neuwelt E.A., Barnett P.A., Bigner D., et al. (1982).
Effects of adrenocortical steroids and osmotic blood-brain
barrier opening on methotrexate delivery to gliomas in the
rodent: The factor of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad
Sci U.S.A.* 79:4420-4423.

34 Neuwelt E.A., Specht H.D., Howieson J., et al. (1983).
Osmotic blood-brain barrier modification; Clinical
documentation by enhanced CT scanning and/or radionuclide
brain scanning. *AJNR* 4:907-913, and *AJR* 141:829-836.

35 Neuwelt E.A., Barnett P.A., Frenkel E.P. (1984).
Chemotherapeutic agent permeability to normal brain and
delivery to avian sarcoma virus-induced brain tumors in the
rodent"Observations on problems of drug delivery.
Neurosurgery. 14:145-160.

36 Neuwelt E.A., Frenkel E.P., D'Agostino A.N., et al. (1985). Growth of human lung tumor in the brain of the nude rat as a new model to evaluate antitumor agent delivery across the blood-brain barrier. *Cancer Res.* 45:2827-2833.

37 Pei Y., Zhao D., Huang J. and Cao L. (1983). Zinc-induced seizures: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia.* 24:169-176.

38 Pitkanen A., Saano V., Hyvonen K., Airaksinen M.M. and Riekkinen P.J. (1987). Decreased GABA benzodiazepine, and picrotoxinin receptor binding in brains of rats after cobalt-induced epilepsy. *Epilepsia.* 28:11-16.

39 Prince D.A. (1968). The depolarization shift in "epileptic" neurons. *Exp. Neurol.* 21:467-485.

40 Prince, D.A. and Wilder, B.J. (1967), Control mechanisms in cortical epileptogenic foci, *Arch. Neurol.*, 16:194-202.

41 Purpura, D.P.; Penry, J.K.; Tower, D. Woodbury, D.M. and Walter, R. (1972). "EXPERIMENTAL MODELS OF EPILEPSY" (Eds). Raven Press. Nueva York. :7-8.

42 Reigel C.E., Dailey J.W. and Jobe P.C. (1986). The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life Sci.* 39:763-774.

43 Robert S. Fisher (1989) "ANIMAL MODELS OF THE EPILEPSIES" *Brain Research Reviews* 14:245-278.

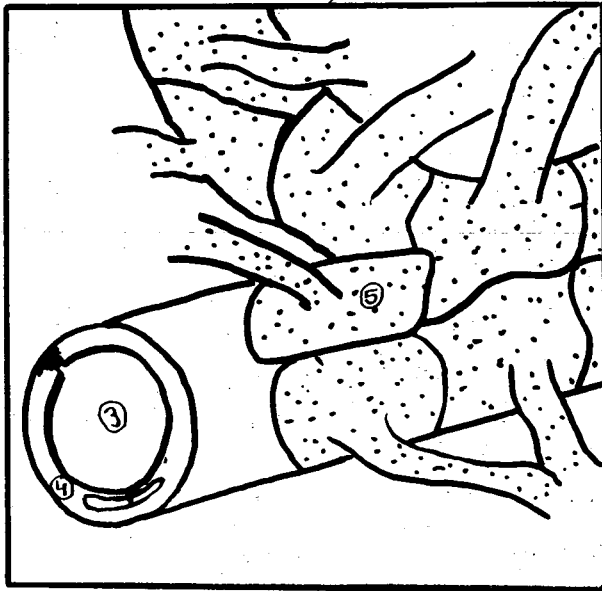
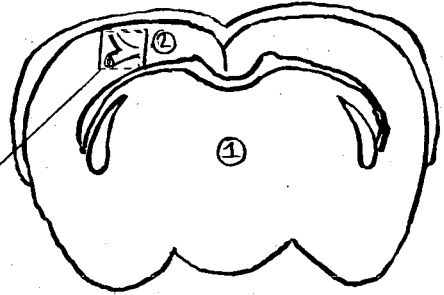
44 Solis, D. H.; y Arauz, C. J. (1986) "MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA". en: *Epilepsia, Un Enfoque Multidisciplinario*. Feria V. A.; Martinez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu. F. Edit. Trillas, S.A. México, D.F. Cap.3:74-97.

45 Timpe, L.C. and Jan L.Y. (1987). Gene dosage and complementation analysis of the shaker in *Drosophila*, *J. Neurosci*, 7:1307-1317.

46 Tuomanen E. (1993). Breaching the blood-brain barrier, *Scientific American*, 2:56-60.

47 Veetali L., Turski P.A., Levin A.B., et al. (1987). Osmotic disruption of the blood-ocular barriers. *AJNR* 8:347-348.

RELACION
DE
FIGURAS



- 1- Corte cerebral transversal.
- 2- Capilar.
- 3- Interior del capilar.
- 4- Tejido endotelial.
- 5- Astrocitos.

FIGURA N. 1 Capilar cerebral, rodeado incompletamente por pericitos y continuamente por prolongaciones y expansiones citoplasmáticas de astrocitos.

PENICILINA

CONCENTRACION DE NaCl (M)	TIEMPOS DE LATENCIA X + EEM	PRESENCIA DE CRISIS (%)	MUERTE (%)
2.95	24.0 ± 3.42	20	50
3.09	24.6 ± 1.87	20	50
3.17	23.0 ± 5.29	20	50
3.24	22.3 ± 2.83	90	50
3.54	21.2 ± 2.71	90	90
3.83	18.0 ± 3.96	100	100
4.13	19.1 ± 2.42	100	100

CONCENTRACION, LATENCIA, CRISIS, MUERTE.

FIGURA N. 2 Los resultados representan la concentración molar de NaCl, tiempos de latencia en su media aritmetica + el error estándar medio, porcentaje de la presencia de crisis y de muerte.

NaCl 3.83 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

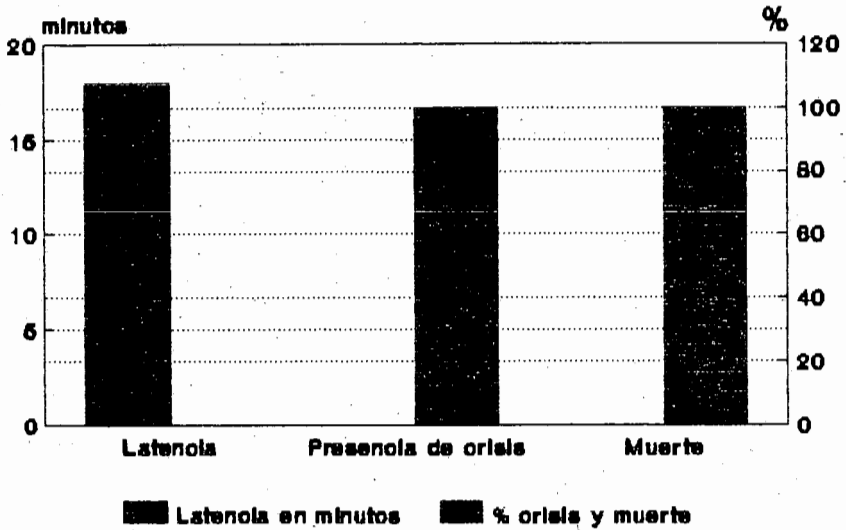


FIGURA N. 3 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 3.83 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

NaCl 4.13 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

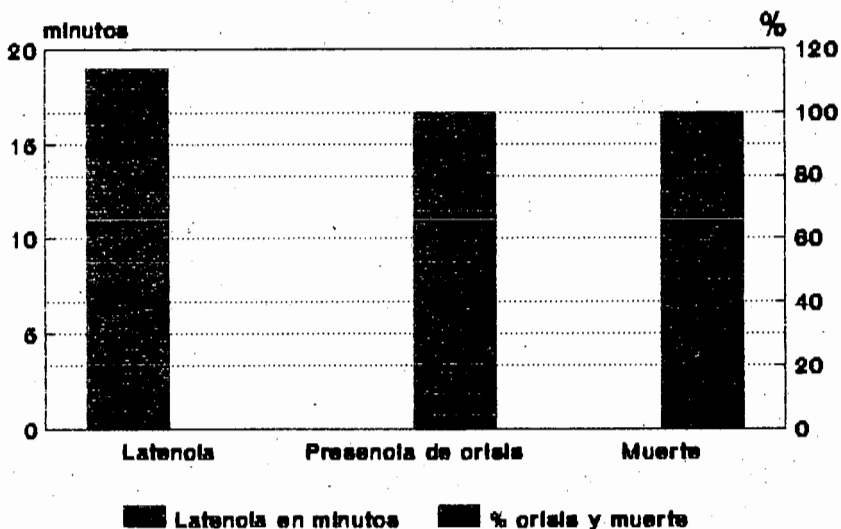


FIGURA N. 4 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 4.13 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

NaCl 2.95 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

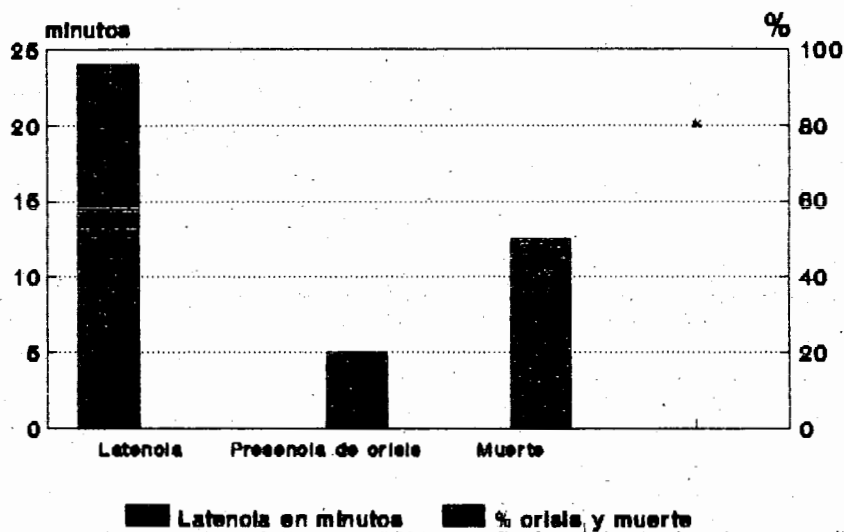


FIGURA N. 5 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 2.95 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

NaCl 3.24 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

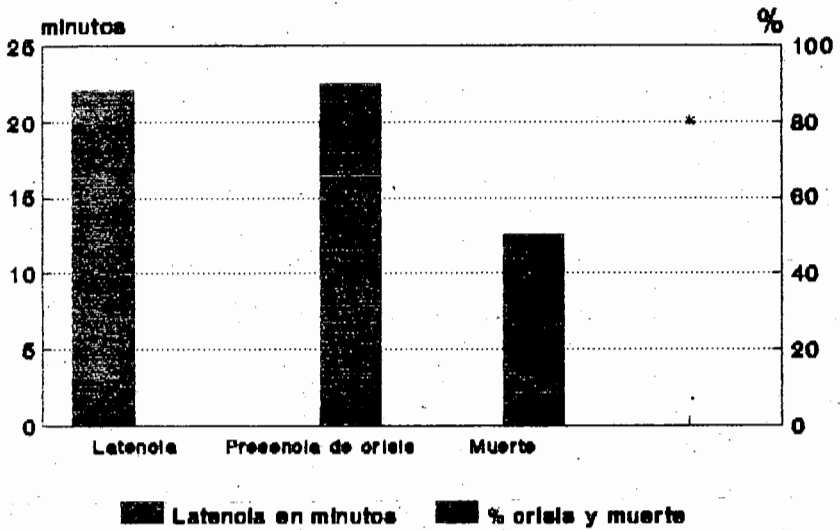


FIGURA N. 6 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 3.24 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

NaCl 3.54 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

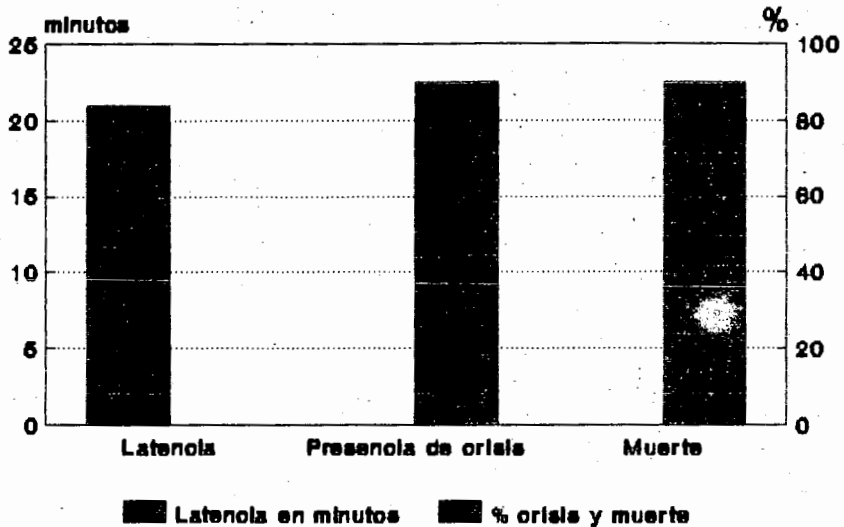


FIGURA N. 7 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 3.54 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

NaCl 3.09 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

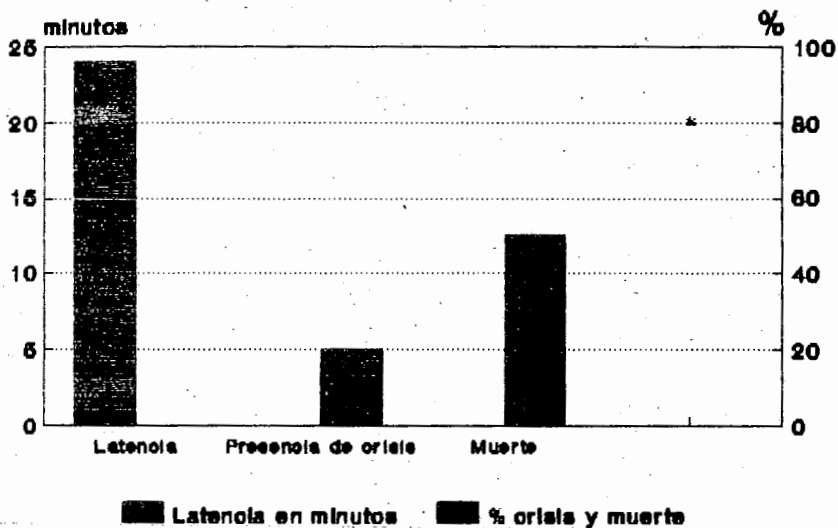


FIGURA N. 8 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 3.09 molar, con una aplicación de 500.000 U/k de penicilina.

NaCl 3.17 M Penicilina
Latencia, crisis, muerte.

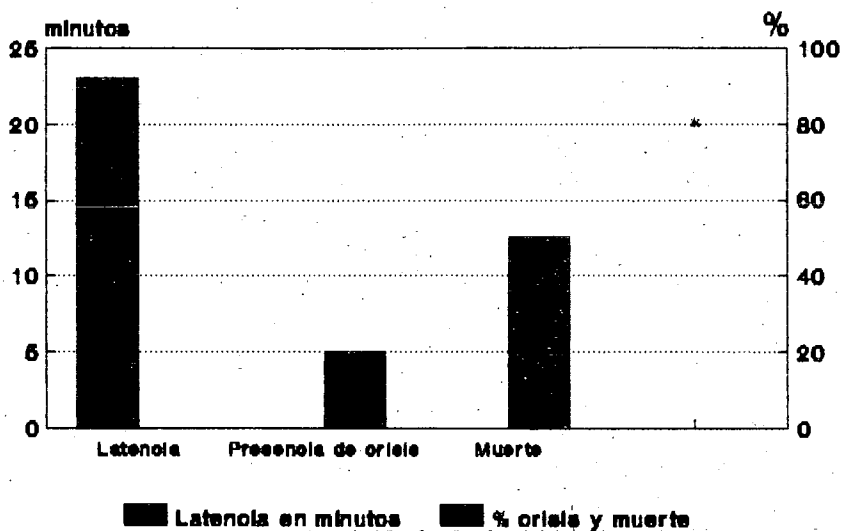


FIGURA N. 9 Los resultados representan la latencia en minutos, el porcentaje de la presencia de crisis y de muerte. Pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 3.17 molar, con una aplicación de 500,000 U/k de penicilina.

GLUTAMATO MONOSODICO TIEMPOS DE LATENCIA

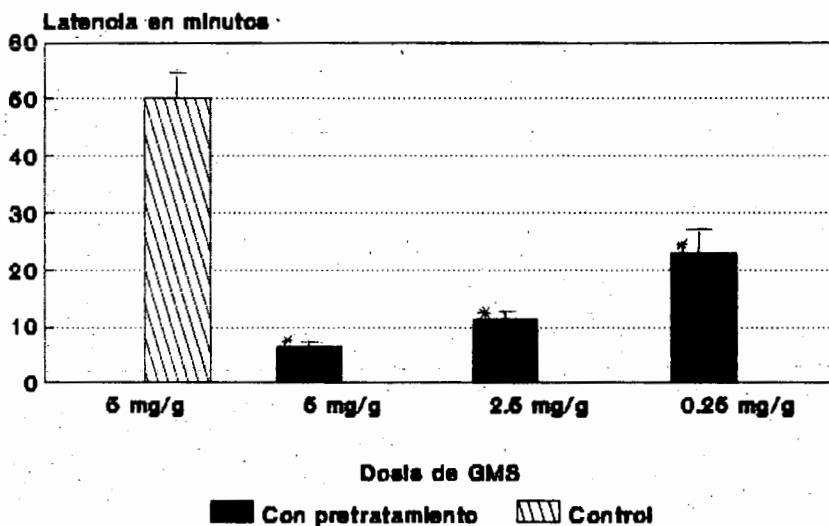


Fig. N. 4 Tiempos de latencia GMS

FIGURA N. 10 Resultados de los tiempos de Latencia en minutos de los animales tratados con GMS a diferentes dosis y un pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 2.9 molar

Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.001$ estadísticamente diferente con relación al testigo.

IODO METIL BICUCULINA TIEMPOS DE LATENCIA

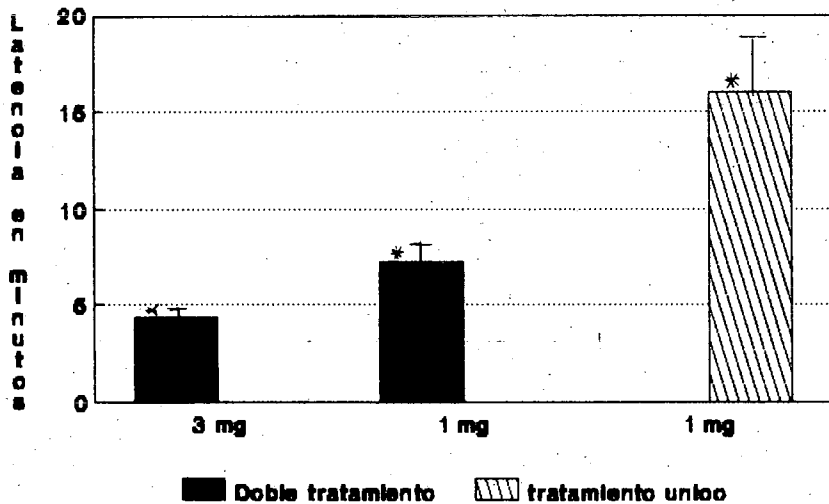


Fig. N. 8 Tiempos de latencia IMB

FIGURA N. 11: Resultados de los tiempos de Latencia en minutos de los animales tratados con IMB a diferentes dosis y un pretratamiento con solución hiperosmótica de NaCl a una concentración de 2.9 molar

Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.001$ estadísticamente diferente con relación al testigo.

Figuras 12, 13 Niveles de potasio y sodio en plasma bajo efecto del GMS y SENaCl. Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 5 grupos experimentales de ratas (cepa Wistar 10 animales/ grupo) donde 3 fueron tratados con GMS a dosis de 5 mg/g de peso, un grupo fué tratado con SENaCl (solución equimolar de NaCl al GMS en 5 mg/g) y otro más se usó como testigo. Los grupos de GMS fueron decapitados a los 15', 30' y 50' (respectivamente), se tomó de cada una de las ratas de 2.5 a 3 ml de sangre para centrifugada (3' a 10, 000 rpm) y posteriormente cuantificar el Na y K en plasma por flamometría. En el grupo de SENaCl y en el grupo control se procedió de la misma manera, pero solo los 50'.

NIVELES DE POTASIO EN PLASMA SANGUINEO

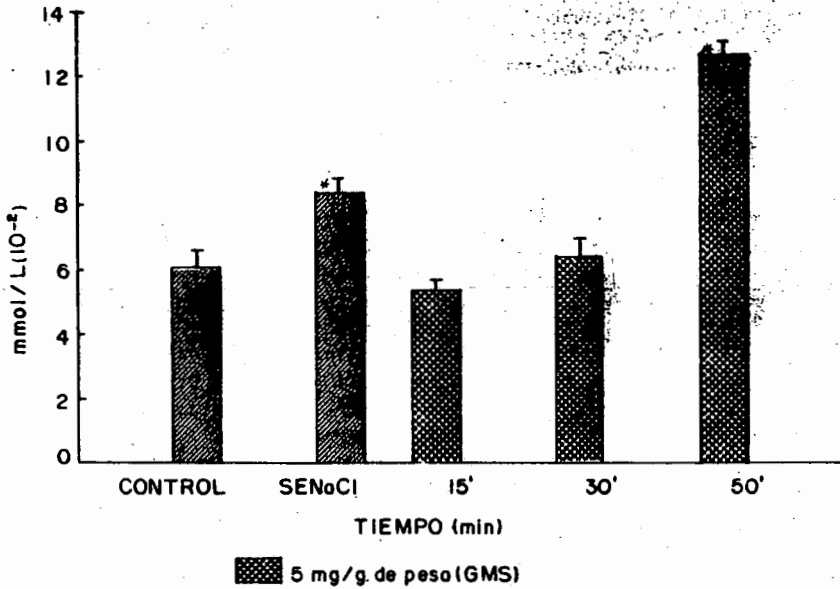


Fig. N.12 Niveles de Potasio en Plasma.

Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.001$ estadísticamente diferente con relación al testigo.

NIVELES DE SODIO EN PLASMA SANGUINEO

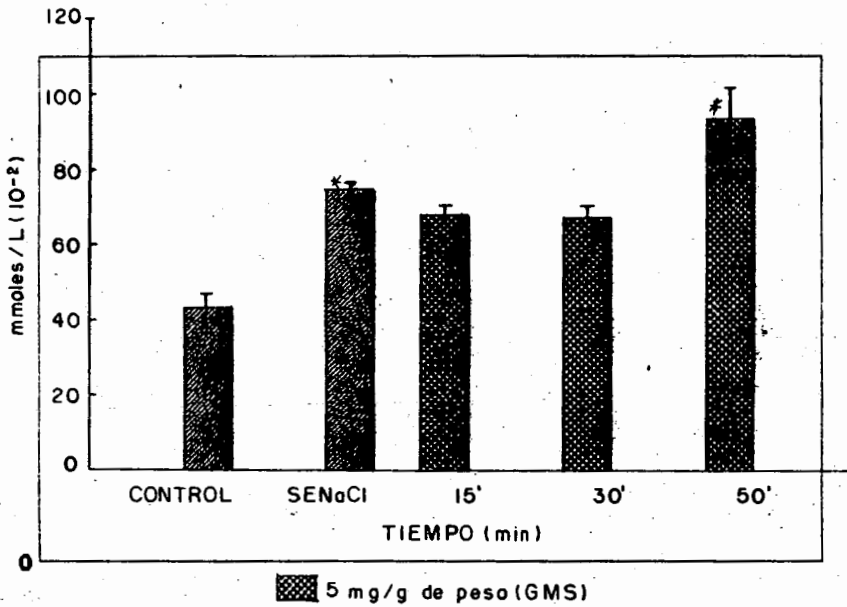


Fig. 1 Niveles de Na

Fig. N. 13 Niveles de Sodio en Plasma.

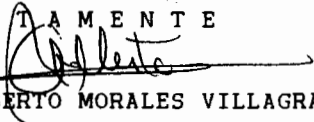
Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.001$ estadísticamente diferente con relación al testigo.

Dr. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara
P R E S E N T E

Por medio de este conducto, comunico a usted que Arturo Carlos II Becerra Bracho, pasante de la licenciatura en Biología con el número de registro 85370596 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado MANIPULACION DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFALICA PARA LA IMPLEMENTACION DE MODELOS ALTERNATIVOS DE INDUCCION DE CRISIS CONVULSIVAS, el cual se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, en el area de investigación. De la misma manera, le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la facultad que usted representa.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

A T E N T A M E N T E


M. en C. ALBERTO MORALES VILLAGRAN
Director de Tesis



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Expediente

Número

Sección

- C. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis **"MANIPULACION DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFALICA PARA LA IMPLEMENTACION DE MODELOS ALTERNATIVOS DE -- INDUCCION DE CRISIS CONVULSIVAS"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M. en C. Alberto Morales -- Villagran.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., 3 de Junio de 1993
EL SECRETARIO
ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCION



**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

BIOL. *Jesus Alberto Espinosa Arias*
JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

c.c.p.- El M. en C. Alberto Morales Villagran, Director de Tesis.-
c.c.p.- El expediente del alumno

*cglr.

Al contestar este oficio citase fecha y número