

---

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"MODIFICACIONES CELULARES DEL HIPOCAMPO. INDUCIDAS  
POR LA ADMINISTRACION DE DFH-Na Y LA  
ELECTROESTIMULACION SUPRAMAXIMA EN RATA".

## TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ARACELI VELAZQUEZ TORRES

GUADALAJARA, JALISCO,

1992.

M.en C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD  
DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E :

Por medio de la presente comunico a usted que la C. ARACELI VELAZQUEZ TORRES, pasante de la Licenciatura en Biología ha concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulado: " MODIFICACIONES CELULARES DEL HIPOCAMPO INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE DIFENIHIDANTOINATO SODICO Y LA ELECTROESTIMULACION SUPRAMAXIMA EN RATA", bajo mi dirección.

Por lo anterior solicito a Ud. su autorización a fin de programar la presentación de su examen de Tesis y Profesional.

Sin otro particular aprovecho esta oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara., Jal. 16 de junio 1992.

  
M.en C. SONIA MA. ROMAN MALDONADO  
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA.



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección .....

Expediente .....

Número .....

C. ARACELI VELAZQUEZ TORRES  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis " MODIFICACIONES CELULARES DEL HIPOCAMPO INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE DFH-Na Y ELECTROESTIMULACION SUPRAMAXIMA EN RATA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis el M. en C. Sonia Roman M.



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

A T E N T A M E N T E  
" PIENSA Y TRABAJA "  
"AÑO DEL BICENTENARIO"  
Guadalajara, Jal., 14 Enero de 1992.  
EL DIRECTOR

M. EN C. CARLOS LEON IZARRATE

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTÍN PEDRO TENA MEZA

c.c.p.- La M. en C. Sonia Roman M.; Directora de tesis.pte.-  
c.c.p.- El expediente del alumno.  
CBZ>MPTM>Cglr.

Al contestar este oficio cítese fecha y número

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, BAJO LA DIRECCION DE LA M. en C. SONIA MARIA ROMAN MALDONADO Y ASESORIA DEL BIOL. JORGE R. DOMINGUEZ RODRIGUEZ DE LA DIVISION DE BIOQUIMICA FARMACOLOGICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABJO DE TESIS SE CONTO CON EL APOYO FINANCIERO DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y SUPERACION ACADEMICA DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, ATRAVES DEL PROYECTO: " RESPUESTA NEURONAL CEREBRAL Y CEREBELOSA A ESTIMULOS ELECTRICOS Y DIFENILHIDANTOINATO SODICO " No DE ACUERDO: 90/MB/0430/01/2078.

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo de tesis:

A mis padres INDALECIO VELAZQUEZ y ESTELA TORRES, a quienes debo la superación que he alcanzado hasta ahora, apoyandome siempre y evitando que me sienta sola.

A mis hermanos Isaac, Gilberto, Laura, Estela, Indalecio y Berenice quienes me han acompañado en el camino que he recorrido apoyándome y ayudándome en todo momento, y quienes son parte de la riqueza de mi ser.

A la memoria de mi abuelita SOFIA CAMPA quien siempre dió ejemplo de tenacidad, fortaleza y amor y a quien siempre he extrañado desde que nos dejó.

A Mauricio Israel Dominguez Román a quien ya quería antes de que naciera, y de quien son todas las oportunidades del futuro.

A todo aquel que no solo sueña, sino que lucha por hacer realidad sus sueños..... Al que aún ríe.

## A G R A D E C I M I E N T O S

A mis TIOS y PRIMOS por motivarme y ayudarme a ser cada día más humano y mejor.

No hay palabras para agradecer el apoyo y amistad con que me distinguieron Sonia Román y Jorge Domínguez en estos últimos años, quienes a la vez fungieron amablemente como mi director y asesor, respectivamente.

Agradezco de manera especial:

A Vidal Delgado por su valiosa amistad y apoyo incondicional durante este tiempo de arduo trabajo.

A mis compañeros Patricia, Carina, Javier, Daniel, Bertha, Teresa, Mercedes, Miriam y Estela por su valiosa amistad.

Así mismo mi más sincero agradecimiento a las personas que apoyaron y asesoraron la realización de éste trabajo de tesis:

Al M.C. Joaquin García Estrada y al M.C. Genaro Gabriel Ortiz por el valioso asesoramiento en el análisis morfológico.

Al MVZ. Raul Leonel de Cervantes M. por las facilidades que nos brindó en las instalaciones de Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la U de G.

Al Dr. Roberto Vázquez Pallares, Jefe del Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina de la U. de G. y al Sr. Ildefonso Casillas Hernández por su valiosa cooperación en el procesamiento histológico de los tejidos procedentes de éste estudio.

A Trinidad García Iglesias por su amistad y orientación para el estudio morfológico.

Al Sr. Armando Alcaráz por el trabajo fotográfico.

Al MVZ. Pedro Díaz y al MVZ. Guillermo Orozco, responsables del bioterio de la Facultad de Medicina por proveer y mantener a los animales de experimentación.

Al M. en C. Juan Mora Galindo, QFB Refugio Mora, M en C. Carlos Beas Zárate, y al MVZ Miguel Carbajal Soria por fungir como revisores y sinodales de la tesis.

# I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
* RESUMEN .....	6
** LISTA DE TABLAS.....	8
*** LISTA DE FIGURAS.....	8
 I.- INTRODUCCION	
1.1 Definición y Clasificación de las Epilepsias.....	10
1.2 Modelos Animales de Epilepsia Experimental.....	10
1.3 Uso del Difenhilhidantoinato Sódico como Anticomisal.....	13
1.4 Reacciones Adversas Inducidas por los Anticomisales.....	14
1.5 Efecto de las Crisis Epilépticas sobre el Tejido Neuronal.....	16
 II.- HIPOTESIS.....	19
 III.- OBJETIVO.....	20
 IV.- METODOLOGIA.....	21
4.1 Condiciones de los Grupos Control.....	21
4.2 Condiciones del Grupo Experimental.....	22
 V.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
 VI.- RESULTADOS.....	27
6.1.- Descripción Histopatológica de la Region CA4 y CA1 de Hipocampo.....	27
6.1.1. Microfotografías de la region CA4 y CA1 de los grupos basales.....	31
6.1.2. Microfotografías de la region CA4 de los grupos control-DFH-Na.....	33
6.1.3. Microfotografías de la region CA1 de los grupos control-DFH-Na.....	37
6.1.4. Microfotografías de la region CA4 de los grupos EESM.....	41
6.1.5. Microfotografías de la region CA1 de los grupos EESM.....	43
6.1.6. Microfotografías de la region CA4 de los grupos DFH-Na/EESM.....	45
6.1.7. Microfotografías de la region CA1 de los grupos DFH-Na/EESM.....	47
6.2.- Descripción del Estudio Semicuantitativo de la Region CA4 Y CA1 de Hipocampo.....	48
6.2.1. Densidad de la Población Neuronal de CA4 y CA1 de Hipocampo.....	49
6.2.2. Densidad de la Población Glial de CA4 y CA1 de Hipocampo.....	50
6.2.3. Significancias Estadísticas del Estudio de Densi- dad de la Población Neuronal y Gial de CA4 y CA1 de Hipocampo.....	51
 VII.- DISCUSION.....	52
 VIII.-CONCLUSIONES.....	55
 IX.- BIBLIOGRAFIA.....	56

Los modelos de epilepsia experimental seleccionados para inducir convulsiones en animales simulan a las crisis epilépticas descritas en el humano y son útiles para conocer los cambios neuronales ictales y post-ictales inducidos por los diferentes tipos de crisis convulsivas. La electroestimulación supramáxima (EESM) producida por una descarga eléctrica de 130 V durante 0.2 segundos ocasiona una crisis epileptiforme de tipo tónico-clónica. El daño neuronal ocasionado por las crisis convulsivas puede ser debido a: una acidosis láctica no hipóxica, alteraciones en el estado energético, pérdida de la homeostasis iónica y reducción del sistema celular redox, así como la elevación citotóxica de  $Ca^{++}$  que pueden llevar conjuntamente a la muerte celular y consecuentemente a una atrofia de las diversas áreas del sistema nervioso central, como es el caso del hipocampo. Por otra parte, la ingestión de anticomisales como el difenilhidantoinato sódico, tanto en el humano como en el animal de experimentación, han revelado alteraciones en el número de células de esta zona.

El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto independiente y combinado de la EESM y la ingestión de DFH-Na en rata Wistar adulta sobre la densidad celular del hipocampo después de 7, 14 y 28 días de tratamiento formando los siguientes grupos: I) Dosis única diaria de 30mg/kg de DFH-Na en vehículo de sacarosa al 50% por vía oral, II) Vehículo únicamente, III) EESM cada 24 horas a través de electrodos colocados sobre las sienas, IV) Vehículo + EESM, V) Igual que I + EESM aplicado 3 horas después de la dosis de DFH-Na, VI) Basal, sin ningún tratamiento. Al término de los días estudiados se disecó el cerebro de los animales para obtener preparaciones histológicas convencionales. Las laminillas correspondientes se observaron al microscopio de luz a 40X y la imagen se proyectó sobre una superficie plana para realizar un conteo semicuantitativo de las neuronas y glia de la región CA4 y CA1 del hipocampo.

Nuestros resultados muestran claramente que la administración<sup>7</sup> del DFH-Na y las crisis convulsivas resultantes de una electroestimulación supramáxima causan alteraciones en el contenido celular del hipocampo. Dichas alteraciones consisten en un aumento en la densidad de la población glial, inducida preferencialmente por la administración de DFH y potenciada con su respectiva combinación con EESM. Mientras que la población neuronal mostró una disminución inespecífica para el estímulo. Por otro lado el estudio histopatológico mostró gliosis y degeneración neuronal con diferentes magnitudes dependiendo del estímulo y el tiempo de tratamiento.

L I S T A   D E   T A B L A S

TABLA	D E S C R I P C I O N
1	Clasificación de las Crisis Epilépticas de acuerdo a la Liga Internacional contra la Epilepsia.
2	Modelos Animales de Epilepsia Experimental.
3A y B	Principales Reacciones Adversas inducidos por Anticomisales.
4A	Significancias del Estudio Semicuantitativo de la Población Neuronal de la Región CA4 y CA1 de Hipocampo.
4B	Significancias del Estudio Semicuantitativo de la Población Glial de la Región CA4 y CA1 de Hipocampo.

L I S T A   D E   F I G U R A S

FIGURA	D E S C R I P C I O N
1	Esquema de la distribución neuronal de hipocampo
2A y B	Esquemas de las cuadrículas utilizadas para el conteo de CA4 y CA1 del hipocampo, respectivamente.
3A	Microfotografía correspondiente a la región CA4 de los grupos basales.
3B	Microfotografía correspondiente a la región CA1 de los grupos basales.
4A	Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na/7 días.
4B	Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na/14 días.
4C	Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na/28 días.
5A	Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na/7 días.
5B	Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na/14 días.
5C	Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na/28 días.
6A	Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM/7 días.

## FIGURA

## DESCRIPCION

- 6B Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM/14 días.
- 6C Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM/28 días.
- 7A Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/7 días.
- 7B Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/14 días.
- 7C Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/28 días.
- 8A Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/7 días.
- 8B Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/14 días.
- 8C Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/28 días.
- 9A Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/7 días.
- 9B Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/14 días.
- 9C Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/28 días.
- 10A Densidad de la población neuronal de la region CA4 de hipocampo.
- 10B Densidad de la población neuronal de la region CA1 de hipocampo.
- 11A Densidad de la población glial de la region CA4 de hipocampo.
- 11B Densidad de la población glial de la region CA1 de hipocampo.

# I.- INTRODUCCION

## 1.1 Definición y Clasificación de las Epilepsias

La epilepsia es un síntoma de disfunción cerebral, de carácter recurrente, que se caracteriza por una descarga autosostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. La etiopatología de las crisis epilépticas es variada y se pueden presentar tanto por una complicación de accidentes infecciosos, traumáticos, ó tumorales. Asimismo, por alteraciones sistémicas, tales como el lupus eritomatoso; por desordenes metabólicos; por intoxicación medicamentosa o debido a síndromes hereditarios. Por lo anteriormente indicado, la epilepsia per se no se considera como una enfermedad específica sino un síndrome (1). Clínicamente, las epilepsias se manifiestan por crisis convulsivas y no convulsivas generadas por una activación hipersincrónica focal o generalizada de una población de neuronas (2).

Actualmente la Liga Internacional Contra la Epilepsia clasifica las epilepsias segun el tipo de crisis que presenta como se muestra en la Tabla 1 (3).

## 1.2 Modelos Animales de Epilepsia Experimental

Los modelos de epilepsia experimental seleccionados para inducir convulsiones en animales, tratan de simular a las crisis epilépticas descritas en el humano, y aunque no reproducen los eventos fisiopatológicos en su totalidad son útiles para conocer los cambios tisulares ictales y post-ictales de los diferentes tipos de crisis convulsivas, haciendo posible conocer los efectos de las mismas (4,5,6).

Tratando de reproducir las variedades clínicas de crisis epilépticas, los modelos animales de epilepsia han sido la base para la experimentación farmacológica de medicamentos anticomisales. Tanto para las crisis generalizadas como para las focales se han logrado

implementar modelos experimentales de diversa naturaleza que se clasifican de acuerdo al tipo de crisis que causan como se muestran en la Tabla No. 2 (7). Así tenemos por ejemplo, que los fármacos que son

Tabla 1  
CLASIFICACION DE LAS CRISIS EPILEPTICAS DE ACUERDO A LA  
LIGA INTERNACIONAL CONTRA LA EPILEPSIA

PARCIALES	GENERALIZADAS
MOTORAS SENSORIALES SENSORI-MOTORAS AUTONOMICAS VISCERALES COGNITIVAS	AUSENCIA (Pequeño mal) TONICO-CLONICAS (Gran mal) MIOCLONICAS TONICAS CLONICAS ATONICAS
COMPLEJAS	EPILEPSIAS SECUNDARIAMENTE GENERALIZADAS
CON Y SIN AURA CON Y SIN AUTOMATISMOS	
EPILEPSIAS NO CLASIFICADAS	

capaces de inhibir crisis inducidas por electroestimulación supramáxima en ratón y rata se consideran candidatos para la terapia de crisis epilépticas primaria y secundariamente generalizadas en el humano (8,9).

En virtud de la naturaleza de este trabajo se describe a continuación las características de la electroestimulación supramáxima (EESM) para inducir crisis epileptiformes experimentales. Desde 1870 se conoce que los electrochoques en animales pueden producir crisis (10), y para 1946 se logró sistematizar las condiciones para inducir crisis tónico-clónicas (T-C) en rata, al aplicar un estímulo de 60 Hertz (Hz) durante 0.2 segundos con electrodos corneales (11,12). Actualmente en el Laboratorio de Investigación Científica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara, se ha estandarizado la inducción de crisis tónico-clónicas. Las condiciones de la descarga eléctrica son: 130 V, 50 miliamperios durante 0.5 segundos utilizando una fuente de poder con electrodos previamente

humedecidos con solución salina al 0.9% colocados en las sienas de ratas Wistar macho adultas con un peso alrededor de los 250 gramos.

Tabla 2  
MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL

<p>I. PARCIAL SIMPLE, AGUDO</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fármacos convulsionantes               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Penicilina</li> <li>B. Bicuculina</li> <li>C. Picrotoxina</li> <li>D. Estricnina</li> <li>E. Colinérgicos</li> <li>F. Anticolinérgicos</li> </ol> </li> <li>2. Estimulación eléctrica aguda</li> <li>3. Abstinencia al GABA</li> </ol>	<p>II. PARCIAL SIMPLE, CRONICO</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Implantación cortical de metales               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Hidróxido de Aluminio</li> <li>B. Cobalto</li> <li>C. Tungsteno</li> <li>D. Zinc</li> <li>E. Hierro</li> </ol> </li> <li>2. Lesión criogénica</li> <li>3. Inyección de anticuerpos criogénicos</li> <li>4. Kindling</li> </ol>		
<p>III. "STATUS EPILEPTICUS"</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estimulación eléctrica crónica</li> <li>2. Cobalto-homocistina</li> <li>3. Litio pilocarpina</li> </ol>			
<p>IV. CRISIS TONICO-CLONICAS GENERALIZADAS</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genéticas               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Babulinos fotosensitivos (<u>Papio papio</u>)</li> <li>B. Crisis audiogénicas en ratones</li> <li>C. Ratón (cepa SDBA /2, EL (ep) Tottering)</li> <li>D. Mongolian gerbil</li> <li>E. Gallinas</li> <li>F. Perro beagle</li> </ol> </li> <li>2. Electrochoques máximos</li> <li>3. Químicos convulsivos.               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Pentilentetrazol</li> <li>B. Picrotoxina</li> <li>C. Bicuculina</li> <li>D. Penicilina</li> <li>E. Substancia P</li> </ol> </li> </ol> </td> <td style="vertical-align: top;"> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. Trastornos metabólicos               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Hipoxia</li> <li>B. Hipoglucemia</li> <li>C. Uremia</li> <li>D. Alta temperatura</li> <li>E. Abstinencia</li> <li>F. Oxigenación hiperbárica</li> </ol> </li> </ol> </td> </tr> </table>		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genéticas               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Babulinos fotosensitivos (<u>Papio papio</u>)</li> <li>B. Crisis audiogénicas en ratones</li> <li>C. Ratón (cepa SDBA /2, EL (ep) Tottering)</li> <li>D. Mongolian gerbil</li> <li>E. Gallinas</li> <li>F. Perro beagle</li> </ol> </li> <li>2. Electrochoques máximos</li> <li>3. Químicos convulsivos.               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Pentilentetrazol</li> <li>B. Picrotoxina</li> <li>C. Bicuculina</li> <li>D. Penicilina</li> <li>E. Substancia P</li> </ol> </li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Trastornos metabólicos               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Hipoxia</li> <li>B. Hipoglucemia</li> <li>C. Uremia</li> <li>D. Alta temperatura</li> <li>E. Abstinencia</li> <li>F. Oxigenación hiperbárica</li> </ol> </li> </ol>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genéticas               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Babulinos fotosensitivos (<u>Papio papio</u>)</li> <li>B. Crisis audiogénicas en ratones</li> <li>C. Ratón (cepa SDBA /2, EL (ep) Tottering)</li> <li>D. Mongolian gerbil</li> <li>E. Gallinas</li> <li>F. Perro beagle</li> </ol> </li> <li>2. Electrochoques máximos</li> <li>3. Químicos convulsivos.               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Pentilentetrazol</li> <li>B. Picrotoxina</li> <li>C. Bicuculina</li> <li>D. Penicilina</li> <li>E. Substancia P</li> </ol> </li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Trastornos metabólicos               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Hipoxia</li> <li>B. Hipoglucemia</li> <li>C. Uremia</li> <li>D. Alta temperatura</li> <li>E. Abstinencia</li> <li>F. Oxigenación hiperbárica</li> </ol> </li> </ol>		
<p>V. CRISIS DE AUSENCIAS</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estimulación talámica</li> <li>2. Focos corticales bilaterales</li> <li>3. Penicilina sistémica</li> <li>4. Acido gama hidroxibutírico</li> <li>5. Opiáceos intraventriculares</li> </ol>	<p>VI. CRISIS PARCIALES COMPLEJAS</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acido kaínico</li> <li>2. Toxina tetánica</li> <li>3. Kindling</li> <li>4. Rebanadas de cerebro               <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Rebanadas de hipocampo</li> <li>B. Preparaciones de células aisladas</li> </ol> </li> </ol>		

Las crisis inducidas por electrochoques se clasifican según sus manifestaciones motoras en umbrales o máximas.

Las crisis umbrales se caracterizan por una reacción de aturdimiento y por movimientos clónicos localizados en bigotes. cara

orejas y miembros anteriores. Mientras que las crisis T-C inducidas experimentalmente por una estimulación supramáxima presenta una fase tónica en la que se produce una flección y extensión violenta y sostenida de los miembros anteriores y posteriores. La duración de ésta fase es variable y es seguida por contracciones clónicas que sacuden todo el cuerpo rítmicamente (bigotes, cara, orejas, pelo corporal). Posteriormente a éstas manifestaciones sobreviene un relajamiento total y una recuperación paulatina (9,13).

La estimulación supramáxima se difunde por completo en el cerebro y cerebelo estimulando todos los sistemas neuronales dando como resultado una crisis T-C (1,13).

### 1.3 Uso del Difenhidantoinato Sódico como Anticomisal

Las crisis epilépticas afectan por lo menos de 20 a 40 millones de personas en el mundo (14) y como se ha dicho las epilepsias son un estado patológico del sistema nervioso central (SNC) que hasta el momento no tienen cura, siendo uno de los métodos más utilizado para su control es la farmacoterapia.

Dentro de los fármacos utilizados para controlar las crisis generalizadas del tipo tonico-clónico esta la difenhidantoina (DFH) o su presentación de difenhidantoinato sódico (DFH-Na), siendo este no solo el fármaco de elección para control de estas crisis sino la única hidantoina utilizada en la clínica (15).

El DFH-Na fué identificado cómo anticomisal por su efectividad para inhibir las crisis T-C en el modelo de umbral mínimo en gatos (16). Posteriormente, se comprobó su efectividad en el modelo de electroestimulación supramáxima en rata (17), y finalmente en las crisis parciales secundariamente generalizadas en el humano (18), en los cuales se utiliza la dosis de 4mg/kg/día (19,20).

### 1.4 Reacciones Adversas Inducidas por los Anticomisales

Actualmente, hay consenso en que los anticomisales utilizados habitualmente para controlar las crisis epilépticas, entre ellos el

DFH-Na, originan reacciones adversas diversas en las que pueden influir varios aspectos, tales como: edad, embarazo, patologías asociadas, interacciones con otros fármacos o sustancias químicas, aspectos genéticos, la unión del anticomisal a la albúmina plasmática, y los niveles tanto séricos como tisulares del fármaco (21).

La ingestión de los anticomisales como se observa en la Tabla 3A, ocasiona signos y síntomas de disfunción del SNC, y algunos de ellos producen manifestaciones claras de trastorno cerebelar, como es el caso del fenobarbital, la primidona, la carbamazepina y el DFH-Na. Otros anticomisales como el valproato sódico, las benzodiazepinas y etosuximidas no ejercen preferentemente efectos adversos sobre el SNC (Tabla 3B). Los signos y síntomas principales de la intoxicación aguda por DFH-Na son: ataxia, nistagmus y diplopia; principalmente durante la fase aguda de intoxicación por DFH-Na. Los signos generalmente desaparecen cuando se reduce la dosis o cuando se suspende el fármaco y están estrechamente relacionados con los niveles séricos del DFH-Na, aunque puede existir diferencias por sensibilidad individual (22,23).

Asimismo se ha demostrado que la administración crónica del DFH-Na ocasiona alteraciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo celular (24-27) y con la concentración de ácido desoxirribonucleico y proteínas de diversos tejidos (28,29), incluyendo cerebro y cerebelo (30-33). Por otra parte, en la literatura mundial se señala que la administración crónica de DFH-Na está asociada a una disminución en el número de células de Purkinje del cerebelo de rata (34-37), gato (36,38), cerdo (39,40), y mono (41). También se han observado estas alteraciones en necropsias de cadáveres de pacientes epilépticos que estuvieron bajo terapia crónica de DFH-Na (34,42,43). Este hallazgo histopatológico aunado a las manifestaciones clínicas anteriormente mencionadas hacen que el estudio sobre los efectos de los anticomisales sea no solo interesante, sino también importante.

**TABLA 3A**  
**PRINCIPALES REACCIONES ADVERSAS INDUCIDAS POR ANTICOMISIALES**

FENOBARBITAL	PRIMIDONA	CARBAMACEPINA
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hiperexcitabilidad</li> <li>•Somnolencia</li> <li>•Alteraciones del comportamiento</li> <li>•Agranulocitosis</li> <li>•Acción inductora del metabolismo</li> <li>•Alteraciones cognoscitivas</li> <li>•Alteraciones de la conducta</li> <li>•Asterixis</li> <li>•Neuropatías</li> <li>•Anorexia</li> <li>•Extremamiento</li> <li>•Hepatopatías</li> <li>•Dermatitis exfoliativa</li> <li>•Exantema</li> <li>•Síndrome de Stevens Johnson</li> <li>•Contractura de Dupuytren</li> <li>•Hombro congelado</li> <li>•Osteomalacia</li> <li>•Mayor secreción de prolactina</li> <li>•Disminución del crecimiento en niños</li> <li>•Aumento de HDL colesterol</li> <li>•Alteraciones tiroideas</li> <li>•Déficit de ácido fólico</li> <li>•Macrocitosis</li> <li>•Anemia megaloblástica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Somnolencia</li> <li>•Alteraciones del comportamiento</li> <li>•Nistagmus</li> <li>•Vertigo</li> <li>•Diplopía</li> <li>•Sedación</li> <li>•Alteraciones cognoscitivas</li> <li>•Neuropatías</li> <li>•Anorexia</li> <li>•Vómito</li> <li>•Dermatitis exfoliativa</li> <li>•Síndrome de Stevens Johnson</li> <li>•Hipertrofia gingival</li> <li>•Hombro congelado</li> <li>•Cristaluria</li> <li>•Alteraciones tiroideas</li> <li>•Déficit de ácido fólico</li> <li>•Macrocitosis</li> <li>•Anemia aplásica</li> <li>•Lupus eritematoso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Exantema</li> <li>•Nistagmus</li> <li>•Ataxia</li> <li>•Vertigo</li> <li>•Alteraciones del comportamiento</li> <li>•Sedación</li> <li>•Alteraciones cognoscitivas</li> <li>•Discinecias</li> <li>•Asterixis</li> <li>•Encefalopatía</li> <li>•Neuropatías</li> <li>•Anorexia</li> <li>•Aumento de peso</li> <li>•Nauseas</li> <li>•Extremamiento</li> <li>•Hepatopatías</li> <li>•Exantema</li> <li>•Dermatitis exfoliativa</li> <li>•Síndrome de Stevens Johnson</li> <li>•Bradycardia</li> <li>•Bloqueo Auriculoventricular</li> <li>•Nefropatías</li> <li>•Hiponatremia e intoxicación acuosa</li> <li>•Mayor secreción de prolactina</li> <li>•Aumento de HDL colesterol</li> <li>•Déficit de ácido fólico</li> <li>•Macrocitosis</li> <li>•Anemia aplásica</li> <li>•Agranulocitosis</li> <li>•Lupus eritematoso</li> </ul>

DIFENILHIDANTOINATO SODICO		
•Sedación	•Agranulocitosis	•Hepatopatías
•Neuropatías	•Hipertricosis e hirsutismo	•Bradycardia
•Encefalopatía	•Exantema	•Trastornos tiroides
•Discinecias	•Déficit de ácido fólico	•Anemia aplásica
•Alteraciones de la glucemia	•Alteraciones cognositivas	•Macrocitosis
•Asterixis	•Miopatías	•Anemia megaloblástica
•Temblor	•Hiperplasia gingival	•Alteraciones de la conducta
•Dermatitis exfoliativa	•Osteomalacia	•Anorexia
•Mayor secreción de FSH y LH	•Seudolinfoma	•Síndrome de Stevens-Johnson
•Alteraciones psiquiátricas	•Cloasmas	•Hipotensión
•Nefropatías: trimetadona	•Macrocitosis	•Aumento de HDL colesterol
•Lupus eritematoso	•Bloqueo auriculo-ventricular	•Mayor secreción de prolactina
		•Déficit de IgA, M, G

TABLA 3B  
PRINCIPALES REACCIONES ADVERSAS INDUCIDAS POR ANTICOMISALES

VALPROATO SODICO		
•Neuropatía	•Alteraciones cognositivas	•Alteraciones de la conducta
•Sedación	•Alopesia y cambio de textura y color del pelo	•Trombocitopenia
•Asterixis	•Déficit de ácido fólico	•Trastronos tiroides
•Temblor	•Hepatopatías	•Anemia aplásica
•Aumento de peso	•Hiperamonemia	•Macrocitosis
•Aumento de apetito		•Poliuria y enuresis
•Diarrea		•Pancreatitis
•Nauseas y vómito		•Aumento de HDL colesterol
•Anorexia		
BENZODIACEPINAS	ETOSUXIMIDAS	
•Sedación	•Discinecias	
•Encefalopatía	•Alteraciones psiquiátricas	
•Alteraciones psiquiátricas	•Exantemas	
•Anemia aplásica	•Anemia aplásica	
•Agranulocitosis		
•Lupus eritematoso		

### 1.5 Efecto de las Crisis Epilépticas sobre el Tejido Neuronal

Las evidencias clínicas de un posible daño cerebelar asociada a la administración de DFH-Na fueron descritas por primera vez por Merrit y Putnam en 1939 (44). Sin embargo, existe hasta la fecha, una gran controversia para establecer el agente etiopatogénico del daño neuronal que se observa en el paciente epiléptico, ya que existen

evidencias de daño reportadas desde 1825, esto es, antes de la introducción de los anticomisales en la farmacoterapia en las cuales se describen cambios atróficos localizados en el uncus e hipocampo de pacientes epilépticos (45). Asimismo, en el estudio clásico de Sommer, se estableció el patrón del daño histológico conocido como la esclerosis del cuerno de Ammon o esclerosis hipocampal, en la cual se presenta una pérdida selectiva de células piramidales (46). Estudios subsecuentes han revelado pérdida de células piramidales en neocorteza, células de Purkinje en cerebelo y frecuentemente de las neuronas de los núcleos talámicos y amigdalinos de pacientes epilépticos (47). Originalmente, se estableció que éstos cambios patológicos éran debidos a una hipoxia celular (48), sin embargo, estudios recientes han demostrado que animales bien oxigenados y con una función cardiovascular adecuada, sometidos a un periodo de aproximadamente 2 horas de "status epilepticus" causa necrosis neuronal moderada en la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo (49). Otros estudios hechos en ratas mostraron que el sometimiento de éstas a "status epilepticus" causa invariablemente infarto de la substancia nigra con algunas afecciones del globus palidus (50) y daño en hipocampo (51). Algunos de los eventos registrados durante las crisis epilépticas que apoyan la idea de que las crisis pudieran causar daño neuronal son: la acidosis láctica no hipóxica en el cerebro, debida a la frecuente despolarización de la membrana neuronal por las descargas epilépticas, que requiere de un mayor gasto de energía para mantener los gradientes iónicos (52); la existencia de un deterioro en el estado energético del tejido, con una dramática pérdida de la homeostasis iónica, la disminución del sistema celular redox (53), y las cantidades citotóxicas de calcio intracelular presentes durante la crisis epiléptica (54). Tomando en cuenta las evidencias de daño neuronal causados por DFH-Na así como las que se observan en presencia de crisis en ausencia del fármaco, podemos

1  
pensar que es posible que la lesión neuronal sea de origen multifactorial, contribuyendo tanto las crisis convulsivas, como los factores genéticos y la exposición a los fármacos anticonvulsivos.

En el presente estudio pretendimos dilucidar el agente etiopatogénico del daño neuronal utilizando el modelo de electroestimulación supramáxima (EESM) en rata concomitantemente al tratamiento con DFH-Na y analizando los cambios en la población celular del hipocampo, ya que actualmente se conoce que esta región neuronal es una de las más susceptibles a estados de estrés, pudiendo ser desde un estado anóxico (55) hasta un incremento en la estimulación neuronal (56), o el sometimiento a fármacos que tengan la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (48), como es el caso del difenilhidantoinato sódico (47). Debido a dicha susceptibilidad se eligió trabajar con las regiones CA<sub>1</sub> que normalmente presenta una arquitectura laminar delgada, formada por 3 ó 4 células piramidales de grosor. La morfología normal de la región CA<sub>4</sub> presenta un arreglo laminar difuso de células piramidales. La compactación de la región CA<sub>4</sub> va aumentando conforme se acerca a la región CA<sub>3</sub> (66).

## II.- HIPOTESIS

LA ADMINISTRACION DE DIFENLHIDANTOINATO SODICO Y LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR ELECTROESTIMULACION SUPRAMAXIMA CAUSAN ALTERACIONES EN EL CONTENIDO CELULAR DE HIPOCAMPO.

**III.- O B J E T I V O**

Conocer el efecto independiente y combinado de la estimulación supramáxima y la ingestión de difenilhidantoinato sódico en rata Wistar adulta sobre la celularidad del hipocampo durante 7, 14 y 28 días de tratamiento.

#### IV.- METODOLOGIA

Para lograr el objetivo de este trabajo se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar, machos, positivas a la EESM y con un peso corporal entre 200 y 250 gramos. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de bioterio con agua y alimento ad libitum. Se prepararon 5 grupos control y el experimental, los cuales se subdividieron en 3 subgrupos en función de los tiempos que duraron las condiciones que caracterizaron a cada uno de ellos. Los tiempos fueron de 7, 14, y 28 días. Cada subgrupo comprendió de 10 a 15 ratas (57).

##### 4.1 Condiciones de los Grupos Control

**DFH-Na:** Este grupo recibió una dosis única diaria de una solución de DFH-Na de 30 mg/ml (58) a razón de 30 mg/kg. El vehículo que se utilizó para el fármaco fue una solución de sacarosa al 50% preparada con agua bidestilada. Estas soluciones se prepararon al momento de utilizarse.

**VEHICULO:** A este grupo se les administró una dosis diaria, de un volumen de solución sacarosa al 50% proporcional al que se administró al control-DFH-Na de acuerdo con su peso.

**EESM:** En este grupo, se les aplicó a las ratas una estimulación eléctrica de 130 volts, 50 miliamperios, durante 0.5 segundos utilizando electrodos humedecidos en solución salina fisiológica colocados en las sienas. Todos los animales presentaron una crisis tónico-clónica durante los días señalados.

**VEHICULO/EESM:** Este grupo fue dosificado de la misma manera que el grupo control-VEHICULO y además recibió un estímulo al día de las mismas características que el grupo control-EESM 3 horas después de haber sido dosificadas.

**BASAL:** Este grupo no recibió ninguno de los tratamientos anteriormente indicados.

## 4.2 Condiciones del Grupo Experimental

**DFH-Na/EESM:** Este grupo fué dosificado de la misma manera que el grupo control-DFH-Na y además recibió un estímulo diario de las mismas características que el grupo control-EESM, 3 horas después de haber sido dosificadas.

Una vez concluido los periodos de 7, 14 y 28 días, respectivamente, las ratas correspondientes fueron sacrificadas por decapitación bajo leve anestesia con éter obteniéndose por craneotomía el cerebro. Dicho órgano se sometió al tratamiento morfológico, consistente en fijar el tejido en una solución de formol al 10% amortiguado en fosfatos 0.10 M pH 7.3 durante 24 horas a temperatura ambiente (59). Se procedió a hacer los cortes a nivel de la eminencia media para exponer el hipocampo dorsal(60). Posteriormente se incluyeron en parafina para realizar cortes de esta región de 3 a 4  $\mu$  de espesor que fueron teñidos por la técnica de hematoxilina-eosina (61). Posteriormente se hizo un análisis semicuantitativo y un estudio histopatológico de los cortes del hipocampo a diferentes profundidades.

Para el estudio histológico semicuantitativo se utilizó un proyector de laminillas mediante el cual se proyectó la imagen correspondiente a la región CA4 y CA1 de hipocampo, (Figura 1) respectivamente sobre un área cuadrículada con una superficie de 138.55  $\text{cm}^2$  con la que sustituimos la rejilla empleada en el trabajo original de Weibel (62) que correspondería a un área de 1.3855  $\text{cm}^2$  en la laminilla, con una amplificación de 40X (Figura 2a). La fórmula utilizada para establecer el número de células presentes en el área de estudio fué la siguiente:  $SV = 2I/L$ . En donde: SV es la densidad numérica de superficie, I es el número de células que coinciden con las intersecciones y L es la equivalente del área en el tejido.

La metodología utilizada para la cuantificación de CA4 no fué útil para contar la distribución celular de la región CA1 ya que es

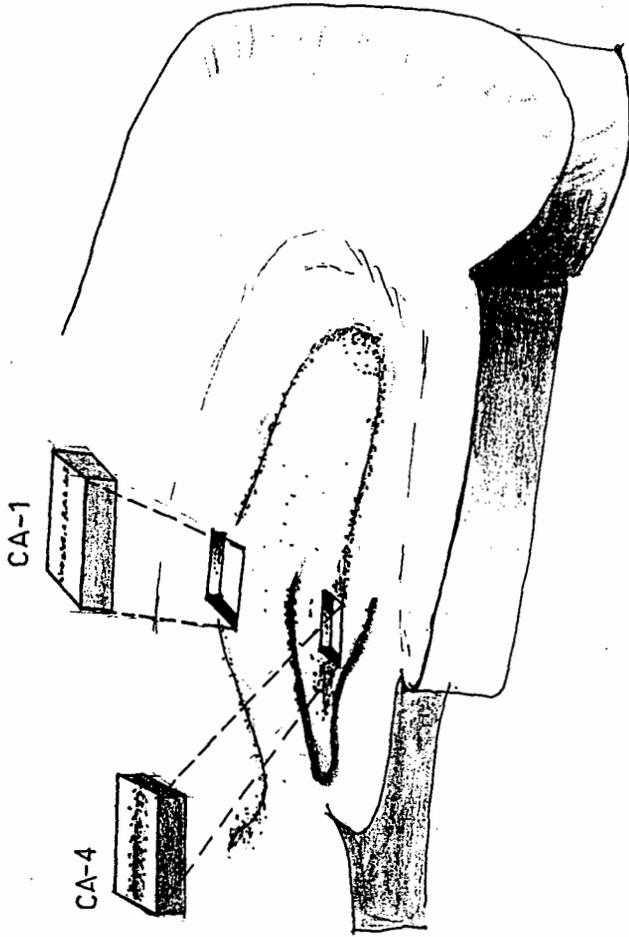


FIGURA 1

Esquema de la distribución neuronal de hipocampo

mas compacta. En este caso se delimitó una superficie equivalente a  $1 \text{ cm}^2$  de la laminilla sobre la cual se proyectó de la manera descrita anteriormente para CA4, una placa histológica y se contaron todas las células cuyo núcleo completo se encontrara dentro de la superficie delimitada (Figura 2b).

Posteriormente se calculó la media aritmética y la desviación estandar para posteriormente aplicar la prueba T de student (63) con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  con el objeto de establecer las diferencias estadísticamente significativas entre las densidades celulares tanto de neuronas como de células gliales de las regiones CA4 y CA1 del hipocampo dorsal en los grupos control y experimentales.


FIGURA 2A

Esquema de las cuadrículas utilizadas para el conteo de CA4

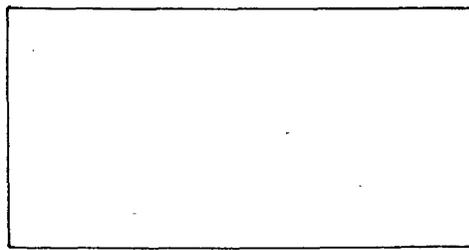
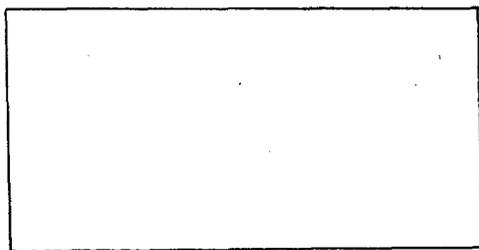


FIGURA 2B

Esquema de las cuadrículas utilizadas para el conteo de CA1

10 - 15 RATAS/SUBGRUPO, ADULTAS, DE LA CEPA WISTAR, 250 GRS DE PESO PROMEDIO, MACHOS, EESM POSITIVAS

**CONTROL-DFH-Na**  
(30 MG/KG)  
BOSIS UNICA POR VIA ORAL DIARIAMENTE EN SACAROSA AL 50%

**CONTROL-VEHICULO**  
0.5 ML DE SOL'N SACAROSA AL 50% EN AGUA BIDESTILADA, VIA ORAL

**CONTROL-EESM**  
130 U, 0.5 s  
1 VEZ AL DIA CON ELECTRODOS HUMEDECIDOS EN SOLUCION SALINA AL 0.9%

**CONTROL-VEHICULO-EESM**  
0.5 ML DE SOL'N DE SACAROSA AL 50%, 3 HORAS ANTES DE LA EESM

**CONTROL-BASAL**  
SIN NINGUN TRATAMIENTO

**EXPERIMENTAL-DFH-Na-EESM**  
DOSIS DE 30 MG/KG DE DFH-Na, 3 HORAS ANTES DE LA EESM

OBTENCION DEL CEREBRO DE LAS RATAS DE LOS RESPECTIVOS SUBGRUPOS A LOS 7, 14 Y 28 DIAS DE INICIADO EL TRATAMIENTO SEÑALADO MEDIANTE DECAPITACION Y DISECCION POR CRANEO-TOMIA.

PROCESAMIENTO HISTOLOGICO DE CEREBRO MEDIANTE TECNICAS CONVENCIONALES DE INCLUSION EN PARAFINA, CORTES CORONALES DEL BLOQUE Y TINCION CON HE-MATOXILINA Y EOSINA.

DETERMINACION DE LA DENSIDAD CELULAR DE LAS REGIONES CA4 Y CA1 DE HIPOCAMPO DE RATA UTILIZANDO UN PROYECTOR DE LAMINILLAS CON OBJETIVO 40x.

EVALUACION HISTOPATOLOGICA DE LAS CELULAS PIRAMIDALES Y GLIA DE LA REGION CA4 Y CA1 DE HIPOCAMPO DE RATA EN TODOS LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

CALCULO DE LA MEDIA, DESVIACION ESTANDAR Y ERROR ESTANDAR DE LAS NEURONAS Y GLIA DE CADA REGION, APLICACION DE LA PRUEBA "t" DE STUDENT PARA CONOCER LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS.

## VI.-R E S U L T A D O S

### 6.1 Descripción Histopatológico de la Region CA4 Y CA1 Hipocampo

Al observar los cortes de hipocampo de los grupos estudiados se observó que las regiones CA4 y CA1 eran las áreas visiblemente más dañadas por lo que se procedió a realizar el estudio histopatológico de las mismas.

#### 6.1.1. Grupo Basal

La región CA4 y CA1 del hipocampo de rata tanto del grupo BASAL como de los subgrupos CONTROL-VEHICULO mostraron los arreglos típicos celulares por lo que no fué el procesamiento histológico el que causó daño observado en nuestros grupos experimentales (Fig. 3A y Fig. 3B).

#### 6.1.2. Grupos Control-DFH-Na

Las observaciones realizadas en los grupos CONTROL-DFH-Na fueron diferentes para la region CA4 y CA1 del hipocampo. En la region CA4 se observa una gliosis difusa ligera a partir de los 7 días, (Fig. 4A); degeneración inicial celular y picnosis a los 14 días (Fig. 4B) y gliosis difusa y degeneración neuronal que va desde incipiente hasta muerte con retracción de todo el tejido a los 28 días de tratamiento (Fig. 4C). En cambio, en la region CA1 existe gliosis difusa desde los 7 días y se observa disgregación de la cromatina en los núcleos de las células piramidales (Fig. 5A). A los 14 días únicamente se observa gliosis difusa (Fig. 5B) y a los 28 días se observan áreas con neuropilo grumoso, ligeras alteraciones que contrastan con figuras hipercrómicas retraídas, nucleos claros con desorganización del material cromatínico (grumos y halos claros), pérdida del nucleolo, y finalmente citoplasma hipercrómico y grumoso (Fig. 5C).

#### 6.1.3. Grupos Control-EESM

La región CA4 de los subgrupos del grupo CONTROL-EESM presentan neuropilo esponjoso y laxo, gliosis y zonas de degeneración neuronal consistentes en desorganización y disrupción del material nuclear formando grumos y halos claros, pérdida del

nucleolo, citoplasma hiperocrómico y grumoso, y retracción celular en algunas zonas a los 7 días de tratamiento (Fig. 6A). Se hace evidente neuropilo grumoso y laxo en algunas zonas, desorganización y disrupción del material nuclear a los 14 días (Fig. 6B), y gliosis; degeneración neuronal consistente en neuropilo grumoso y laxo, desorganización y disrupción del material nuclear, se observan figuras hiperocrómicas con retracción celular a los 28 días (Fig. 6C).

La región CA1 de los grupos EESM/7 días mostraron gliosis severa. neuropilo grumoso, degeneración neuronal consistente en disrupción del material cromatínico, con pérdida de su organización, nucleolos grandes con contornos irregulares, y figuras hiperocrómicas (Fig. 7A). Por su parte, las muestras correspondientes al grupo EESM/14 días mostraron gliosis, neuropilo grumoso, patron histológico degenerativo (núcleos grandes de contornos irregulares), cromatina en grumos, en algunos con halos claros y citoplasma hiperocrómico (Fig. 7B). El grupo EESM/28 días mostró gliosis moderada, neuropilo grumoso y esponjoso; degeneración neuronal consistente en células con núcleos grandes de contornos irregulares, cromatina disrupta y desorganizada (grumos y halos), en la mayoría de las células no se ve el citoplasma (Fig. 7C).

El grupo VEHICULO/EESM mostró características similares al grupo control-EESM por lo que no se anexan figuras.

#### 6.1.4. Grupos Experimentales DFH-Na/EESM

En la región CA4 de los grupos experimentales DFH-Na/EESM se observa gliosis difusa, neuropilo homogéneo, núcleo y cromatina normal, y algunos núcleos se encuentran con disgregación de la cromatina a los 7 días (Fig. 8A). A los 14 días se observa gliosis ligera y neuronas con alteraciones degenerativas (Fig. 8B) y a los 28 días se observa gliosis y neuronas con alteraciones degenerativas (pérdida del contorno del núcleo, disgregación y disrupción de la cromatina nuclear con pérdida del nucleolo y formación de halos y

grumos en su interior) (Fig. 8C).

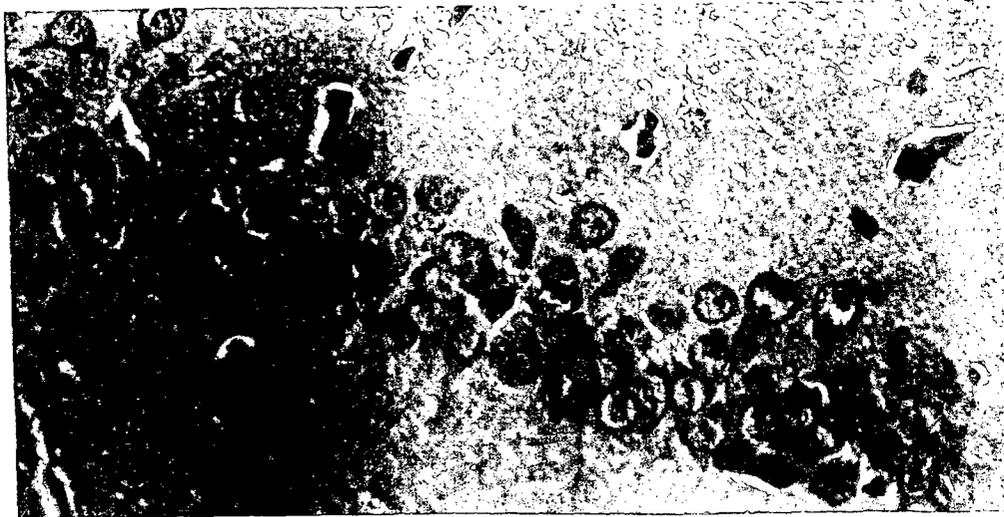
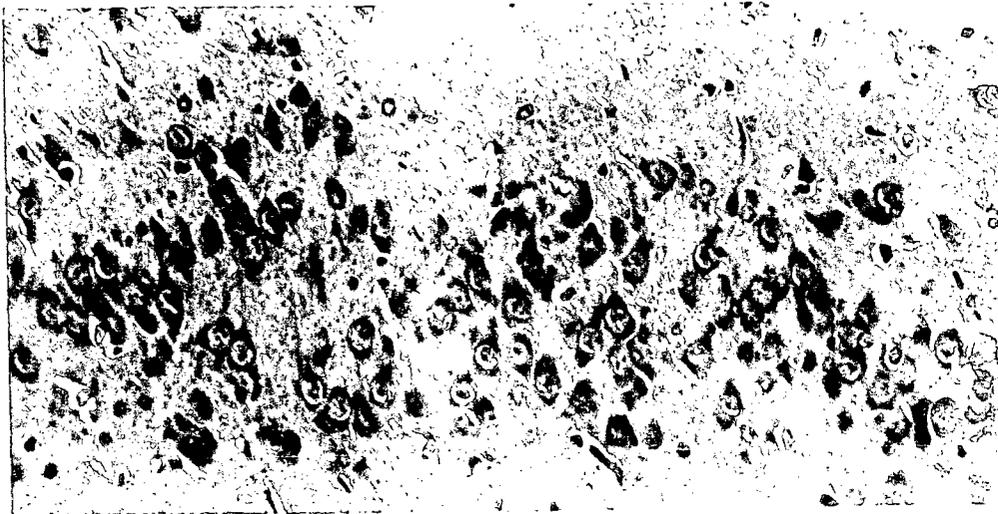
Por otro lado, la región CA1 mostró gliosis y neuropilo esponjoso; células con núcleos picnóticos, retracción celular, neuronofagia y zonas de muerte celular a los 7 días (Fig. 9A); gliosis abundante, neuropilo grumoso y esponjoso, degeneración neuronal incipiente, degeneración y disrupción del material nuclear a los 14 días (Fig. 9B); así como neuropilo grumoso y esponjoso, y neuronas con alteraciones degenerativas a los 28 días (Fig 9C).

## FIGURA 3A

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo basal (100X).

## FIGURA 3B

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo basal (150X).

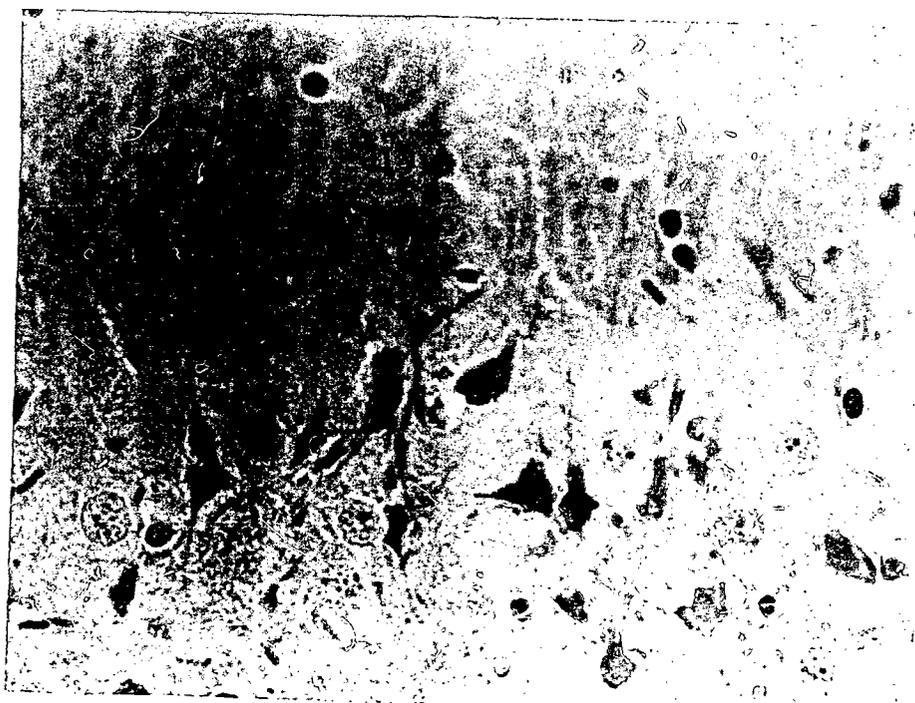
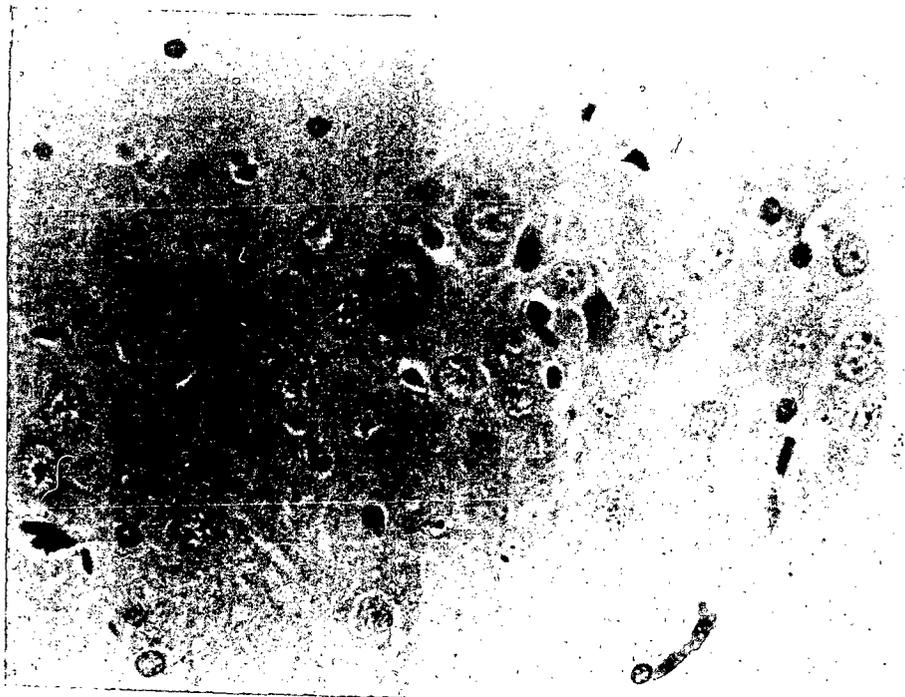


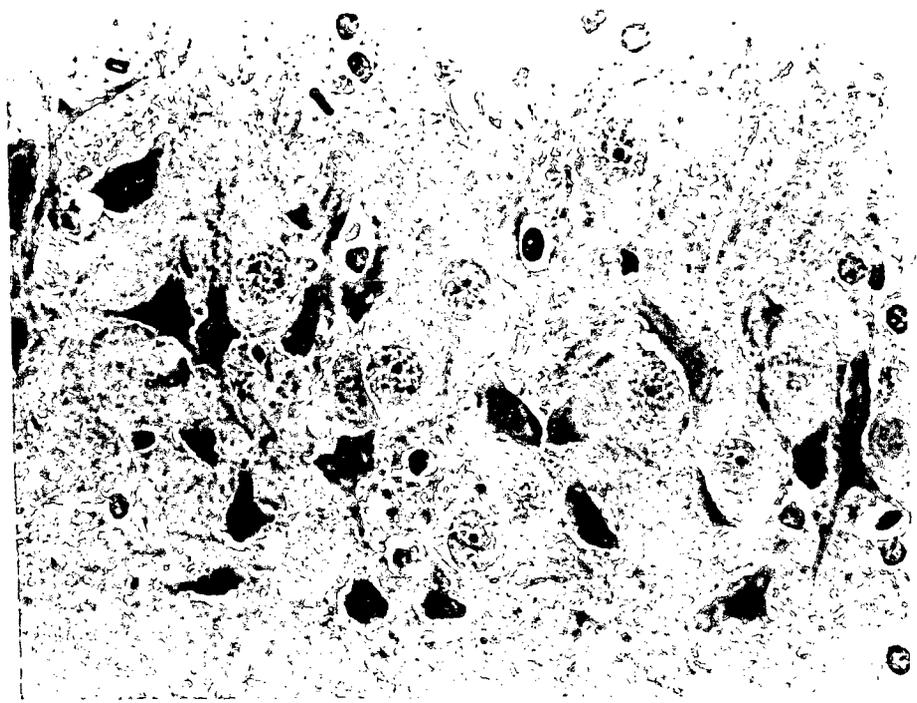
## FIGURA 4A

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na/7 días (150X).

## FIGURA 4B

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na/14 días (150X).



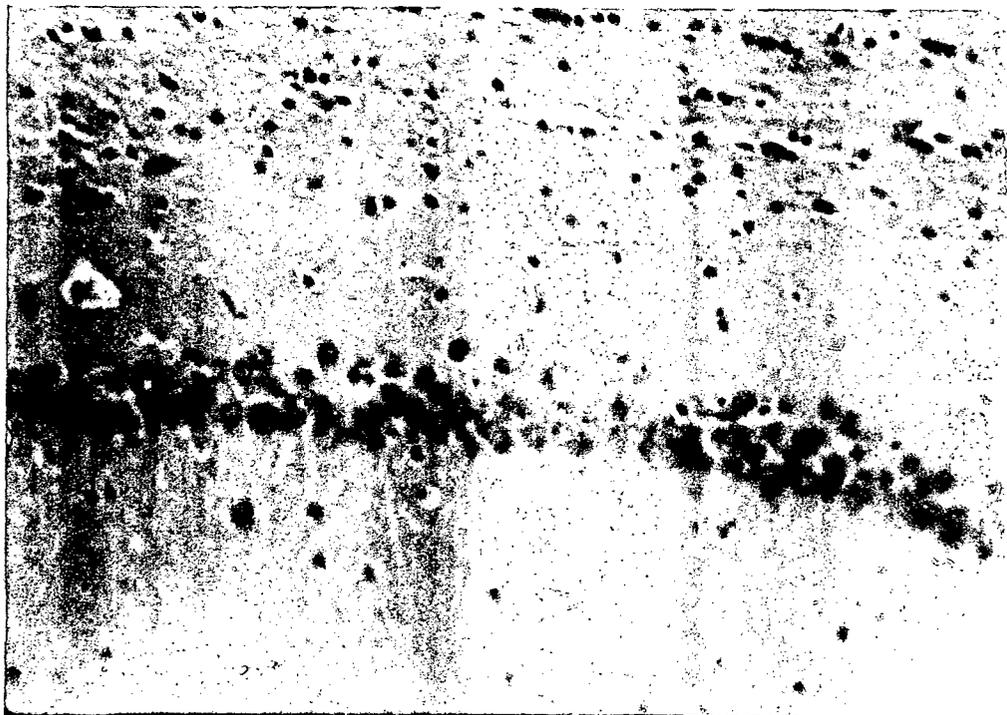
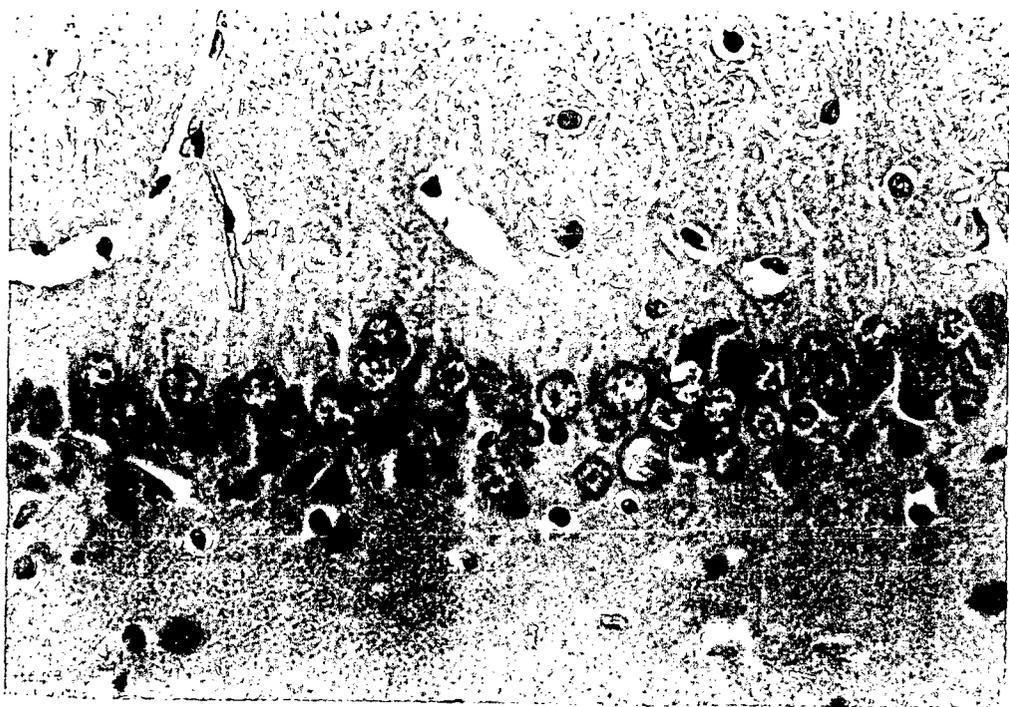


## FIGURA 5A

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na/7 días (150X).

## FIGURA 5B

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na/14 días (100X).





## FIGURA 6A

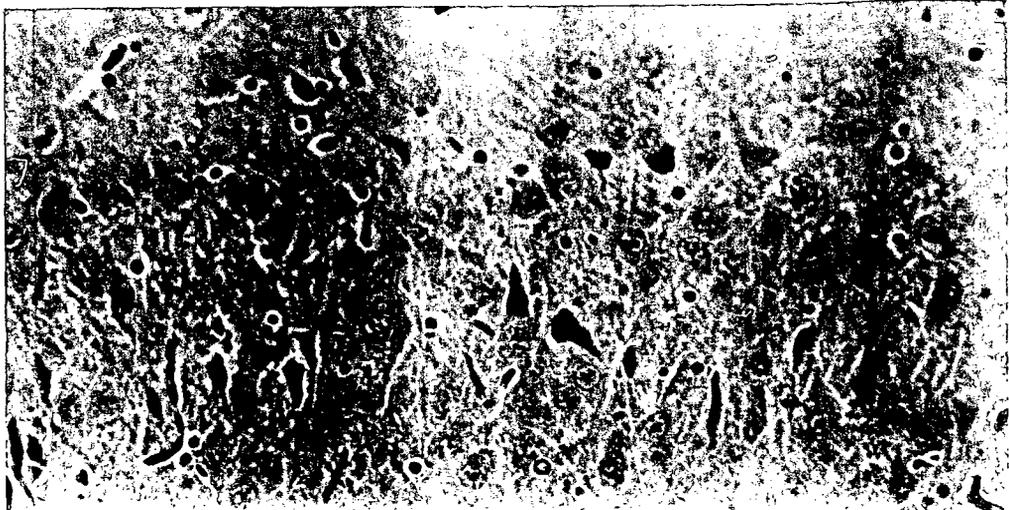
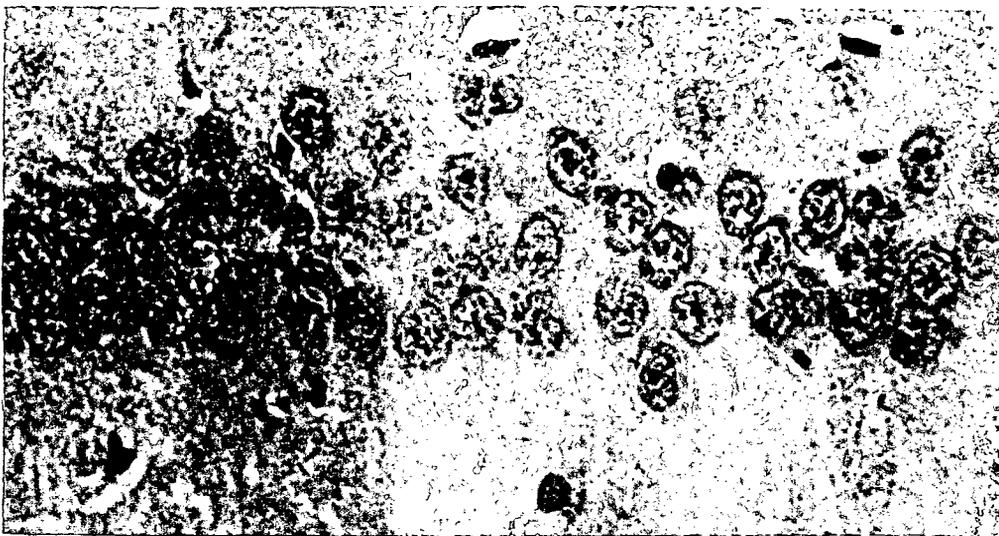
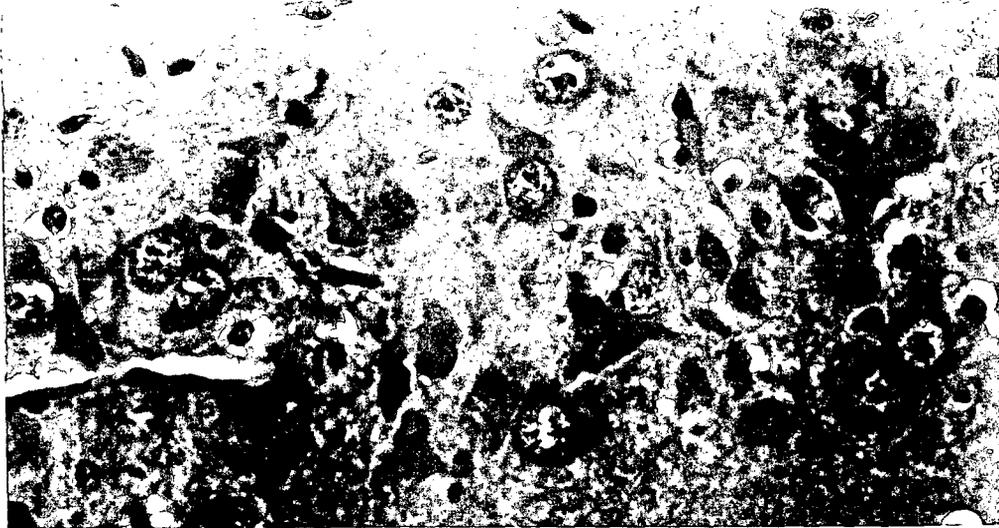
Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM/7 días (100X).

## FIGURA 6B

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM\14 días (100X).

## FIGURA 6C

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo EESM/28 días (100X).



## FIGURA 7A

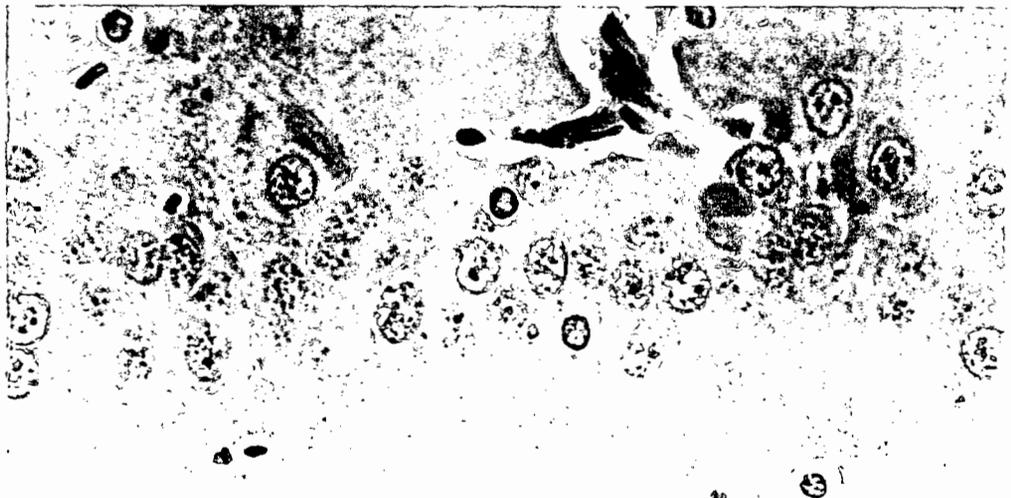
Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/7 días (150X).

## FIGURA 7B

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/14 días (150X).

## FIGURA 7C

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo EESM/28 días (150X).



## FIGURA 8A

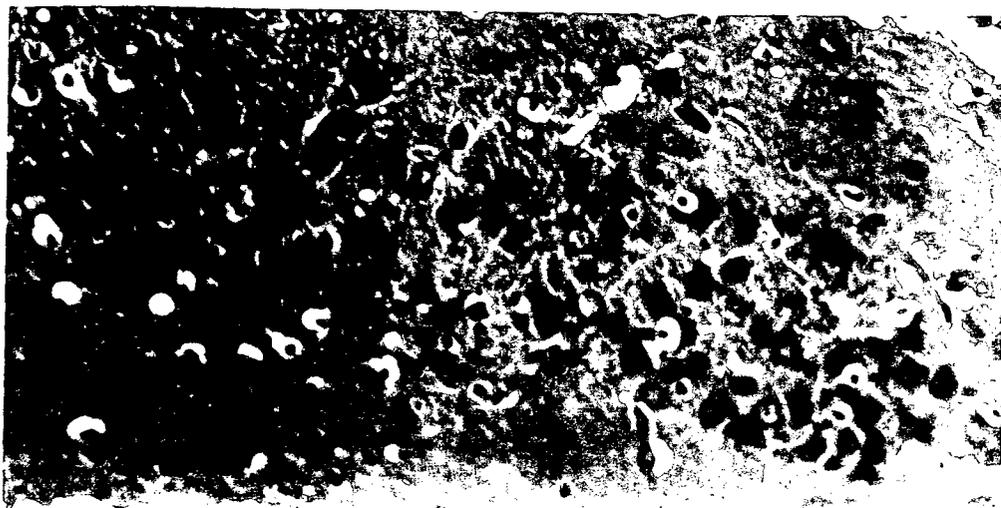
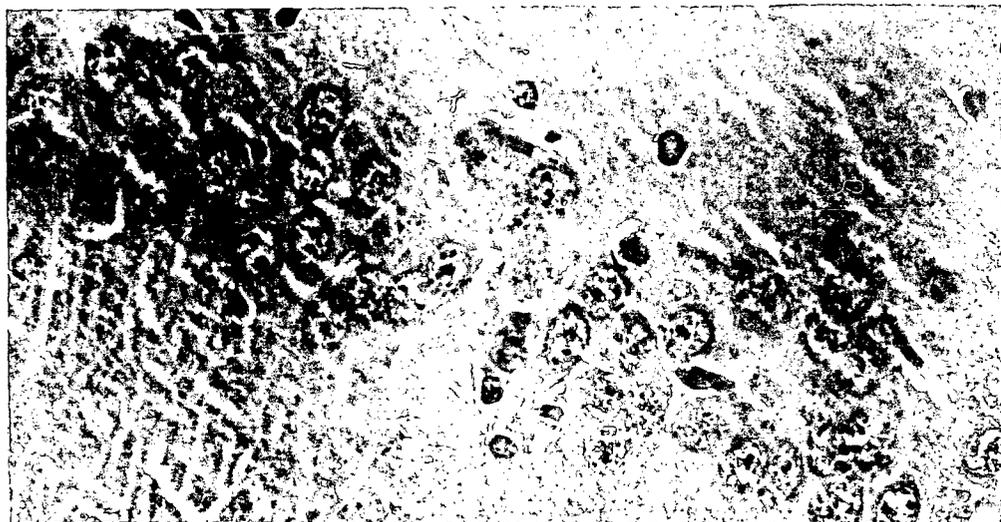
Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/7 días (100X).

## FIGURA 8B

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/14 días (150X).

## FIGURA 8C

Microfotografía correspondiente a la región CA4 del grupo DFH-Na-EESM/28 días (100X).



## FIGURA 9A

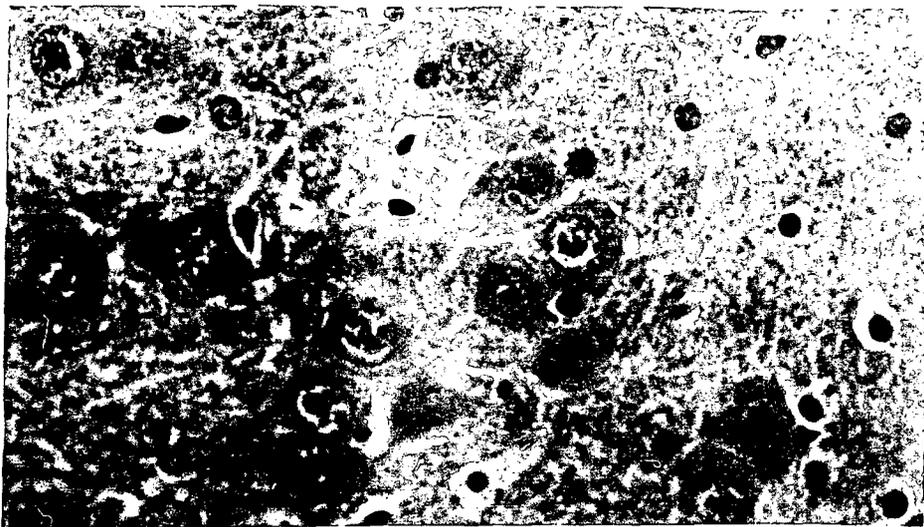
Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/7 días (150X).

## FIGURA 9B

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/14 días (100X).

## FIGURA 9C

Microfotografía correspondiente a la región CA1 del grupo DFH-Na-EESM/28 días (150X).



## 6.2 Descripción del Estudio Semicuantitativo de la Región CA1 y CA4 de Hipocampo

La población neuronal y glial tanto de la región CA4 y CA1 del hipocampo de rata mostraron comportamientos diferentes.

En la población neuronal en la región CA4 observamos una disminución de la densidad neuronal en los diferentes subgrupos a los 7 días, pero siendo únicamente significativa en el grupo experimental DFH-Na/EESM ( $p < 0.02$ ). El aparente incremento en la densidad neuronal que se observa en algunos de nuestros grupos (ver Fig. 10a y Discusión) fueron estadísticamente significativos.

La población neuronal de la región CA1 muestra una clara disminución estadísticamente significativa en casi la totalidad de los grupos estudiados independientemente del periodo de tratamiento (Figura 10b y Tabla 4a).

Por otra parte la población glial mostró una tendencia a incrementar su densidad, siendo más significativo el aumento que mostraron los subgrupos control-DFH-Na que los del grupo control-EESM, en todos los periodos estudiados mientras que el estímulo combinado (DFH-Na/EESM) potencia el aumento de la densidad en la población glial (Figura 11 y Tabla 4b). La disminución que se observa en la población glial de la región CA1 del grupo control-EESM resultó ser estadísticamente no significativa. En este grupo las alteraciones cuantitativamente significativas fueron observables hasta el día 28 de tratamiento manifestándose en un aumento en la densidad de la población glial (Figura 11b y Tabla 4b).

Al comparar los subgrupos DFH-Na/EESM de la región CA1 entre sí observamos una disminución en la población glial a los 14 y 28 días con una significancia de  $p < 0.05$  al compararlos con el subgrupo de 7 días, sin llegar a los valores del control. Esta disminución podría deberse a la acción de la electroestimulación directa o indirectamente sobre la población glial (Figura 11b).

**DENSIDAD DE LA POBLACION NEURONAL DE LA REGION CA4 DE HIPOCAMPO**

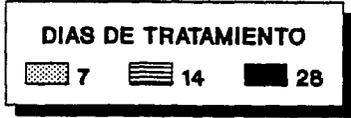
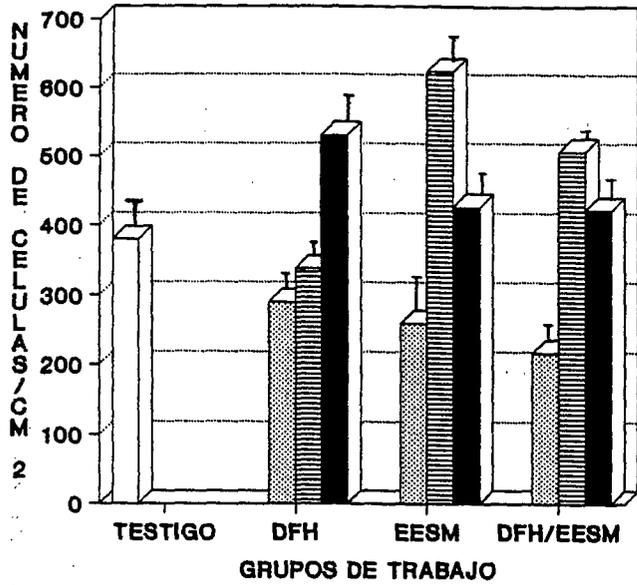


FIGURA 10A

**DENSIDAD DE LA POBLACION NEURONAL DE LA REGION CA1 DE HIPOCAMPO**

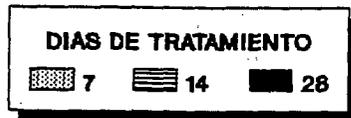
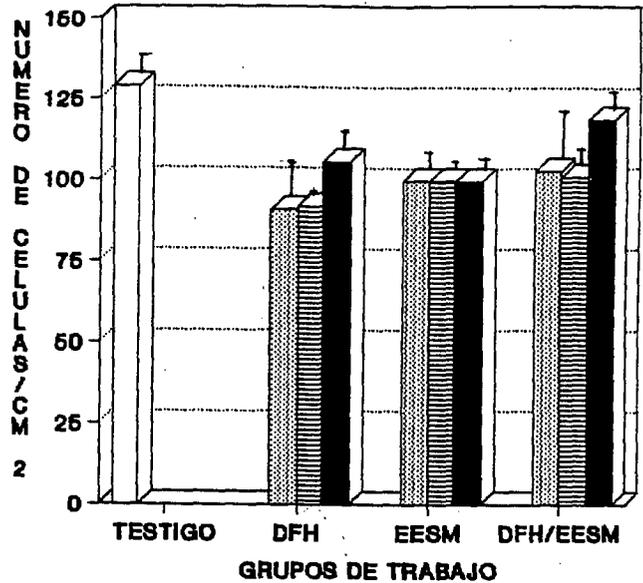


FIGURA 10B

### DENSIDAD DE LA POBLACION GLIAL DE LA REGION CA4 DE HIPOCAMPO

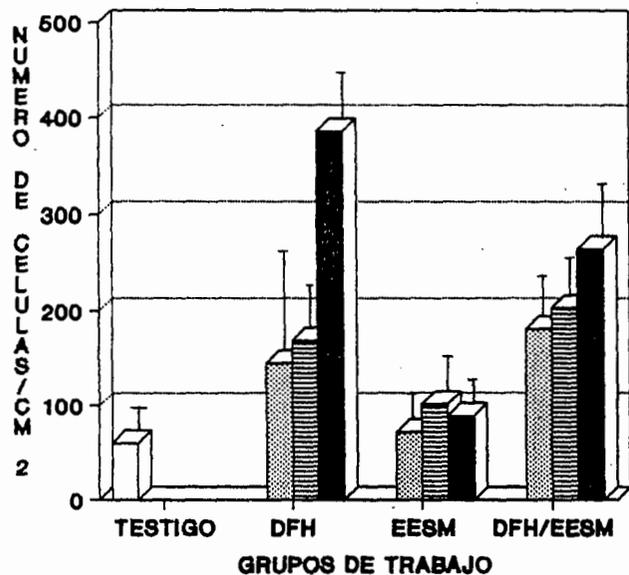


FIGURA 11A

### DENSIDAD DE LA POBLACION GLIAL DE DE REGION CA1 DE HIPOCAMPO

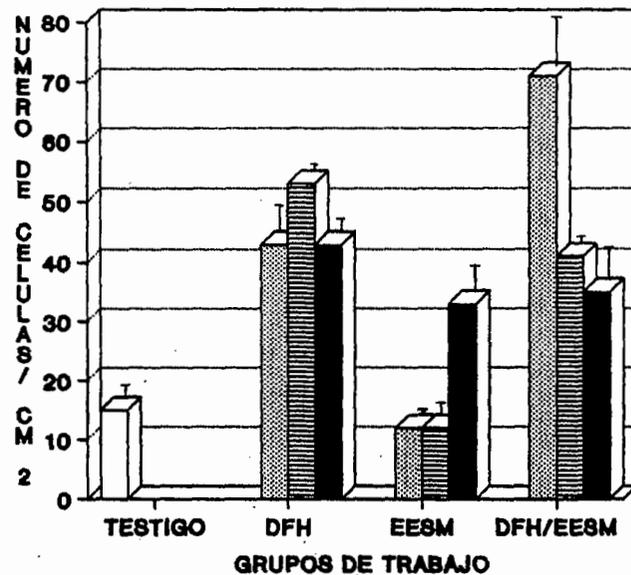


FIGURA 11B

TABLA 4A.

SIGNIFICANCIAS ESTADISTICAS DEL ESTUDIO SEMICUANTITATIVO DE LA POBLACION NEURONAL DE LA REGION CA4 Y CA1 DE HIPOCAMPO

		REGION CA4			REGION CA1		
GRUPOS COMPARADOS		VALOR DE P			VALOR DE P		
		DIAS DE TRATAMIENTO			DIAS DE TRATAMIENTO		
		7	14	28	7	14	28
BASAL	DFH-Na	N.S.	N.S.	<0.05	<0.01	<0.001	<0.02
BASAL	EESM	N.S.	<0.001	N.S.	<0.01	<0.001	<0.001
BASAL	DFH-Na/EESM	<0.02	<0.05	N.S.	<0.05	<0.01	N.S.
DFH-Na	EESM	N.S.	<0.001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
DFH-Na	DFH-Na/EESM	N.S.	<0.02	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
EESM	DFH-Na/EESM	N.S.	<0.001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

TABLA 4B

SIGNIFICANCIAS ESTADISTICAS DEL ESTUDIO SEMICUANTITATIVO DE LA POBLACION GLIAL DE LA REGION CA4 Y CA1 DE HIPOCAMPO

		REGION CA4			REGION CA1		
GRUPOS COMPARADOS		VALOR DE P			VALOR DE P		
		DIAS DE TRATAMIENTO			DIAS DE TRATAMIENTO		
		7	14	28	7	14	28
BASAL	DFH-Na	N.S.	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BASAL	EESM	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0.001
BASAL	DFH-Na/EESM	<0.05	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
DFH-Na	EESM	N.S.	N.S.	<0.001	<0.001	<0.001	N.S.
DFH-Na	DFH-Na/EESM	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
EESM	DFH-Na/EESM	<0.05	N.S.	<0.001	<0.001	<0.01	N.S.

## VII.- D I S C U S I O N

Hasta el momento actual ha permanecido el enigma de cómo las crisis epilépticas o ciertos fármacos afectan ciertas neuronas selectivamente vulnerables. La mayoría de los estudios se han enfocado al estudio de áreas cerebrales de individuos con epilepsias de lóbulo temporal, aunque dichas investigaciones se dificultan por la incapacidad para separar el efecto de los fármacos administrados de las crisis en sí.

Para aclarar esto, el abordaje experimental utilizado para analizar alteraciones tisulares observados en individuos con epilepsia se ha hecho en animales utilizando ya sea un agente químico exógeno, un tratamiento físico o una cepa que genéticamente exhibe crisis.

En el modelo que se utilizó en este estudio se reproduce las condiciones de los individuos con crisis tónico-clónicas generalizadas, para el cual formamos 4 grupos controles, los cuales nos permitieron diferenciar mediante un estudio semicuantitativo y un análisis histopatológico el efecto tanto de las crisis como del DFH-Na, sobre las poblaciones celulares del hipocampo, así como observar el efecto potenciador en las poblaciones neuronales del hipocampo que se involucra al combinar ambos efectos.

Ya en estudios anteriores se ha demostrado la vulnerabilidad de las regiones CA4 y CA1 del hipocampo con lo que los resultados del daño que reportamos en este trabajo se apoyan fuertemente (64). La pérdida de neuronas piramidales en algunas áreas del hipocampo es uno de los hallazgos más frecuentes en pacientes epilépticos con epilepsia del lóbulo temporal, status epilepticus y crisis tónico-clónicas generalizadas. En este trabajo se encontró una disminución en el número de neuronas en ambas áreas del hipocampo tanto en el grupo de crisis, como en el DFH-Na y observamos un efecto potenciado cuando ambos estímulos se combinaron. A. Mouritzen en 1981 encontró una disminución en la densidad neuronal de hipocampo en gerbils, después

de la inducción de crisis generalizadas en una cepa de gerbils sensibles a crisis (65). Sin embargo, el papel de la actividad de las crisis es aun poco entendido. Uno de los cambios involucrados en dicha patología se han documentado en base a cambios dendríticos de células piramidales del hipocampo, que van desde pérdida de espinas, ensanchamiento y desnudamiento de los tallos dendríticos (67).

Una de las observaciones de los resultados en el estudio semicuantitativo fué con respecto al incremento en el número de células en la region CA4 de los grupos DFH-Na/28 días, ESSM/14 Y 28 días y DFH-Na/EESM/14 y 28 días . Sin embargo, el estudio histopatológico de los mismos reveló muerte neuronal extensa y por lo tanto una disminución en la densidad neuronal. Este resultado contradictorio lo explicamos en base a las deficiencias del método de cuantificación utilizado para la región CA4 y que se describe en Materiales y Métodos, ya que lo contado son las células que coinciden con las intersecciones de la cuadrícula utilizada (Fig 2A); y por lo que apreciamos en el estudio histopatológico nuestras células sufren alteraciones osmóticas que conllevan a un incremento de volumen celular incrementando así la probabilidad para que cuerpo celular e intersección coincidieran, por lo tanto dichos incrementos son aparentes. Dicho incremento en el tamaño celular que podría confundirse con un artificio y no una alteración, a este respecto es claro que puede presentarse en un evento in vivo verdadero, como reflejo de un desequilibrio electrolítico. Dicha alteración se ha reportado como uno de los posibles mecanismos mediante los cuales se ocasiona la muerte celular en estas zonas (49).

Debemos hacer notar que la estrategia del método experimental esta diseñado de tal manera que en el grupo control-EESM los animales eran positivos al estímulo, esto es, presentaba una crisis tónico-clónica; en cambio el grupo DFH-Na/EESM eran negativos, esto es, no presentaban la crisis. Obviamente esto se debe evidentemente al efecto

farmacológico del DFH-Na de impedir la extensión de la descarga a todas las áreas del cerebro, la cual era máxima 3 horas después de su administración. Si observamos los resultados del estudio semicuantitativo podemos ver que a pesar de estar ingiriendo el medicamento, la combinación de ambos tratamientos potenció la pérdida de neuronas.

Por otra parte, la respuesta glial fue mayor en los grupos que ingirieron únicamente DFH-Na que en los grupos EESM o DFH-Na/EESM, lo cual nos indica que el medicamento si mismo, ejerce un efecto directo o indirecto sobre esta población celular.

La susceptibilidad de las dos poblaciones celulares de CA4 y CA1 también fue diferente para cada tratamiento.

## VIII.- C O N C L U S I O N E S

Los resultados muestran una clara alteración en el contenido celular en ambas areas del hipocampo observándose una alteración preferencial en la población glial en los animales tratados con DFH-Na, y una potenciación de dicho efecto cuando se usa combinado con EESM.

El estudio histopatológico así como el semicuantitativo aportan evidencia suficiente para proponer que la alteración en la densidad de la población glial es mayormente afectada con la administración del farmaco.

Por otro lado la población neuronal se ve afectada por ambos estímulos de manera similar, aunque las alteraciones según los resultados del estudio histopatológico son más energicas cuando combinamos ambos eventos.

Por último, el método semicuantitativo utilizado para la region CA<sub>4</sub> de hipocampo mostró ser inadecuado para cuantificar las células de dicha region en virtud de las alteraciones osmóticas que éstas presentaron.

## IX.-B I B L I O G R A F I A

- 1.- Brallowsky, S., Silvia-Barrat C., Naquet, R. (1989): Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportaciones recientes de investigación experimental. Salud Mental, Vol 12 (1): 53-61.
- 2.- Dreifuss, F.E. (1982): A Classification of Epileptic Seizures and the Epilepsy. En: Advances in Epileptology. XIIIth Epilepsy International Symposium, Pags 9-13. Ed.por H. Akimoto et al, Raven Press, New York.
- 3.- Dreifuss, F.E. (1981): Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. (Comission on Clasification and Terminology of the International League against Epilepsy), Epilepsia, Vol 22: 489-501.
- 4.- Ortiz, H.S. & Arauz-Contreras, J. (1986): Modelos Experimentales de Epilepsia. En: Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario. Cap. 3 Pags. 74-79. Ed. por A.F. Velasco et al. Trillas, México.
- 5.- Woodbury ,D.M. (1972): Applications to Drug Evaluations. En: Experimental Models of Epilepsy. Cap. 23 Pags. 558-583. Ed. por D.P. Purpura et al. Raven Press, New York.
- 6.- Ilae Comission on Antiepileptic Drugs (1973): Principles for clinical testing of antiepileptic drugs. Epilepsia, Vol 14: Pags. 451-457.
- 7.- Fisher, R.S. (1989): Animal Models of Epilepsies. Brain Research Reviews, Vol 14: 245-278.
- 8.- Swinyard, E.A. ( 1949): Laboratory assay of clinically efective antiepileptic drugs. Am J Pharm Assoc, Vol 38: 201-204.
- 9.- Porter, R.J., Cereghino, J.J., Gladding, G.D., Hessie, B.J., Kupferberg, H.J., Scoville, B. & White, B. (1984): Antiepileptic drug development program. Cleve Clin Q, Vol 51: 293-305.
- 10.- Fritsch, G., & Hitzig, E. (1870): Ueber die electrische Erregbarkeit des Grosshirns. Archiv Fur Anatomie und Phisologie wissenschaftlichen Medizin, Vol 37: 300.
- 11.- Toman, J.E.P., Swinyard, E.A., Goodman, L.S. (1946): Properties of maximal seizures and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents. J Neurophysiol, Vol 9: 231-240
- 12.- Woodbury, L.A. & Davenport, V.D. (1952): Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern. Arch Int Pharmacodyna Therapie, Vol 92 (1): 97-107.
- 13.- Swinyard, E.A. (1972): Electrically Induced Convulsions. En: Experimental Models of Epilepsy. Cap. Pags. 433-458. Ed. por: D.P. Purpura et al. New York, Raven Press.
- 14.- Anderson, E.S. & Hauser, W.A. (1984): The Genetics of Epilepsy. En: Progress in Medical Genetics, Ed. por: A.G.Bearn et al, Raven Press, New York.
- 15.- Alvin, J.D & Bush, M.T. (1977): Physiological Disposition of Anticonvulsants. En: Anticonvulsants. Medical Chemistry. Vol. 15, Pags. 113-150. Ed. por J.A. Vidal. Academic Press, New York.

- 16.- Putman, T.J. & Merrit, H.H. (1937): Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science*, Vol 85 (2213): 525-526.
- 17.- Merrit, H.H. & Putnam, T.J. (1938): A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. *Arch Neurol Psichiatr*, Vol 39: 1003-1015.
- 18.- Merrit, H.H. & Putnam, T.J. (1938): Sodium diphenilhidantoinate in treatment of convulsive disorders. *JAMA* Vol 11: 1068-73.
- 19.- Vida, J. (1977): Advances in anticonvulsant drug development. En: *Anticonvulsant Chemistry*. Pags. 1-9. Ed. por J. A. Vida, Academic Press, New York
- 20.- Mendez, P.A., Petersen A.F., Aceves, P., Panduro, B.J.G., Luna, B.E., Brein, A.H.S. *Manual del Clínico*. (1989) Ed. por Universidad de Guadalajara, Hospital Civil. 1 - 298.
- 21.- Reynolds, E.H. (1975): Chronic antiepileptic toxicity. A review. *Epilepsia*, Vol 16: 319-352.
- 22.- Dam, M. (1982): Phenytoin Toxicity. En: *Antiepileptic Drugs*, 2nd Ed. Pags. 247-256. Ed. por D.M. Woodbury et al, Raven Press, New York.
- 23.- Armijo, J.A. & Herranz, J.L. (1989): Toxicidad de los fármacos antiepilepticos. *Neurología*, Vol 4(3): 28-50.
- 24.- Dastar, D.K. & Dave, V.P. (1987): Effect of prolonged anticonvulsant medication in epileptic patients: serum lipids, vitamins B6, B12 and folic acids, proteins, and fine structure of liver. *Epilepsia*, Vol 28 (2): 147-159.
- 25.- Belts, D., Ak, C.Y.C., Zerwekh, J., Barilla, D.E. & Vasko, M. (1979): Effect of phenytoin on bone and vitamin D metabolism. *Ann Neurol*, Vol 5: 374-378.
- 26.- Gharib, H., & Munoz, J.M. (1974): Endocrine manifestations of diphenylhydantoin therapy. *Metabolism*, Vol 23: 515-524.
- 27.- Kutt, H. & Fouts, J.R. (1971): Diphenylhydantoin metabolism by rat liver microsomes and some of the effects of drug or chemical pretreatment on diphenylhydantoin metabolism by rat liver microsomal preparations. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol 76: 11-26.
- 28.- Tassinari, M.S., Lorente, C.A. & Keith, D.A. (1981): Effects of prenatal phenytoin exposure on tissue protein and DNA levels in rat. *J Craniofacil Genetics and Dev. Biol*, Vol 1: 315-330.
- 29.- Vittek, J. Munnangi, P.R. Gordon, G.G. Rappaport, S.C. & Southren, A.L. (1982): Dilantin increases the content of nucleic acids and protein in rat oral mucosa. *Pharmacology*, Vol 10: 734.
- 30.- Patsalos, N.P. & Wiggins, R.C. (1982): Brain maturation following administration of phenobarbital, phenytoin and sodium valproate to developing rats or to their dams. Effects on synthesis of brain myelin and other subcellular membrane proteins. *J Neurochem*, Vol 39 (4): 915-923.

- 31.- Hicks, H.E. & Banes, A.J. (1983): The *in vivo* biosynthesis of embryonic proteins after maternal administration of phenytoin in the mouse. Proc Soc Exp Biol Med, Vol 142: 213.
- 32.- Yanagihara, T. & Hambergeim, A. (1971): Effect of diphenylhydantoin on protein metabolism in the central nervous system. Exp. Neurol, Vol 31: 87-99.
- 33.- Navarro Ruiz, A., Garzón, P., García Estrada, J., González Hita M. (1990): El difenilhidantoinato sódico modifica la concentración de ADN y proteínas en cerebelo e hígado. Arch. Invest. Méd. (Méx). Vol 21 (1): 17-21.
- 34.- Ghatak, N.R, Santoso, R.A., & Mickinley, W.M. (1976): Cerebellar degeneration following long-term phenytoin therapy. Neurology (Mineap). Vol 26: 818-820.
- 35.- Dam, M, & Nielsen, M. (1970): Purkinje's cells density after diphenylhydantoin intoxication in rats. Arch Neurol. Vol 23: 555-558.
- 36.- Kokenge, R., Kutt, H., McDowell, F. (1965): Neurological sequelae following Dilantin overdose in a patient and in experimental animals. Neurology, Vol 15: 823-829.
- 37.- Snider, R.S. & Pérez del Cerro, M. (1966): Membranous cytoplasmic spiralis in Dilantin intoxication. Nature, Vol 12: 536-537.
- 38.- Utterback, R.A. (1958): Parenchymatous cerebellar degeneration complicating diphenylhydantoin (Dilantin) therapy. Arch Neurol Psychiatr, Vol 80: 180-181.
- 39.- Dam, M. (1970): Number of Purkinje cells after diphenylhydantoin intoxication in pigs. Arch Neurol, Vol 22: 64-67.
- 40.- Dam, M. (1966): Organic changes in phenytoin intoxicated pigs. Acta Neurol Scandinav, Vol 42: 491-494.
- 41.- Dam, M. (1970): The number of Purkinje cells after diphenylhydantoin intoxication in monkeys. Epilepsia, Vol 11: 199-206.
- 42.- Hofmann, W.W. (1958): Cerebellar lesions after parenteral Dilantin administration. Neurology, Vol 8: 210-214.
- 43.- Haberland, C. (1962): Cerebellar degeneration with clinical manifestation in chronic patients. Psychiat et Neurol, Vol 143: 29-44.
- 44.- Merrit, H.H. & Putnam, T.J. (1939): Sodium diphenylhydantoinate in treatment of convulsive seizures. Toxic symptoms and their prevention. Arch Neurol Psychiatr, Vol 42: 1053-1058.
- 45.- Bouchet, C., Cazanvielh, A. (1825): De l'épilepsie considéré dans ses rapport avec l'allénation mentale. Archives Générales de Medicine, Vol 9: 519-542
- 46.- Sommer, W. (1880): Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. Arch Psychiatr Neurvenkrankh, Vol 10: 631-75.

- 47.- Scholz, W. (1959): The contribution of patho-anatomical research to the problem of epilepsy. *Epilepsia*, Vol 1: 36-55.
- 48.- Spielmeyer, W. (1920): Uber einige Beziehungen zwischen Ganglienzellveranderungen und glichen Erscheinungen, besonders in kleinhirn. *Z Gesante Neuronal Psychiatr*, Vol 54: 1-38.
- 49.- Siesjo Bo, K. & Wieloch, T (1986): Epileptic Brain Damage: Pathophysiology and Neurochemical Pathology. En: *Advances in Neurology*, Vol 44: 813-847. Ed. por Delgado Escueta A. V. y col, Raven Press, New York.
- 50.- Bazán, N.G., Birkles, D.L., Tang, W. & Reddy T.S. (1986): The accumulation of free arachidonic acid diacylglycerols, prostaglandins, and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. *Advances in Neurology*, Vol 44: 879-902. Raven Press, New York.
- 51.- Scheibel, M.E., Randall, P.H.C. & Scheibel, A.B. (1974): The hippocampal dentate complex in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, Vol 15: 55-80.
- 52.- Dawyer, B.E. (1985): Intermediary Metabolism. En: *Antiepileptic Drugs*. Ed. por H.H. Frey. Springer-Verlag
- 53.- Chapman, A.G., Meldrum, B.S & Siesjo, B.K. (1997): Cerebral metabolic changes during prolonged epileptic seizures in rats. *J. Neurochem*, 28: 1025-1035.
- 54.- Auszmann, J. M. (1990): The effect of phenytoin on parathyroid hormone stimulated cAMP activity in cultured murine osteoblasts. *Life Sciences*, Vol 46: 351-353.
- 55.- Pulsinelli, W.A. (1985): Selective neuronal vulnerability: Morphological y molecular characteristics. *Prog Brain Res*, Vol 63: 29-37.
- 56.- Sloviter, R.S. & Dempster D.W. (1985): Epileptic brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Research Bulletin*, Vol 15: 39-60.
- 57.- Garzon, P., Roman-Maldonado, S., Navarro-Ruiz, A. & Solis-Camara V.P. (1985): Response of rats stimulus modified by feeding. *Gen Pharmac*, Vol 16(2): 157-160.
- 58.- Garzon, P., Navarro-Ruiz, A., Domínguez-Rodríguez, J., García-Estrada, J., González-Hita, M., Bastidas-Ramírez, B.A., Román-Maldonado, S., Navarro-Ruiz, I. (1990): Procedimiento modificado para tamizaje anticonvulsiónante. Revaluación del difenilhidantoinato sódico y el fenobarbital. *Arch Invest Med (Méx)*, Vol 2: 57-63
- 59.- Linch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D., Inwood M.J.H., (1978): *Métodos de Laboratorio*, 2a. Edición Cap. 47 Pags. 1311-1338. Ed. por: Interamericana
- 60.- Babb, T.L., Brown, W.J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J.D., & Crandall, P.H., (1984) Temporal Lobe Volumetric Cell Densities in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 25(6): 729-740.

- 61.- Estrada Flores, E., Peralta Zamora, L., Rivas Manzano, P. (1982): Manual de Técnicas Histológicas, Cap. 4, Pags. 57-70. Ed. por AGT Editor, S.A., México.
- 62.- Weibel, E.R (1979): Stereological Methods. Practical methods for Biological Morphometry, Vol 1, Pags. 73-90. Academic Press, London.
- 63.- Murray, R. S (1989); Estadística. Cuarta edición, pp 1-357 Editado por McGraw-Hill, México.
- 64.- Schwob, J.E., Fuller, T., Price, J.L., and Olney, J.W. (1980): Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: A Histological study. Neuroscience, Vol 5: 991-1014.
- 65.- Dam. M., Bajorek. C., Lomax. P. (1981): Hipocampal neuron density and seizures in the mongolian gerbil. Epilepsia, Vol 22: 667-674.
- 66.- Babb L., Brown J.W., Pretorius J., Davenport C., Lieb P.J., Crandall P.H (1987): Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. Epilepsia, Vol 25(6): 729-740.
- 67.- Paul, L.A. & Scheibel, A.B. (1986): Structural Substrates of Epilepsy. En: Advances in Neurology, Vol. 44, Pag. 775-786. Ed. por A.V. Delgado-Escueta et al, Raven Press, New York.