



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas  
Departamento de Ciencias Ambientales  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

**EFFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS CONVULSIONES  
INDUCIDAS POR HIPERTERMIA Y POR EL ACIDO 3-  
MERCAPTOPROPIONICO EN RATAS MACHO**

**Tesis  
Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencia del Comportamiento  
(OPCION NEUROCIENCIA)**

**Presenta**

**LEOPOLDO EDUARDO FLORES MANCILLA  
Comité Tutorial**

**Dra. Marisela Hernández González (Directora)  
Dr. Alfredo Feria Velasco  
Dr. Miguel Ángel Guevara Pérez.  
Dr. Luis Cerdán Sánchez**

**Guadalajara, Jalisco**

**Enero de 2008**

## ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I) INTRODUCCIÓN.....	5
1) Los ácidos grasos esenciales.....	5
2) Efecto protector de los Omega-3 sobre el Sistema Nervioso Central.....	11
3) El fenómeno convulsivo en el SNC.....	18
4) Crisis convulsivas asociadas a hipertermia corporal en la etapa neonatal .....	18
5) Crisis convulsivas inducidas por el Acido 3-Mercaptopropiónico.....	25
6) La amígdala.....	26
II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA GENERAL.....	30
III) EXPERIMENTO I.....	31
<b>EFFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR HIPERTERMIA EN RATAS MACHO DE 5 DIAS DE EDAD.</b>	
1) Objetivos.....	31
General.....	31
Específicos.....	32
2) Hipótesis.....	32

3) Materiales y métodos.....	32
4) Análisis estadístico.....	37
5) Consideraciones Éticas.....	37
6) Resultados.....	37
7) Discusión.....	47
8) Conclusiones.....	52
IV) EXPERIMENTO II.....	53
<b>EFFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR EL ACIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO EN RATAS MACHO DE 150 DIAS DE EDAD.</b>	
1) Objetivos.....	54
General.....	54
Específicos.....	54
2) Hipótesis.....	54
3) Materiales y métodos.....	55
4) Análisis Estadístico.....	61
5) Consideraciones Éticas.....	62
6) Resultados.....	62
7) Discusión.....	72
V) DISCUSION GENERAL.....	99
VI) CONCLUSIONES GENERALES.....	102
VII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
VIII) APÉNDICE.....	117

## RESUMEN

Un alto porcentaje (50-60%) del cerebro en los mamíferos son principalmente grasas o lípidos, de éstos, el 35% son ácidos grasos esenciales, en particular los omegas ( $\theta$ ), como el Ácido Docosahexanoico (DHA) y el Eicosapentanoico (EPA) llamados omega 3 ( $\theta$ -3). Diversos estudios han mostrado beneficios en la salud con la implementación de los  $\theta$ -3 como agentes terapéuticos en alteraciones cardiovasculares, renales, dérmicas, metabólicas, neurodegenerativas e inmunológicas. Evidencias experimentales sugieren un beneficio potencial del aceite de pescado (APE) como neuroprotector debido al alto contenido de DHA y EPA. Sin embargo, es poco lo que se conoce en cuanto a los efectos que pudieran tener sobre alteraciones nerviosas, como las crisis convulsivas. En este contexto, se ha reportado que el tipo más común de trastorno epiléptico observado en los niños son las crisis convulsivas provocadas por fiebre (CF). La incidencia es de 3-5%, con ocurrencia entre los 5 meses y 5 años de edad, y se ha propuesto que esta alteración en la vida temprana pudiera tener efectos a largo plazo, manifestándose como un síndrome de epilepsia en la vida adulta. Por otro lado, se han desarrollado modelos para estudiar las bases neurales de los cuadros epileptiformes y uno de ellos es el generado por el ácido 3-mercaptopropiónico, que genera crisis convulsivas debido a su propiedad de actuar inhibiendo a la enzima glutamato Descarboxilasa (GAD), que cataliza al ácido glutámico por descarboxilación para la formación de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). El objetivo del presente estudio fue evaluar, en un primer experimento, el efecto del APE sobre las convulsiones inducidas por hipertermia experimental en un grupo de ratas Wistar macho de 5 días de edad (grupo SAPE) cuyas madres consumieron una dieta base más un suplemento de APE (suministrado desde su infancia hasta la etapa de crianza). Este grupo se comparó con otro grupo de ratas de la misma edad y cepa (grupo SAPA) cuyas madres consumieron una dieta base más un suplemento de aceite de palma (suministrado desde su infancia hasta la etapa de crianza), y con un tercer grupo de ratas (grupo CTRL) cuyas madres consumieron la dieta base más agua. Los hallazgos indicaron que las ratas tratadas con APE presentaron mayor resistencia a la elevación de la temperatura corporal inducida por la hipertermia, una menor frecuencia de las crisis convulsivas asociadas a temperatura corporal elevada y menor duración y severidad de las convulsiones cuando se compararon con las ratas del grupo SAPA y CTRL. En el segundo experimento se evaluó el efecto del aceite de pescado sobre las convulsiones inducidas por la aplicación i.p. de una dosis única de ácido 3-Mercaptopropiónico, en ratas Wistar (implantadas bilateralmente con electrodos en la amígdala) a las que se les dio el tratamiento desde el vientre materno y hasta la edad de 150 días, y se compararon con ratas implantadas de la misma manera pero que recibieron APA y las ratas CTRL. El EEG amigdalino de las ratas tratadas con APE, se caracterizó por presentar una menor potencia absoluta de las frecuencias rápidas (16-25 Hz) durante las convulsiones, respecto a las ratas tratadas con APA y las del grupo CTRL. Esta menor potencia absoluta de las frecuencias rápidas pudiera asociarse con el posible efecto neuroprotector ejercido por el APE, ya que por otro lado este grupo mostró una mayor latencia para presentar la convulsión, así como un menor número de convulsiones que los otros grupos. Estos resultados en conjunto, muestran que el suministro crónico de APE como suplemento crónico adicional a la dieta diaria de ratas Wistar, se asocia a una mayor latencia para presentar un episodio convulsivo, así como a un menor número de convulsiones y menor severidad de éstas, datos que se suman a los ya propuestos del posible efecto neuroprotector de los  $\theta$ -3 sobre las alteraciones nerviosas.

## ABSTRACT

In the mammalian brain, high percentages (50-60%) are fats or lipids, which 35% are essential fatty acids, particularly the omegas ( $\theta$ ), as the Docosahexanoic Acid (DHA) and the Eicosapentanoic Acid (EPA) named omega-3 ( $\theta$ -3). Several studies have indicated health benefits with implementation of the  $\theta$ -3 as therapeutic agents in cardiovascular, kidney, skin, metabolic, neurodegenerative and immunologic health alterations. Experimental evidences have been suggested potential benefits of fish oil (FO) as neuroprotector by their high DHA and EPA contents. However, little know of the  $\theta$ -3 effects on nervous system alterations as febrile seizures (FS). In this regard, FS is the common seizure type in the early life. The incidence of 3-5% occurs between 5 months and 5 years old. Otherwise, subsequent research had suggested that prolonged FS in infancy can lead long-term effects; that's could be to manifests as epilepsy syndrome during adulthood. On the other hand, for the neural bases studying epileptiform activities, there are growing development animal models, one out is 3-mercaptropionic acid, a useful tool in experimental epilepsy studies, which induced seizures by inhibition of Glutamate-decarboxylase synthesis (GAD), this enzyme catalyzes the formation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by decarboxylation of glutamate.

The aim of first experiment in this estudy was to evaluate the FO effect on seizures-induced by experimental hyperthermia, in male Wistar rats of five days-old (SAPE group), their mothers consumed basic diet and daily received FO administration (from the infancy, until breeding period), this group was compared with other (SAPA group), their mother consumed basic diet and daily received chronic administration of palm oil (from the infancy until breeding period), and a third pups group named control group (CTRL group), their mothers consumed basic diet plus water as supplement. The findings indicated that FO chronic supplementation additional plus diet basic of Wistar rats in breeding process were associated in their pups to more resistance to temperature elevation by hyperthermia-induced seizures, a minor convulsive episodes frequency, and less severity in this kind of seizures. In the second experiment, was evaluated the effect of FO on the seizures-induced by 3-mercaptropionic acid in adult male Wistar rats. The SAPE group registered a high latency to the first seizure, and a minor frequency of convulsive episodes as compared to the other groups. This resistance observed in seizures was associated with a characteristic electroencephalographic activity of the amygdala, indicated by a decreased absolute power of the fast frequencies (16-25 Hz) as coimpared to the SAPA and CTRL groups. This results as a whole showed that the chronic consumption plus basic daily rat's diet, could be associate a major latency to show a convulsive episode, as well as less convulsive periods and les severity. These findings are added to others studies wich is proposed the possible neuroprotector effect of  $\theta$ -3 on nervous alterations.

## **I. Introducción**

### ***1) Los Ácidos Grasos Esenciales***

Los ácidos grasos esenciales son grasas, y como tales pertenecen al grupo de los lípidos. Estos macronutrientes son un grupo diverso de biomoléculas formadas principalmente por carbono e hidrógeno y también de oxígeno, pero en porcentajes mucho más bajos. Además pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre (Lehninger, 2004). Generalmente se unen a moléculas de glicerol para formar los glicéridos o lípidos complejos los cuales en el organismo sirven como reservorio y fuente de energía.

Además de servir como importantes fuentes de energía, los lípidos que ingerimos diariamente también juegan otros importantes papeles: de transporte, de regulación metabólica, de biocatalizadores y de estructuración principalmente de las membranas celulares (Reinhart, 1996). En este nivel los ácidos grasos y su tipo de estructura juegan un papel importante tanto en la configuración de los fosfolípidos (FL) de la bicapa, como en la funcionalidad de la membrana (Valenzuela y cols, 2001).

Existen dos tipos de ácidos grasos que forman los FL de las membranas celulares: los ácidos grasos saturados (aquellos que tienen una sola ligadura entre los átomos de carbono de su cadena) y los ácidos grasos no saturados o polinsaturados (aquellos que en su cadena de carbonos tienen una, o más dobles ligaduras en su cadena de carbonos). La forma de la cadena irregular o no recta en éstos últimos, denominados en inglés PUFAS (Polyunsaturated fatty acids) influyen en la compactación de los FL a nivel de la bicapa en la membrana celular (Reinhart, 1996)



que determina en cierta medida la fluidez de la bicapa (Valenzuela y cols, 2001; Villegas y cols, 2005). Esta es una de las propiedades más importantes de las membranas biológicas, ya que en forma normal, la fluidez permite la interacción de las proteínas incrustadas en la membrana. Además, ésta propiedad contribuye para que se lleven a cabo los mecanismos de transporte y reacomodamiento permanente de los componentes de la bicapa (Bazan y cols., 2005) .La permeabilidad celular es otra propiedad importante que consiste básicamente en el transporte iónico a través de la membrana, Esta propiedad puede ser influenciada a su vez por la fluidez de la membrana, determinada en gran medida por la proporción y tipo de ácidos grasos en esta estructura celular (Villegas y cols, 2005).

Los  $\theta$  son los mayores constituyentes de las membranas neuronales (Larsson y cols., 2004), de tal manera que, una deficiencia o desbalance en estos nutrientes pueden modificar la composición de la bicapa y de los organelos dentro de la neurona, modificando también sus funciones (Carrie y cols., 2000).

Los PUFAS y en especial los omegas 3 y 6, no pueden ser sintetizados por el organismo animal, por tanto, deben ser obtenidos de la dieta diaria; asimismo, uno no puede sustituir al otro en sus funciones, o, sintetizarse uno a partir del otro (Reinhardt, 1996).

Los PUFAS y particularmente los  $\theta$  -3 y  $\theta$  -6 los podemos encontrar en diversas fuentes alimenticias. Por ejemplo, el ácido  $\alpha$ -linoleico ( $\theta$  -6) es abundante en las plantas y sus partes, las semillas de girasol y el maíz contienen una elevada cantidad de este elemento esencial, asimismo alimentos como la carne y/o la leche de animales alimentados con granos y semillas de este tipo contienen cantidades altas de  $\theta$  -6. Por otro lado, los aceites de pescado como el de atún, el de salmón, el de bacalao, y en general las carnes y harinas de pescado contienen cantidades

considerables del ácido  $\alpha$ -linolenico ( $18n:3n-3$ ). La linaza y la oliva son de los pocos vegetales cuyas semillas contienen  $\theta -3$  (White, 1995).

Se ha fundamentado la hipótesis de que en los inicios de la era del *Homo sapiens* los individuos consumían alimentos con bajo contenido de ácidos grasos saturados, asimismo las cantidades de los PUFAS, especialmente  $\theta -3$  y  $\theta -6$  eran equivalentes, es decir la relación inicial era de 1:1 (Meyer y cols., 2003; Kang, 2005). Sin embargo, hace unos 10,000 años, con el sedentarismo y consecuentemente con el advenimiento de la agricultura, se iniciaron cambios en la composición de las dietas. Tales modificaciones en la alimentación humana sobre todo en las grasas, fomentaron un enorme incremento en el consumo de  $\theta -6$ , especialmente durante los últimos 100 – 150 años (Bennati y cols., 2004). En la actualidad, las dietas occidentales contienen por lo general de 15-20 partes de  $\theta -6$  por 1 de  $\theta -3$  (Kang, 2005).

Se ha reportado en estudios realizados en distintos lugares del mundo, que independientemente de las variaciones en la dieta, el consumo de  $\theta -3$  en general es bajo (Simopoulos y cols., 1999; Kang, 2005). Por ejemplo, en Australia se observó que en una muestra de jóvenes con un promedio de edad de 19 años, el consumo promedio diario de  $\theta -6$  fue de 10.8 g en comparación con 0.052 g de  $\theta -3$ . La mayor fuente de PUFAS fueron las carnes a la que le siguieron los cereales y la leche. Como se esperaba, la mayor fuente de ácido linolénico ( $\theta -3$ ) fueron los alimentos provenientes del mar (pescados y mariscos) con 71%, sin embargo, la carne aportó un 20% del total de  $\theta -3$  ingeridos (Covington y cols, 2004).

Por otro lado, en Japón se ha reportado un consumo diario promedio de 1.6g de  $\theta -3$ , cantidad mayor que la consumida por los australianos, pero aun menor para contrarrestar el balance de omegas en la dieta que en algunos lugares puede ser 10 partes de  $\theta -6$  por 1 de  $\theta -3$  (Sugano, 1996).

Es interesante hacer notar que los dos países mencionados probablemente tengan mayor acceso a alimentos provenientes del mar, sin embargo, también es posible que factores socioculturales y de mercadotecnia se conjuguen para conservar estilos de alimentación y con esto un desbalance de grasas en la dieta diaria, así como la tendencia hacia el consumo de mayores cantidades de grasas saturadas y de  $\omega$ -6 (Hagg, 2003).

El tipo y estilo de alimentación de los esquimales contrasta con lo descrito anteriormente, ya que un individuo de estos lugares, del total de las grasas que come, alrededor el 14% son  $\omega$ -3 en particular DHA y EPA (Bang y Dyeberg, 1972; Nobmann y cols, 2005)), Por tanto, la ingestión de pescado y de sus derivados como el aceite, proveen directamente los  $\omega$ -3 evitando la necesidad de su síntesis por conversión dentro del organismo (Calviello y cols, 1998).

### ***Metabolismo de los Omegas***

El organismo humano posee un sistema enzimático que es común tanto para la conversión como para la síntesis de los diferentes  $\omega$ -6 y de los  $\omega$ -3. Una vez ingeridos los PUFAS, son separados de los diferentes nutrientes y se absorben en el intestino, de ahí son transportados por los quilomicrones hacia el hígado, en donde se inicia su desdoblamiento y su conversión en diferentes metabolitos (Lambert y cols, 2001; Reinharth, 1996). Por ejemplo, el ácido  $\alpha$ -linoleico ( $\omega$ -6) ( $18n:2n-6$ ) y el ácido  $\alpha$ -linolenico ( $\omega$ -3) ( $18n:3n-3$ ), son transformados por la enzima  $\alpha$ -delta-6-saturasa y por elongasas, compuestos que son también llamados genéricamente  $\omega$ -6 u  $\omega$ -3 (dependiendo de la vía de transformación) de tal manera que, los productos obtenidos del ácido linoleico van a ser muy distintos de los resultantes en el desdoblamiento del ácido linolénico, con la excepción de que a partir del ácido aráquico ( $\omega$ -6) se puede dar origen al ácido docosapentanoico.

Genéricamente, los productos de la biotransformación de los  $\omega$ -6 son llamados Eicosanoides (Ecos). Su constitución es parecida a la de una hormona con una larga cadena de carbonos (eicosa=20) y son biológicamente muy activos (Larsson y cols, 2004).

Para el caso de la familia de los  $\omega$  -6, la producción de Ecos se inicia por la acción de varias fosfolipasas, las cuales los liberan de los fosfolípidos de la membrana celular y una vez liberados son sustratos para la ciclooxigenasa-I (Cox-1) y la ciclooxigenasa II (Cox-2), convirtiéndose en 2 series de prostaglandinas y trombohexanos, mientras que las lipooxigenasas y las P450 monoxigenasas dan origen a los leucotrenos y lipoxinas. Todos estos productos son potentes mediadores de la inflamación, de la agregación plaquetaria, promotores de crecimiento en células tumorales, de la angiogénesis y de factores de adhesión tumoral, por lo que se piensa que las dietas predominantes en  $\omega$  -6 podrían favorecer la aparición de cáncer (Lands y cols, 1990 Favero y cols, 1998; Larsson y cols, 2004)

En contraste, los productos de transformación de la familia  $\omega$ -3 son llamados genéricamente “prostanoides” o “Docosanoides”, los cuales activan mecanismos antiinflamatorios, promueven la vasodilatación, suprimen la síntesis de los productos de transformación del ácido araquidónico (producto muy importante de  $\omega$  -6) reemplazando a este en las biomembranas (Bazan, 2005), suprimen la cox-2 (Larsson y cols., 2004) y favorecen el catabolismo de los eicosanoides, acción en el que se ha propuesto intervienen enzimas perixomales (Von Schacky y cols, 1993).

Una de las funciones fundamentales de los omegas es la estructuración de la bicapa en las membranas celulares. En éste sentido, una carencia de los PUFAS originará alteraciones tanto en el crecimiento y desarrollo de las células como en la funcionalidad de éstas. Sin embargo, y tomando en cuenta las características nutricionales de las dietas actuales, es difícil encontrar

mayores alteraciones en el organismo debidas a una carencia de  $\omega$ -6 (sobre todo porque es el que mas consumimos en la dieta) en comparación del  $\omega$ -3, el cual consumimos en muy poca cantidad.

Se ha reportado que en las membranas de las neuronas los  $\omega$ -3 representan un alto porcentaje de su estructura (30%) y son este tipo de PUFAs los que determinan en gran parte la fluidez de la membrana (Villegas y cols, 2005), mecanismo importantísimo para la vida y funcionalidad de la neurona. Por tanto, una deficiencia en  $\omega$ -3 traerá como consecuencia alteraciones drásticas en el tejido nervioso.

## ***2) Efecto protector de los Omega 3 sobre el Sistema Nervioso Central***

El sistema nervioso central (SNC) y particularmente el cerebro contienen la mayor concentración de lípidos después del tejido adiposo. Se ha estimado que del peso drenado del cerebro, 50 a 60% está constituido por lípidos, asimismo el 35% de éstos son fundamentalmente ácidos grasos omegas y particularmente omega-3 (Haag, 2003).

Si los lípidos cerebrales contienen alta cantidad de tales ácidos grasos y éstos son los mayores constituyentes de las membranas neuronales, entonces una deficiencia puede traer consecuencias deletéreas sobre la funcionalidad nerviosa. En contraste, con un aporte óptimo de  $\omega$ -3 se mantiene la composición idónea de las membranas celulares y de los organelos dentro del cerebro, así como también sus funciones (Carrie y cols, 2000).

Se han llevado a cabo múltiples estudios en animales con el objeto de determinar si los  $\omega$ -3 confieren cierta protección al sistema nervioso en contra de un daño. Diversos trabajos en las áreas de neuroquímica (Bazan, 2005; Stillwell y cols, 2005), histología (Lauritzen y cols., 2000), neurofisiología (Xiao y cols, 1999) y de la conducta (Chalon y cols, 2001; Yehuda y cols, 1999; Ikemoto y cols., 2001; Takeuchi y cols, 2002) han mostrado efectivamente que, la presencia de los

$\omega$ -3, y en particular el DHA, está asociada a un estado de neuroprotección especialmente en el sistema nervioso.

Por ejemplo, Mizota y cols. (2001), observaron en ratas recién destetadas a las que se les suministró durante 14 días DHA y que fueron inyectadas intraocularmente (humor vítreo) con ácido kainico (AK), que la amplitud de las señales en los registros del electroretinograma (ERG) fueron disminuidas a causa del daño excitotóxico, sin embargo dicha amplitud fue significativamente mayor que la registrada en las señales del ERG en ratas controles. Asimismo, después de 14 días de la inyección, el número de células ganglionares fue significativamente mayor en el grupo con DHA que en el grupo control. Los autores concluyeron que la suplementación de DHA puede contrarrestar la neurotoxicidad inducida por AK en la retina de la rata y que este  $\omega$ -3 pudiera estar regulando la excitabilidad neuronal reduciendo la respuesta inducida por AK.

Consecuentemente la pregunta entonces fue si en estructuras cerebrales pudiera llevarse a cabo este mecanismo. Voskuyl y cols (1998) en un estudio con ratas a las que se les suministró por infusión i.v. 40  $\mu$ M de EPA o de DHA, observó un incremento del umbral de respuesta de neuronas corticales, cuando se estimularon mediante un modelo experimental de epilepsia. Los autores reportaron que en los animales alimentados con dietas altas en ácidos EPA y DHA, la corriente necesaria para facilitar el potencial de acción, pasó de  $73 \pm 13$  y  $77 \pm 17$  mA, a  $125 \pm 20$  y  $130 \pm 19$  pA respectivamente, después de la estimulación. El umbral permaneció elevado por 6 hrs., pero retornó a su línea base al siguiente día. Los autores concluyeron que el empleo de  $\omega$ -3 específicamente DHA, puede tener un efecto anticonvulsivo pero modesto y de duración considerable.

Por otro lado existen estudios que asocian la presencia de los  $\omega$ -3 a un mejor desempeño en pruebas de aprendizaje (Valenzuela y cols, 2003) desarrollo psicomotor (Valenzuela y cols, 2001) e inteligencia. Por ejemplo, Helland y cols (2006) determinaron un cociente intelectual más alto en niños de 4 años de edad, cuyas madres habían recibido un suplemento de AP durante su embarazo y lactancia; la diferencia fue estadísticamente significativa cuando se les comparó con un grupo de niños cuyas madres habían recibido un suplemento de aceite de maíz. No obstante que los autores indican que los resultados pudieran tener una significancia limitada debido a que fueron 4.1 puntos de diferencia observada entre los grupos en las escala K- ABC (Kaufman Assessment Battery for Children), los hallazgos son importantes desde el punto de vista epidemiológico y se concluye que suministrar  $\omega$ -3 durante el embarazo y la lactancia puede mejorar la inteligencia de los niños.

Es conveniente hacer notar que recientemente la misma investigadora mostró en madres a las que se les dio aceite de pescado durante su embarazo que hubo un incremento significativo del DHA en el plasma tanto de estas mujeres como el de sus hijos, así como un aumento en los fosfolípidos del cordón umbilical, al compararlos con un grupo de madres que recibieron aceite de maíz como suplemento. Estos resultados nos sugieren que el suministro de aceite de pescado durante el embarazo se asocia a una mayor disponibilidad del DHA en tejidos implicados en la nutrición fetal (Helland y cols, 2006).

La pregunta entonces sería si en la mediana edad o en la edad tardía de nuestra vida, consumir el aceite de pescado o dietas que tengan mayor contenido de  $\omega$ -3 se asocia a una mejora en el funcionamiento de nuestro cerebro, o si mayores cantidades de  $\omega$ -3 en nuestro organismo se pudieran asociar a un mecanismo de protección en contra del deterioro cognitivo que normalmente se presenta en el curso de éstas edades. En éste sentido, se han realizado estudios en humanos en los que se ha argumentado que el consumo de pescado durante la edad adulta se asocia a una

reducción en el deterioro de la capacidad cognitiva. Por ejemplo Morris y cols., (2005) observaron en hombres de edad avanzada (65 años en promedio) que habían consumido pescado dos veces o más por semana; un mejor desempeño en una batería de pruebas que exploraban su capacidad cognitiva, cuando se compararon con un grupo de sujetos que consumían pescado una vez por semana, y otro grupo que lo consumía esporádicamente; asimismo, se encontró en los tres grupos que los puntajes registrados fueron estableciendo un rango de deterioro en sus habilidades cognitivas conforme avanzó el tiempo del experimento (3años), sin embargo los que consumieron pescado 1 vez por semana, el índice de deterioro fue menor que en los otros grupos. Los autores concluyeron que el consumo de pescado se asoció con una disminución leve del deterioro natural en las funciones cognitivas.

Los prometedores resultados observados en humanos contrastan con los reportados en animales de experimentación, en los cuales se ha observado que, en la etapa tardía de la vida, al parecer no es tan efectivo el efecto “neuroprotector” de los  $\omega$ -3 como en las etapas tempranas. Por ejemplo, Coblijn y cols (2003) estudiando a ratas viejas (2 años de edad) a las que se les dio una dieta con aceite de pescado durante un mes, observó que su desempeño en la prueba del Laberinto de agua de Morris, no se diferenció de ratas de la misma edad alimentadas con una dieta normal. La prueba consiste en que en una tina circular con agua, se coloca el animal y la tarea que debe realizar es nadar hasta encontrar una plataforma flotante colocada en un sitio que previamente se le enseñó; el parámetro que se mide es el tiempo que tarda el sujeto en localizar y nadar hasta llegar a la plataforma de “escape” y da una idea de la capacidad que tiene el animal de memorizar en donde había localizado la plataforma en ensayos previos y por lo tanto evalúa la memoria y el aprendizaje espacial . En el experimento tampoco hubo diferencias entre las ratas viejas tratadas con aceite de pescado y los controles en cuanto a la mejoría en el desarrollo diario de la tarea. Sin embargo, el desempeño diario fue significativamente mejor en ratas de 2 meses de edad

alimentadas también con una dieta con aceite de pescado, que con ratas control de la misma edad. Estos resultados sugieren que pudiera existir un periodo en el cual los nutrientes son vitales para el funcionamiento y mantenimiento óptimo de la maquinaria cerebral, en este sentido, es necesario aclarar que en el experimento descrito se determinó una sobreexpresión de 8 genes en las ratas jóvenes que consumieron aceite de pescado y no hubo sobreexpresión de genes en las ratas viejas con el mismo tratamiento. Sin embargo son necesarios más estudios en animales adultos contemplando un consumo de aceite de pescado o de  $\omega$ -3 en proporciones idóneas y suministrándolos en forma crónica hasta la etapa de vejez evaluando sus habilidades cognitivas en forma intermitente.

También se han utilizado otras pruebas que evalúan habilidades cognitivas en animales, En dichas pruebas llamadas también de condicionamiento operante, se utiliza una caja de Skinner que evalúa la capacidad de discriminación o atención a un estímulo y los parámetros que se miden son; el tiempo que requirió el animal para asociar que cuando oprime una palanca entonces se le aporta alimento, y/o que cuando oprima la palanca y se encienda un panel con una luz determinada (estímulo), efectúe la presión de la palanca cuantas veces se lo indique un programa de computadora y de esta manera obtener agua o comida (recompensa). Con éste tipo de pruebas se registraron significativamente mayores puntajes en ratas hijas de madres a las que se les dio un complemento de DHA durante la gestación y lactancia, al compararlas con ratas que recibieron una dieta normal . Cabe hacer notar que la acumulación de este omega  $\omega$ -3 en la corteza frontal, cerebelo e hipocampo de las ratas tratadas con DHA fue muy similar a la de las ratas a las que se les dio el precursor de DHA ácido  $\alpha$ -Linolénico, sin embargo hubo mayores puntajes en los animales que consumieron DHA en forma pura (Valenzuela y cols, 2003).

### ***Posibles mecanismos de neuroprotección de los $\omega$ -3***

Se ha considerado que el DHA con 22 carbonos y 6 dobles ligaduras es el ácido graso esencial más grande de los  $\omega$ -3, y, en términos fisiológicos, probablemente el más influyente para todas las células, principalmente por su acción a niveles muy básicos y vitales de la vida celular. Aunque no se ha definido claramente el modo de actuar de ésta molécula, se ha mostrado que el DHA y los  $\omega$ -3 actúan a través de por lo menos 5 mecanismos básicos (Stillwell y cols, 2005).

- 1) la afectación de la producción de eicosanoides.
- 2) la formación de productos muy potentes en lipoperoxidación.
- 3) La activación y conformación de enzimas específicas.
- 4) Activación de procesos de transcripción.
- 5) Regulación de procesos membranales como la señalización lipídica y de algunas proteínas involucradas en la supervivencia celular como AKT

Con respecto al primer mecanismo se ha reportado que consumos elevados de  $\omega$ -3 suprimen la biosíntesis de los precursores del ácido araquidónico (potente mediador de inflamación) formando 5 series de leucotrenos (moléculas antiinflamatorias), Para el segundo mecanismo se ha reportado que estos omegas inducen un mayor catabolismo de los eicosanoides a través de la inducción de potentes enzimas peroxomales. Con respecto al tercer mecanismo se ha reportado que los  $\omega$ -3 suprimen la ciclooxigenasa-2 (molécula activadora de mecanismos inflamatorios) y compiten con los  $\omega$ -6 en la utilización de las ciclooxigenasas, acción que afecta significativamente los  $\omega$ -6 en la formación de productos de conversión o eicosanoides, asimismo el EPA ( $\omega$ -3) es un substrato preferencial de las lipoxigenasas, situación que favorece su metabolismo y actuación a nivel celular, Por lo que respecta al cuarto mecanismo de los procesos de transcripción, Murata y cols.,

(2001) han observado que el EPA disminuyó la actividad de proteinasas mitógenas e inhibió la proliferación de células hepáticas cancerígenas. Finalmente, por lo que respecta al mecanismo cinco, se ha observado que las membranas y en especial las membranas de las neuronas, son un reservorio de grupos de fosfolípidos que inducen la señalización y síntesis de mensajeros lipídicos que van a actuar en el caso de una sobreestimulación o daño en el tejido nervioso. Estos mensajeros activan una serie de procesos que pueden promover un daño en la neurona o dependiendo del tipo de mensajero se puede generar un mecanismo neuroprotector,

En el caso de un daño, la cascada de eventos activa una serie de prostaglandinas y un mensajero muy activo denominado “factor de agregación plaquetaria” en el lenguaje inglés “Platelet Aggregation Factor” (PAF), se ha observado que en forma normal participa en la homeostasis neuronal, pero en el daño se convierte en un potente neurotóxico que actúa como un mediador en la inflamación. Sin embargo, en otros estados el PAF, al ser afectado por la enzima Acetilhidrolasa (AHs) se convierte en un compuesto neuroprotector, entre otras cosas bloqueando la síntesis del mismo PAF, además de promover acciones similares a las de los prostanoides como la antiinflamatoria y los efectos antimuerte celular (Bazan, 2005)

Por otra parte se ha observado que el DHA es precursor de productos que contrarrestan un daño en la neurona, como el mediador 10,17s-docosatrieno, denominado también neuroprotectin1. Este actúa evitando la infiltración leucocitaria, la activación de proteínas inductoras de la muerte neuronal, la expresión de genes implicados en la inflamación y el stress oxidativo del DNA , y facilita la sobrerregulación de proteínas bloqueadoras de la muerte celular (Bcl.-2 y Bcl-xL) (Bazan, 2005).

### ***3). El Fenómeno Convulsivo en el Sistema Nervioso Central***

Una convulsión es un trastorno patológico en los seres vivos cuyas manifestaciones involucran predominantemente el Sistema Nervioso Central (SNC) y comúnmente constituyen un síndrome neurológico caracterizado por crisis paroxísticas recurrentes generalizadas, cuyo origen son las descargas excesivas hipersincrónicas y autolimitadas de grupos de neuronas, con manifestaciones estereotipadas (Brailosky y col., 1991). La terapia para éste padecimiento es básicamente la aplicación de fármacos.

En el transcurso del tiempo estas alteraciones han recibido explicaciones muy diversas, las cuales han estado sujetas, en forma general, al nivel de conocimientos científicos y culturales de la época. Ya en el siglo XVIII Hoffman consideraba que “*la irritabilidad de la materia viva*” era una definición básica del trastorno conocido como epilepsia.

Los signos y síntomas pueden presentarse asociados de manera común, con uno o varios tipos de crisis epilépticas, con presentación y recurrencia semejantes, así como también síntomas y signos neurológicos y psicológicos que pueden ser corroborados con datos electroencefalográficos y de neuroimagenología (Vespa y cols, 2007).

### ***4) Crisis convulsivas asociadas a hipertermia en la etapa neonatal***

Las convulsiones son uno de los signos neurológicos más frecuentes en el recién nacido, su reconocimiento clínico es de suma importancia porque puede ser el primer y único signo de alteración del sistema nervioso central. Por lo regular, las convulsiones en la etapa neonatal son ideopáticas, en contraste con las que se presentan en edades posteriores. En raras ocasiones se conoce su etiología, sin embargo, en la mayoría de los casos la búsqueda de la o las causas es

vital con el objeto de establecer un tratamiento lo más específico posible en los casos tratables (Holmes, 1997).

La base etiológica de la convulsión, es el desbalance entre potenciales excitatorios e inhibitorios a favor de los primeros, lo que se traduce en una despolarización y descarga excesiva de impulsos en la neurona. Se ha reportado que en el cerebro del recién nacido existe mayor susceptibilidad a las convulsiones debido fundamentalmente a diversos factores, entre los que se encuentran:

- 1) Un aumento de la excitabilidad celular (Leinekugel y Khalivov, 1999)
- 2) Menor número de sinapsis inhibitorias, las cuales en fases tempranas y en determinadas regiones del cerebro pueden comportarse como excitatorias (Brooks-Kayal, 2005).
- 3) factores o estados que pueden exacerbar las convulsiones o inducir las, como la hipoxia, alteración del PH e nivel tisular en el cerebro, o los estados de fiebre (Schumann y cols, 2006).

Se ha reportado que el tipo más común de trastorno epiléptico observado en los niños son las crisis convulsivas provocadas por fiebre (CF). La incidencia de ésta alteración es de entre el 3-5% (Dube y cols, 2000), y recientemente entre el 2-5% (Joshi y cols, 2005), con ocurrencia generalmente entre los 5 meses y 5 años de edad. Recientemente, en un estudio retrospectivo en pacientes menores de 15 años con problemas de convulsiones e ingresados a un hospital entre 1999-2004, se determinó que la causa más común en la presentación de crisis convulsivas fueron las CF (Mohebbi y cols., 2004). Las convulsiones se han clasificado como reactivas, sintomáticas, o ideopáticas dependiendo de la causa que las provoque (Sperber y cols., 1999).

Estudios epidemiológicos han mostrado, por un lado, que las CF no progresan a un síndrome epiléptico en la vida adulta (Shinnar, 1990; Knudsen y cols., 1996), sin embargo, en pacientes

con epilepsia del lóbulo temporal se ha encontrado que de un 30-50% los pacientes tenían entre sus antecedentes clínicos haber padecido de CF durante su infancia, sugiriendo la participación de esta anomalía como un posible factor etiológico para la Epilepsia del Lóbulo Temporal (Gluor, 1991; Cendes, 2004).

Por otro lado, se ha pensado en la posibilidad de que las CF pudieran tener un papel importante en la generación de la Esclerosis Mesial, un trastorno en el tejido neuronal, que suele encontrarse en 2-3 pacientes con epilepsia refractaria a fármacos (Cendes y cols., 2004; Lewis, 2005)

Sin embargo también se han reportado hallazgos que no apoyan esta idea, por ejemplo, en un estudio en el que se evaluaron por resonancia magnética (RM) 32 niños con antecedentes de convulsiones por CF, no se observaron cambios que indicaran esclerosis en regiones como la formación hipocampal, la amígdala o el área mesial temporal; no obstante, tres de los pacientes que presentaron en sus primeros años de vida crisis febriles prolongadas ( $\geq 30$ min) tenían un volumen menor de la formación hipocampal cuando se compararon con los sujetos control. (Takka y cols., 2003).

Lamentablemente, en el estudio anterior no se reportan los datos en cuanto a los periodos de duración del estado convulsivo, lo cual permitiría sugerir que las CF en el niño, por si mismas, no pudieran ser un factor de riesgo para padecer esclerosis mesial, sino que es necesario la participación de otros factores como la propia convulsión, el número de periodos convulsivos y su duración, condiciones que podrían consecuentemente causar malformaciones del tejido cerebral o pérdida de neuronas en regiones específicas (Maher y cols., 1998). La mayoría de las convulsiones en el ser humano duran menos de 10 min y sólo un 6-7% se prolongan aproximadamente hasta 15 min. (Nelson y cols, 1976).

Por razones obvias, las consecuencias de CF o la repetición de estas en la vida neonatal del ser humano, no pueden ser estudiadas debidamente, por tanto, la implementación de modelos

animales ha sido de gran ayuda para dilucidar los cambios neuroanatómicos, neuroquímicos y neurofisiológicos que subyacen a las convulsiones generadas por CF.

### ***Convulsiones inducidas por hipertermia (CPH)***

La rata ha sido el animal más utilizado como modelo experimental para investigar las causas que provocan las convulsiones asociadas a un cuadro de fiebre en los niños. Los modelos en general utilizan una fuente de calor externa para aplicarla sobre los animales, es decir una condición de hipertermia en donde las convulsiones generadas en los sujetos mediante éste elemento, se llaman comúnmente convulsiones por hipertermia (CPH). Mediante este método se han reportado hallazgos muy interesantes que tratan de dilucidar la o las causas que provocan las CPH. Por ejemplo, Hijersen y cols. (1988) probaron la hipótesis de si la presentación de CPH en ratas era dependiente de la edad; para ello utilizaron una metodología que empleaba flujo de aire caliente sobre los animales de entre 10 y 17, ó 24 y 29 días de edad. Se reportó que éstos animales fueron resistentes a presentar el estado convulsivo en los dos periodos de edad, sin embargo las convulsiones aparecieron cuando la temperatura generada en el medio que rodeaba al sujeto se elevó hasta los 49° C. lo cual indicaba que a mayor edad mayor resistencia a una convulsión generada por altas temperaturas (Marimoto y cols., 1993).

Se ha reportado en niños y en animales, que las manifestaciones conductuales y electrofisiológicas provocadas por un daño al SNC son más severas durante las etapas tempranas del desarrollo, que cuando el cerebro alcanza su estado adulto (Sperber y cols., 1992), incluso, el efecto de sustancias excitotóxicas como el ácido kaínico (AK) tiene efectos diferentes tanto en la etapa neonatal como en la adulta en ratas inyectadas con dosis semejantes, es decir, a ratas a las que se les aplicó AK durante la 2ª semana de vida postnatal, presentaron estados convulsivos más frecuentes y severos, así como una elevada mortalidad en comparación de ratas adultas inyectadas con dosis similares (Albala y cols., 1984).

Baram y cols. (1997) han desarrollado un modelo de CPH en rata, exponiendo las crías a hipertermia moderada mediante aire caliente y provocando convulsiones en cerca del 90% de los sujetos. Una de las ventajas de éste método es que se presenta menos afectación en los sujetos

como quemaduras, necrosis, pérdida de miembros o alta mortalidad. Las crisis de convulsiones son bastante reproducibles en ratas de 10-11 días de edad, y aunque la correlación precisa entre el desarrollo del cerebro de rata y del humano no es exacta, evidencias basadas en rangos de crecimiento cerebral y mielinización sugieren que la edad de rata entre el 5° y 7° día es equivalente al día 1 del nacimiento en el humano (Doobing y Sands, 1973).

Por otro lado, en estudios realizados con animales, se ha observado que, al igual que en el procedimiento de kindling (un modelo de epilepsia experimental en el cual se pueden provocar convulsiones mediante la estimulación eléctrica progresiva de estructura cerebrales, y que se correlacionan con registros electroencefalográficos y conductuales (Racine y cols., 1972)), se producen convulsiones prolongadas por la aplicación de sustancias como el ácido kaínico, en donde el proceso convulsivo se puede asociar con una pérdida de neuronas en el hipocampo, alteraciones que se asemejan a las encontradas en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Lewis, 2005). Tal pérdida neuronal, al parecer es progresiva (Dudek, 2002) y probablemente involucra un mecanismo de plasticidad neuronal, consistente en una reorganización de las sinápsis, propiciando indirectamente un incremento en la excitabilidad en los circuitos involucrados (Shao y Dudek, 2004). Sin embargo, también se ha sugerido que una sola convulsión no implica pérdida de neuronas o muerte neuronal (Lee y cols., 2001).

A la fecha, no se ha definido con claridad si las convulsiones generadas por hipertermia (CPH) durante los primeros días de vida de la rata, las predisponen a un estado epiléptico en la vida adulta. La pregunta ha motivado una serie de estudios en los que inicialmente se había observado que las CPH en la vida inicial de la rata, no se asocian con periodos de convulsiones espontáneas en la vida adulta. Por ejemplo, Dube y cols (2000) después de haber expuesto ratas machos de 10 días de edad a CPH utilizando el modelo de flujo de aire caliente (Baram, 1997), no encontraron anomalías conductuales ni presencia de convulsiones espontáneas al realizar un periodo de

observación cuando las ratas tenían la edad de 71 días, así como tampoco observaron diferencias entre los registros electroencefalográficos de estos animales al compararlos con los controles, Sin embargo, estos animales adultos-jóvenes mostraron bajo umbral a la administración parenteral de ácido kaínico, lo cual mostró que las convulsiones producidas en ratas mediante el modelo de CPH propician en la edad adulta un sistema neuronal con bajo umbral para las convulsiones. Sin embargo, recientemente, éstos mismos autores reportaron que las alteraciones producidas en el SNC de ratas sometidas a hipertermia durante sus primeros días de vida si progresan a un cuadro de convulsiones espontáneas en la vida adulta (Dube y cols., 2006).

En contraste con los resultados anteriores, durante convulsiones producidas experimentalmente en ratas neonatas mediante hipertermia (CPH), no se ha observado la pérdida de neuronas en zonas específicas de la zona límbica, ni repercusiones en la vida adulta, pero si daños discretos que pudieran influir en el funcionamiento neuronal. Esta es una de las conclusiones a las que llegó Thoth y cols., (1998); utilizando el modelo de hipertermia inducida por flujo de aire caliente, en ratas de 10-11 días, y sacrificadas 24 hs. posteriores a la exposición, observó en el hipocampo (CA1, CA3) gran cantidad de neuronas con argirofilia, las cuales estaban interpuestas entre neuronas normales. Esta alteración se observó también en los núcleos lateral y basal de la amígdala, revelando con mayor magnificación alteraciones estructurales. Aunque la sinapsis estaba preservada, estos cambios en el tejido fueron detectados hasta 2 semanas posteriores a la CPH, sugiriendo que alteraciones “discretas” no progresan a muerte neuronal. En estos estudios, es interesante señalar que el daño no fue provocado por el estado de hipertermia per se, sino por el estado febril (42-43°C) asociado el estado convulsivo. A pesar de que los cambios estructurales producidos por la CPH en el tejido neuronal al parecer no son permanentes, a diferencia de los observados en la función neuronal, éstos últimos parecieran ser más trascendentales. En este sentido se ha observado en preparaciones de ratas expuestas a CPH que

al estimular la colaterales de Schaffer de CA1, hubo disminución de la amplitud en la respuesta del potencial de la neurona, alteración que duró por lo menos una semana en estos animales (Chen y cols.,1999) .Por otro lado en este estudio anterior se determinó que la condición de hipertermia más las convulsiones, alteraron las propiedades de las corrientes hiperpolarizantes que modulan la sincronización de núcleos neuronales en el tálamo e hipocampo. Los canales que median éste tipo de corrientes participan en la regulación del potencial de membrana en la neurona (Lupica, 2001), y en este caso se observó mediante la técnica de Patch- Clamp que la amplitud de las corrientes registradas en éste tipo de canales se incrementó en todas las intensidades de estimulación. Tal potenciación duró por lo menos 10 semanas posteriores al evento de hipertermia, lo cual, según el autor, indica que las CPH favorecen la participación de los receptores de GABA<sub>A</sub> que median el control inhibitorio de las células piramidales.

Por otro lado. Se ha sugerido que la susceptibilidad a CPH tanto en humanos como en animales presumiblemente es resultante de la inmadurez de los mecanismos que controlan la excitabilidad del tejido cerebral (Brooks-Kayal, 2005), y aunque la ocurrencia de las CPH son un hecho bastante común en la práctica pediátrica, no se han definido claramente los cambios neuroquímicos que subyacen a éste trastorno. Se ha observado que la glutamato Descarboxilasa (GAD), enzima que cataliza al ácido glutámico por descarboxilación para la formación de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), es uno de los substratos neuroquímicos que se ve afectado por las CPH. Estudios en animales han mostrado que la GAD del cerebro en recién nacidos es más susceptible a inactivarse ante temperaturas altas en comparación con la GAD de animales en edad adulta (Arias & Tapia, 1992)). Una de las sustancias químicas que inhibe específicamente la GAD y que se ha utilizado como inductor de convulsiones en animales es el ácido 3-mercaptopropiónico.

### ***5) Crisis convulsivas inducidas por el Acido 3-Mercaptopropiónico***

En estudios realizados en modelos animales, particularmente en ratas neonatas, se han observado crisis con convulsiones producidas por un agente convulsivante que inhibe con cierta especificidad la Glutamato-Decarboxilasa (GAD). Esta sustancia es el ácido 3-mercaptopropionico (3-MPA), pertenece a la familia de los mercaptanos, su estructura es relativamente simple y fue sintetizado por Loven en 1884. Entre sus principales características fisicoquímicas se ha determinado que el 3-MPA generalmente reacciona transfiriendo el grupo sulfuro (Fisher, 2002).

Inicialmente Sprince (1969) fue el primero en reportar en ratas y ratones la acción convulsivante del 3-MPA, Lamar y cols (1970) confirmaron el efecto y mostraron que la acción se debe principalmente a la inhibición de la Glutamato-descarboxilasa (GAD)-enzima que cataliza la transformación de glutamato a ácido  $\gamma$ - Aminobutírico (GABA)-. En el estudio, el efecto convulsivo se produjo en ratas de 150-200 grs. de peso con dosis de 32 mg/kg. Posteriormente se reportó en ratas que la aplicación del 3-MPA inhibió la GAD y decremento los niveles de GABA en diversas regiones del cerebro, tal efecto se observó 4 min. Después de la aplicación i.p. de 50 mg/kg de 3-MPA. Con una dosis similar se observó en ratas un decremento de la concentración de GABA en sinaptosomas y en el tejido de 11 regiones cerebrales (Locher y cols. 1985).

Por otro lado, se ha reportado que la inhibición de la GAD por el 3-MPA es dependiente de la edad. Es decir, en un estudio en el que se aplicó el convulsivante a ratas de 12 días (R12) y de 90 días de edad (R90), se observó que al aplicarles 70 mg/kg de peso i.p., el decremento en la GAD en R12 fue del orden de 76%, en comparación con el obtenido en R90 que fue de 58%. En el experimento se observó que la latencia promedio para que se presentaran las convulsiones fue de 19 min. para R 12 en comparación con 9 min registrados en las R90. Los autores argumentaron

que para las latencias mayores observadas en las ratas de 12 días pudieran influir otros factores que retardaron el periodo convulsivo, entre estos estarían la sobre regulación de receptores GABA en el cerebro inmaduro y, por otra parte, la inhibición de la GABA-T (Netopilova y cols., 1995, 1997).

Por otro lado, estos modelos animales en los cuales se generan convulsiones por la afectación de un sistema de neurotransmisión inhibitor, como el GABA, tratan de indagar las causas que provocan la sobreexcitación neuronal particularmente en aquellas estructuras cerebrales comúnmente involucradas en patologías como el síndrome de epilepsia, y en especial la epilepsia del lóbulo temporal en el humano, en donde el Hipocampo y la Amígdala son de las estructuras mayormente afectadas por esta enfermedad.

Particularmente, la alta sensibilidad de la Amígdala en el contexto de la convulsión, tiene repercusiones adversas de suma relevancia, ya que lleva a cabo funciones de integración y de modulación muy importantes para la supervivencia del organismo.

## ***6. La Amígdala***

Amígdala o complejo Amigdalino (Am) es un término que define una región altamente diferenciada del lóbulo temporal en los hemisferios cerebrales de los mamíferos. Se ha pensado que pudieran ser partes diferenciadas de la corteza tradicional, del Castrum, o del Cuerpo Estriado (Swanson, 1998), sin embargo se ha considerado que junto con el Cíngulo, el Septum, el Tálamo anterior, el Hipocampo y el Hipotálamo, entre otras estructuras, constituyen el Sistema Límbico, al que en el ser humano se le han atribuido funciones relacionadas con las emociones y la experiencia afectiva (Phelp y LeDoux, 2005).

### ***División Anatómica***

La Am desde el punto de vista anatómico es compleja en su división, básicamente consiste en numerosos núcleos celulares (hasta diez núcleos diferentes), mismos que se pueden agrupar en dos subgrupos baso laterales y corticomediales. El grupo Baso lateral se compone del núcleo basal, el núcleo basal accesorio y el núcleo lateral, mientras que el grupo corticomedial comprende el núcleo central, el núcleo medial y los núcleos corticales (Mc Donald, 1998).

### ***Conexiones***

La Am establece conexiones con gran cantidad de estructuras cerebrales. Sus vías aferentes provienen del bulbo olfatorio y los núcleos olfatorios anteriores, la corteza olfatoria primaria, el giro del cíngulo, la corteza prefrontal y temporal, el núcleo dorso medial del tálamo, el hipotálamo, los núcleos de rafe, el locus coeruleus y los núcleos parabraquial y del tracto solitario; las vías aferentes proyectan en términos generales en forma recíproca a las áreas de donde recibe aferentes. Se pueden distinguir dos principales rutas de salida: la vía amigdalofugal dorsal, que cursa a través de la estría terminal cuyas fibras se observan en la cara medial del núcleo caudado cerca del ventrículo lateral, y la vía amigdalofugal ventral, cuyas fibras cursan a lo largo de la base del cerebro (Nolte, 1999).

### ***Funciones***

La Am participa en diversas funciones relacionadas con respuestas autónomas, endocrinas y somatomotoras relacionadas con la motivación y las emociones (Phelp y LeDoux, 2005). Se ha propuesto que la función de la Am en estos procesos es analizar el significado emocional de la información sensorial y coordinar distintas áreas eferentes cerebrales, tanto motoras como neuroendocrinas y autónomas con el objetivo de modular la respuesta en conductas involucradas en la alimentación, la conducta sexual y el sueño, entre otras (Blundell y cols, 2001).

La Am y en particular los núcleos basal y basal accesorio reciben, y envían proyecciones al núcleo CA1 del hipocampo, sitio asociado con el ritmo theta observado en el EEG. A su vez, los núcleos basales y laterales están involucrados en la regulación de la actividad PGO o se ven influenciados por ésta (Calvo y cols, 1995). La actividad PGO se asocia entre otros fenómenos del sueño paradójico, con la regulación de las sacudidas mioclónicas en la cara y las extremidades (Loannidess y cols, 2004; Fejerman, 2005). Lo cual implicaría que la Am esta regulando la expresión de una conducta motora muy similar a la observada durante la convulsión. Existen diversos estudios que evidencian la contribución de la AM en la generación y propagación de convulsiones tanto en modelos animales (Adamec y Morgan, 1994; Shi y cols, 1995) como en el ser humano (Gloor y cols, 1991; Kalviainen y cols, 1997).

#### ***Papel de la amígdala en las convulsiones.***

Son múltiples las causas que pueden originar un trastorno convulsivo, las más comunes son: una lesión en el cerebro, complicaciones obstétricas, meningitis, encefalitis y anomalías congénitas (Stevens, 1999), sin embargo no se ha determinado con claridad el porque la Am es una de las estructuras cerebrales mas propensas a perder a nivel neuronal, un equilibrio entre los mecanismos de excitación e inhibición.

Son relativamente pocos los estudios que han tratado de dilucidar una alteración específica en la Am asociada a convulsiones. Por ejemplo, recientemente en pacientes diagnosticados con epilepsia del Lóbulo temporal y sometidos a cirugía para la resección de esta estructura, se observó un decremento en el número de sinápsis axosomáticas inhibitorias en el núcleo lateral de la Am (NLAm) al comparar con el mismo tipo de sinápsis pero en amígdalas de pacientes muertos por causas distintas a epilepsia (Yilmazer y cols, 2007). Al parecer el NLAm especialmente en su parte ventral parece jugar un papel importante en la propagación de la convulsión sobre todo a nivel de vías meso-temporales, debido entre otros factores a la alta

convergencia de impulsos intra y extraamigdalinos que fluyen de la parte dorsal a la parte ventral del NLAm y a su vez la conexiones de éste con la corteza entorrinal y la formación hipocampal (Pitkanen, y cols., 1998, 2002), Sin embargo una disminución en la inhibición en las proyecciones neuronales amigdalinas no necesariamente significa una inhibición de un grupo de neuronas, sino también este mecanismo puede sincronizar un grupo numeroso de células dando por resultado una excitación muy grande (D'Ántuono y cols, 2004).

Por otro lado estudios electrofisiológicos en la Am han mostrado que ínter neuronas GABAérgicas median la activación y retroalimentación de los mecanismos inhibitorios hacia neuronas a través de los receptores GABA-A (Samson y cols, 2003), y una reducción en estos mecanismos inhibitorios por bloqueo de los receptores a GABA-A contribuiría a la generación y diseminación de una actividad convulsiva en estructuras muy relacionadas con la Am como lo es el Hipocampo. Hewapathirane y cols (2005), experimentando en ratas a las que se les generaron convulsiones mediante Kindling, observaron que efectivamente la propagación de la actividad epileptiforme de la Am hacia el Hipocampo era inmediata pero solamente de forma ipsilateral, es decir, el Hipocampo ipsilateral fue reclutado en actividad epileptiforme después de 5 descargas (definidas éstas como un pico ó una onda-pico determinada en el EEG y cuya duración fue de por lo menos de 5 seg.); en contraste la actividad epileptiforme en el Hipocampo contra lateral surgió después de 8 descargas; éstas consideraciones son importantes porque al parecer esta diseminación, comprende una secuencia que pudiera explicar las manifestaciones conductuales en ratas con convulsiones generadas por Kindling eléctrico o químico y clasificadas mediante la escala de Racine. Por ejemplo, al parecer el estado I puede ser observado en la ratas cuando la convulsión se propaga de Am hacia el Hipocampo ipsilateral ventral, y el estado II cuando alcanza el Hipocampo ipsilateral dorsal, el estado II, IV y V se pueden hacer patentes en la rata cuando se alcanza el Hp contra lateral y otras estructuras subcorticales entre las cuales se han

propuesto al tálamo (Zhang y Bertram, 2002) Tallo cerebral y la corteza motora (Burnham y cols, 1981).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA GENERAL

Se ha reportado la baja prevalencia de enfermedades cardiacas y de alteraciones crónicas como psoriasis, asma y diabetes, asociadas al alto consumo de pescado y de sus derivados como el aceite, nutriente que tiene alto contenido de ácido Docosaexanoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA).

El DHA y EPA son parte constitutiva de la membrana neuronal, y recientemente se ha reportado en ratas que la aplicación de estas moléculas de  $\theta$ -3, por vía sistémica incrementa el umbral de neuronas sobrestimuladas eléctricamente. Asimismo, se ha reportado en seres humanos, una reducción de los periodos de crisis convulsivas en pacientes que recibieron un complemento alimenticio abundante en  $\theta$ -3 durante 6 meses. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto que pudiera tener la administración crónica de un producto natural como el aceite de pescado (dado como suplemento de la dieta), sobre los periodos de crisis convulsivas inducidas por hipertermia en ratas de 5 días de edad, y en ratas de 150 días de edad a las que se les produzca convulsiones mediante el ácido 3-mercaptopropiónico.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto del aceite de pescado como suplemento crónico más la dieta comercial que reciben ratas macho desde la etapa embrionaria y hasta la madurez, sobre un patrón de crisis con convulsiones inducidas ya sea por hipertermia en ratas neonatas (a los 5 días de edad), o por la administración i, p. de Acido 3-mercaptopropiónico en ratas adultas (a los 150 días de edad).

### **III. EXPERIMENTO 1**

#### ***EFFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR HIPERTERMIA EN RATAS MACHOS DE 5 DÍAS DE EDAD***

Se ha reportado una baja prevalencia de enfermedades como las arritmias cardiacas, hipertensión, psoriasis, asma y diabetes, asociada principalmente al alto consumo de pescado y de sus derivados como el aceite, nutriente que tiene altos contenidos de Acido Docosahexanoico (DHA) y Acido Eicosapentanoico (EPA). EL DHA y el EPA son parte constitutiva de la membrana neuronal. La carencia de estos ácidos grasos puede traer consecuencias adversas en las funciones cerebrales como el aprendizaje, la memoria, aumento en la actividad locomotora y trastornos conductuales, asimismo, otros estudios han reiterado el efecto benéfico del DHA y EPA sobre alteraciones nerviosas como la excitabilidad neuronal.

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la suplementación alimenticia diaria con aceite de pescado sobre las crisis convulsivas inducidas por hipertermia en ratas macho de 5 días de edad que fueron tratadas con APE desde su etapa embrionaria hasta los 5 días de edad.

#### **1) OBJETIVOS**

##### ***Objetivo General***

Evaluar el efecto del aceite de pescado suministrado como suplemento alimenticio (desde la gestación hasta la lactancia) sobre las crisis convulsivas inducidas por hipertermia en ratas macho de 5 días de edad.

### ***Objetivos específicos.***

1. Determinar si ratas macho de 5 días de edad tratadas desde la gestación con un suplemento alimenticio de aceite de pescado muestran mayor resistencia a experimentar crisis convulsivas provocadas por hipertermia experimental.
2. Describir y caracterizar conductualmente las crisis convulsivas inducidas por hipertermia en ratas machos de 5 días.

## **2) HIPOTESIS**

El suministro crónico de aceite de pescado (como suplemento alimenticio) dado desde la gestación hasta la lactancia, incrementará el umbral y disminuirá la frecuencia y duración de las crisis convulsivas inducidas por hipertermia en ratas de 5 días de edad.

## **3) MATERIALES Y METODOS**

### ***3.1 Animales y dietas***

Dieciocho ratas hembras de la cepa Wistar con peso de entre 45-50 grs. o 45 días de edad., fueron divididas en tres grupos:

El grupo (SAPE) constituido por 6 hembras, las cuales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica, un suplemento de aceite de pescado (*Lab. Diet Labs®USA*) a una dosis de 300 mg/kg de peso.

El grupo (SAPA) constituido por 6 hembras, las cuales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica un suplemento de aceite de palma (*Spectrum Chem. MFG Corp, ® USA*) a una dosis de 300 mg/kg de peso.

El grupo (CTRL) constituido por 6 hembras, las cuales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía ntragástrica, 200  $\mu$ l de agua...

Las hembras de los tres grupos iniciaron sus respectivos tratamientos a partir de los 45 días de edad.

La composición de los suplementos y de la dieta base se detallan en la tabla 1

Tabla 1  
Principales ácidos grasos contenidos en el aceite de palma, el aceite de pescado y la dieta base. (g/100 grs. de ácidos grasos)

Mirístico	C14:0	0.5-5.9	6.51 $\pm$ 0.34	
Palmítico	C16:0	32-47	17.62 $\pm$ 0.82	13.03
Esteárico	C18:0	2-8	3.39 $\pm$ 0.18	4.02
Oleico	C18:1	33-44	17.84 $\pm$ 1.2	23-66
Linoleico	C18:2	7-12	13.99 $\pm$ 1.1	51.6
Linolénico	C18:3	ND	2.44 $\pm$ 0.15	4.98
	C20:5 (n-3)	ND	13.55 $\pm$ 0.90	0.6
EPA	C22:5 (n-3)	ND	2.31 $\pm$ 0.15	0.2
DHA	C22:6 (n-3)	ND	11.76 $\pm$ 0.92	

1)Palm oil (Spectrum Chemical Mgf Corp. USA)

2)Aceite de pescado (Omega/Rx Zone Labs. USA)

3)Laboratory Rodent Chow (5001 Purina, Mills Co. USA)

### *Apareamiento*

Cuando las hembras de los tres grupos alcanzaron la edad de 135 días se colocaron en apareamiento programado con machos de la misma cepa con un peso entre 350-400g Si al día

siguiente se confirmó la presencia de espermatozoides y la formación de tapón vaginal, ese día se consideró como el día 1° de gestación.

Las hembras se alojaron en el bioterio en jaulas individuales a una temperatura de entre 20-22 °C, en ciclo luz- oscuridad 12 X 12 hrs. y se alimentaron con la dieta y el suplemento alimenticio correspondiente. El primer día después del nacimiento, cada camada se ajustó a un número de 8 crías conservando el mayor número de machos posible. A los 5 días de edad, las crías macho de los diferentes grupos (cuyas madres recibieron desde antes de la gestación el tratamiento con aceite de pescado, de palma o de agua) fueron expuestos a un método experimental de hipertermia (Baram y cols., 1997), durante 30 minutos con el objeto de inducir las crisis convulsivas características. Después de éste proceso, las crías se regresaron con la madre y permanecieron con ella hasta la edad de 22 días posparto, fecha en que se destetaron y se mantuvieron en cajas individuales.

### ***3.2. Exposición a Hipertermia e inducción de crisis convulsivas***

La exposición experimental a hipertermia (HP) se llevo a cabo por el método descrito por Baram y cols. (1997), el cual consistió en lo siguiente:

Sujetos.- 16 ratas machos de 5 días de edad provenientes de distintas madres del grupo

SAPE.

16 ratas machos de 5 días de edad provenientes de distintas madres del grupo

SAPA.

16 ratas machos de 5 días de edad provenientes de distintas madres del grupo

CTRL.

#### ***Materiales:***

Vaso de precipitado de 3 lts. (Pyrex, USA)

#### ***Aparatos***

Cámara de video

Termómetro digital

Computadora personal

Secadora de pelo

Cronómetro.

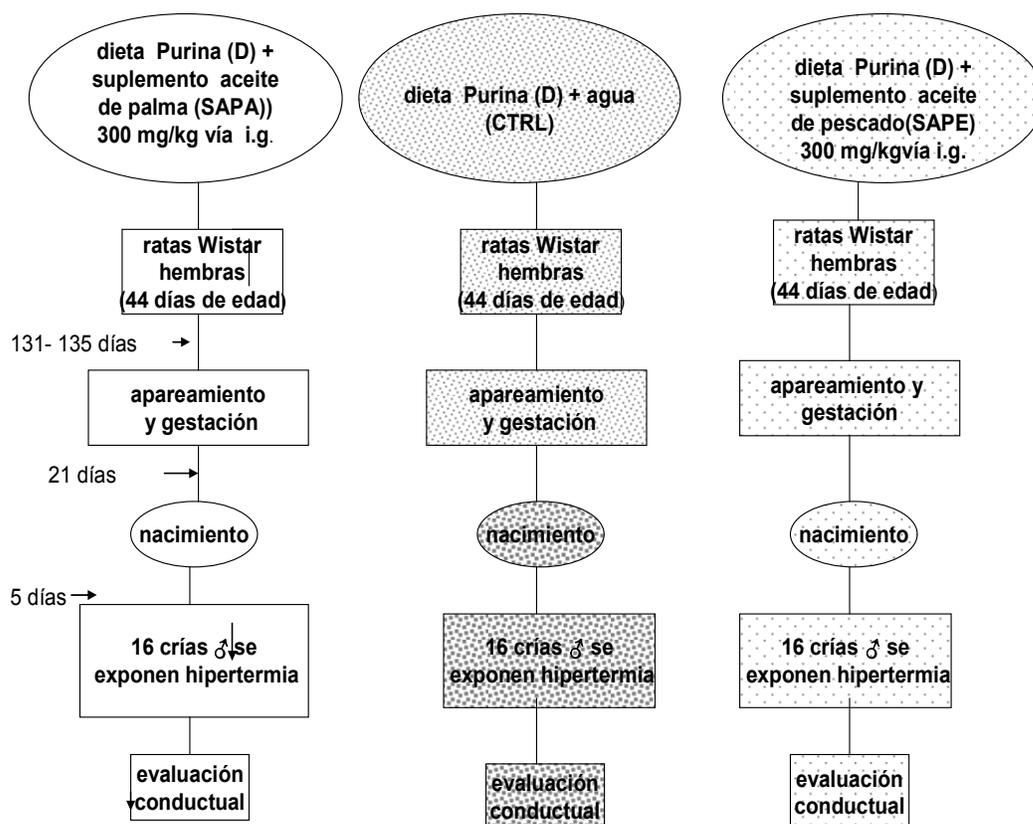
### ***Procedimiento***

El cuarto donde se llevó a cabo el experimento (4 X 4 mts.) se mantuvo a una temperatura de entre 20-21 °C. Antes de la sesión de hipertermia, cada sujeto fue pesado y se le tomó la temperatura corporal para posteriormente colocar 2 sujetos dentro del contenedor (el cual estuvo acondicionado a una temperatura ambiente de 20 °C). El experimento inició cuando se encendió la secadora de pelo dirigiendo el flujo de aire caliente hacia el interior del contenedor, haciéndolo en forma circular y  $\pm 50$  cm. por encima del sujeto experimental. La corriente de aire se mantuvo durante 90 seg. Al término de este periodo el sujeto se sacó del contenedor y se procedió a registrarle su temperatura colocando el termómetro en la zona rectal, esta maniobra duró aproximadamente 30 seg. Al término de éste lapso, el sujeto fue colocado nuevamente dentro del recipiente y nuevamente se les expuso al aire de la secadora durante otros 90 seg., la maniobra se repitió 13 veces de tal manera que el experimento duro 30 min. Durante este lapso, los sujetos experimentaron un incremento gradual de la temperatura corporal entre los 33°C y hasta los 43 °C. Al final, cada sujeto se colocó en una superficie fría durante 30 min. y se les rehidrató con agua desionizada monitoreando su estado durante 30 minutos hasta su recuperación. Todos los críos fueron regresados con su madre, con la que permanecieron en lactación hasta la edad de 22 días, fecha en que se destetaron.

Durante todo el proceso de gestación y lactancia se registró el peso de las madres y de las crías así como el consumo de alimento y agua. La aplicación de los tratamientos se realizó diariamente entre las 21 y 22 hrs.

Todos los procedimientos de hipertermia fueron video grabado para la posterior evaluación conductual de cada uno de los sujetos de los diferentes grupos (Diagrama de flujo).

### *Diseño Experimental*



*Diagrama de Flujo:* Diseño y conformación de los diferentes grupos del experimento de hipertermia.

### **3.3 Evaluación conductual de crisis inducidas por Hipertermia Experimental (HP)**

Las conductas que fueron evaluadas durante el proceso de HP y que fueron determinadas tomando como referencia la escala de Racine (1971) son las siguientes:

1. Mioclonias
2. Deambulación o marcha
3. Movimientos de la cola

4. Descanso            5. Pérdida de la postura

#### **4) ANALISIS ESTADÍSTICO**

Para cada una de las conductas y para las variables de temperatura, peso corporal y consumo de alimento llevamos a cabo un Análisis de Varianza (ANDEVA) de un factor, las diferencias se analizaron mediante la prueba de Tukey considerado un intervalo de confianza de  $p < 0.05$ .

#### **5) CONSIDERACIONES ETICAS**

El cuidado de los animales, así como todos los procedimientos en los que estos participaron, fueron aprobados por el Comité de Etica del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Guadalajara, el cual sigue los requerimientos propuestos por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, of the Nacional Institutes of Health. (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, 1996).

#### **6) RESULTADOS**

##### ***6.1 Evaluación del peso corporal y consumo de alimento de las madres de los sujetos experimentales***

Al comparar los pesos registrados en las madres de los sujetos experimentales de los diferentes grupos, evaluados desde el día que iniciaron el tratamiento (45 días de edad) hasta los días previos al apareamiento, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 2). En el consumo promedio diario de alimento tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (Fig. 3)

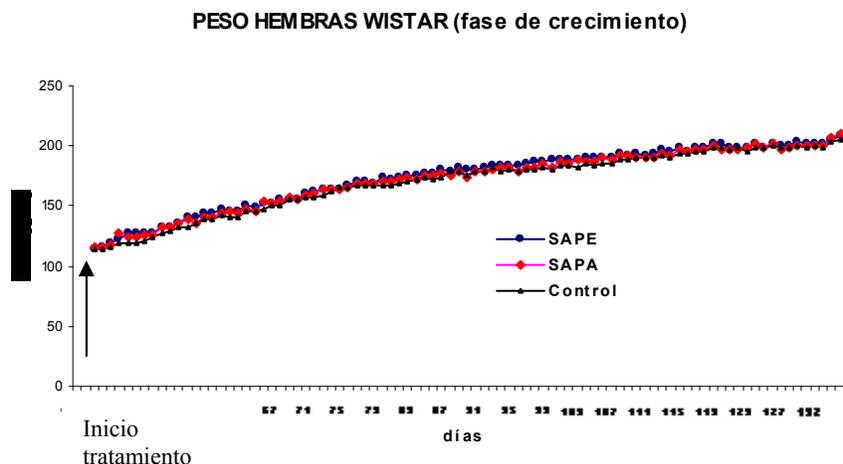


Fig. 2 Media del peso corporal de las hembras Wistar de los diferentes grupos a través de los días de tratamiento, hasta los días previos al apareamiento (n=6 por grupo).

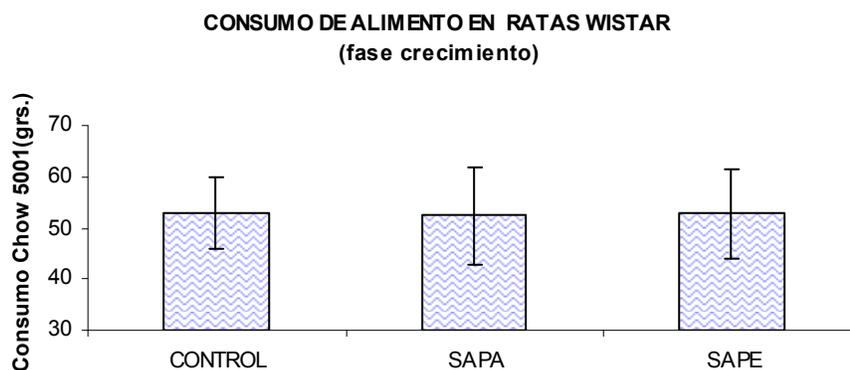


Fig. 3 Media  $\pm$  ES de la cantidad de alimento consumido por las hembras de los diferentes grupos desde la edad de 45 días y hasta la etapa de apareamiento (n=6).

### 6.2) *Peso Corporal de las crías durante el experimento*

El peso corporal de las crías provenientes de las madres con los diferentes tratamientos, no presentó diferencias entre los diferentes grupos durante los primeros cinco días de vida (Fig.4). En el quinto día fueron sometidos a la fase de hipertermia (HP).

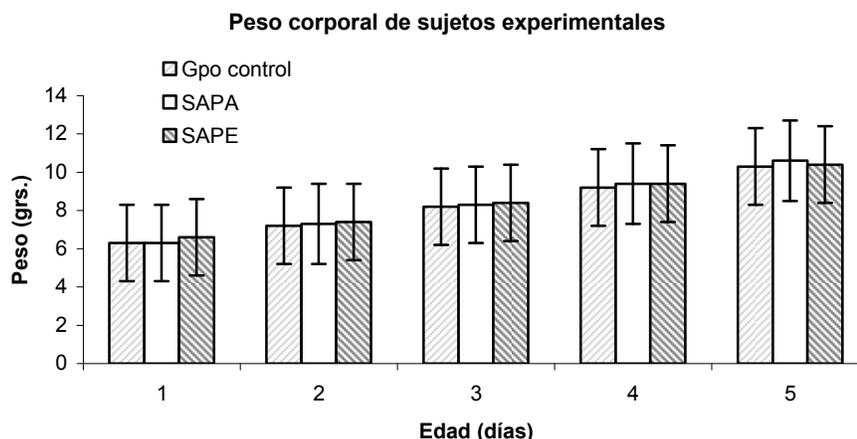


Fig.4 Media  $\pm$  ES del peso (grs.) de los sujetos de los diferentes grupos durante los primeros cinco días de vida (n=16 por cada grupo)

### **6.3 Evaluación de la temperatura corporal durante la hipertermia**

Los datos de la temperatura rectal registrada en cada uno de los sujetos de los diferentes grupos durante los 30 min. que duró la HP, mostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos al comparar estadísticamente los primeros dos minutos del experimento de HP ((2,45)  $f= 0.74$ )  $p=514.87$ ).

Sin embargo a partir del minuto cuatro, el grupo SAPE mostró valores de temperatura corporal significativamente menores ((2,45)= 6.85)  $p<0.01$ ) en comparación con los grupos SAPA y CTRL, manteniéndose esta diferencia estadísticamente significativa hasta el final del experimento (F (2,45 = 6.85)  $p <0.01$ ). Los sujetos de los grupos SAPA y CTRL alcanzaron temperaturas de entre 38-39 °C desde los 12 min., en tanto que los sujetos del grupo SAPE mostraron estas altas temperaturas hasta el final del proceso de hipertermia (30 min.) (Fig.5).

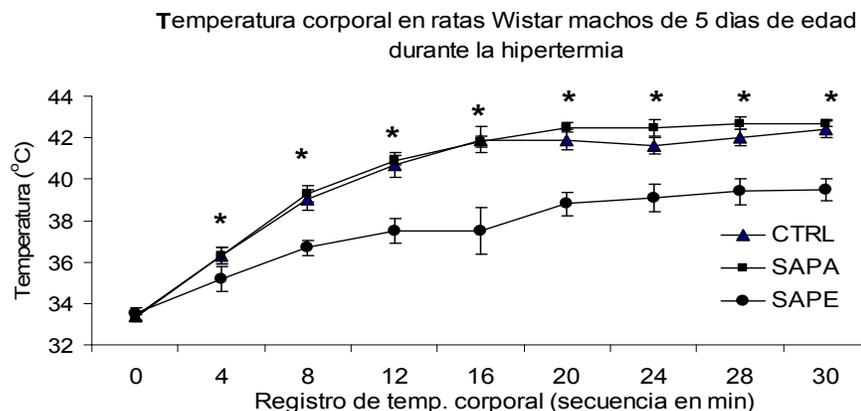


Fig. 5 Media  $\pm$  ES de la temperatura corporal manifestada por los sujetos de los diferentes grupos en relación al tiempo (min.) que estuvieron expuestos a hipertermia. Se observa que los grupos CTRL y SAPA registraron temperaturas más altas que el grupo SAPE a partir del min. 4. Asimismo se observa que la temperatura corporal de los sujetos del grupo SAPA fue significativamente mayor que la registrada en los sujetos del grupo control, aunque hacia el final del experimento estos dos grupos manifestaron temperaturas más altas que los del grupo SAPE (40-42°C) (n=16 por grupo).\*\* p< 0.01 SAPA y CTRL significativamente mayores que SAPE.

Los grupos SAPA y CTRL mostraron una menor latencia (14min.) para manifestar en promedio una temperatura de 39 °C en comparación con los sujetos del grupo SAPE en quienes, la latencia para alcanzar la temperatura de 38.9 °C fue significativamente mayor (30 min.). La temperatura alcanzada por los grupos SAPA y control a los 30 min. fue en promedio de 41.3 y 41.7 °C respectivamente .

#### **6.4 Resultados conductuales durante la hipertermia**

Los estados conductuales predominantes y descritos en la metodología, en su mayoría se presentaron en forma secuencial, es decir, los animales presentaban mioclonias a lo cual procedían movimientos de marcha o deambulación (con o sin movimiento de la cola), posteriormente se detenían (podían presentar o no mioclonias durante éste estado), en la misma secuencia perdían el control de la postura pudiéndose incorporar a una postura normal de cuadripedestación o perder el control de la postura en forma intermitente, acompañado esto por mioclonias(ver fig. 6).

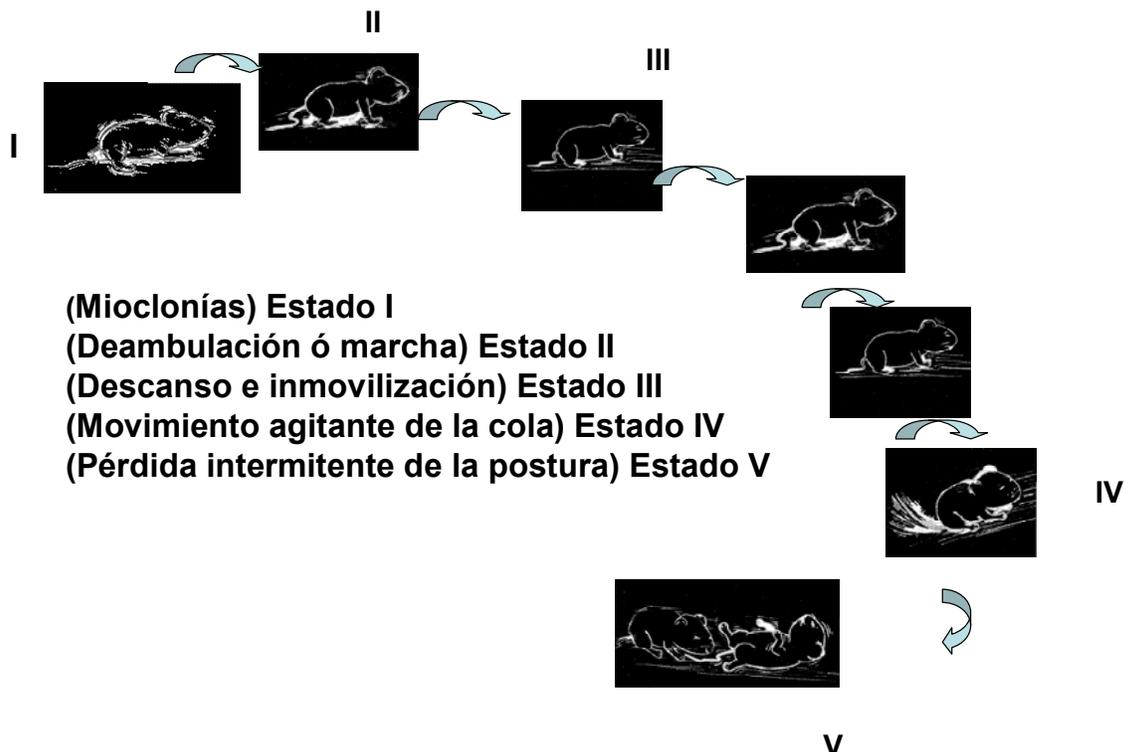


Fig. 6 Conductas desplegadas por las crías macho de 5 días de edad durante el procedimiento de hipertermia experimental.

Es indispensable hacer notar que el estado 1 y 5 son semejantes al estado I y V de la escala de Racini (Apéndice) con la cual se han evaluado el Kindling eléctrico ó químico en la rata. Al realizar el conteo total de las mioclonias presentadas por cada sujeto en cada uno de los diferentes grupos, se encontró que las crías del grupo SAPE experimentaron significativamente menor número de mioclonias al compararse con el grupo CTRL ( $F(2,45)=7.24, p< 0.05$ ) (fig.7).

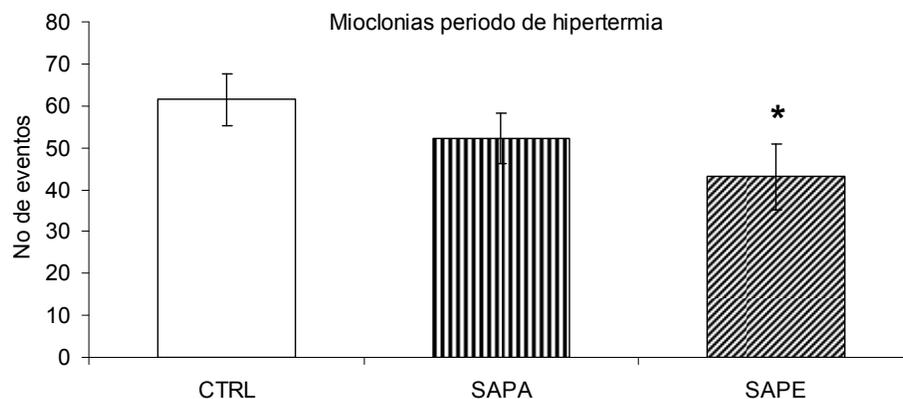


Fig. 7 Media  $\pm$  ES del total de mioclonias presentadas por los sujetos de los diferentes grupos durante los 30 min de hipertermia. El grupo SAPE presentó en promedio un menor número de mioclonias, que el grupo CTRL. No hubo diferencias entre el grupo SAPE y el grupo SAPA (n =16 por grupo), \*  $p < 0.05$  SAPE significativamente menor que CTRL.

Al compararse el número de mioclonias que ocurrieron después de la primera pérdida de postura en forma intermitente (estado V), se encontró que los sujetos del grupo SAPE mostraron significativamente menor número de mioclonias después de la aparición de pérdida de postura en forma intermitente, al compararlos con los grupos CTRL y SAPA ( $F(2,45) = 16.49$ ,  $p < 0.05$ ) (fig.8).

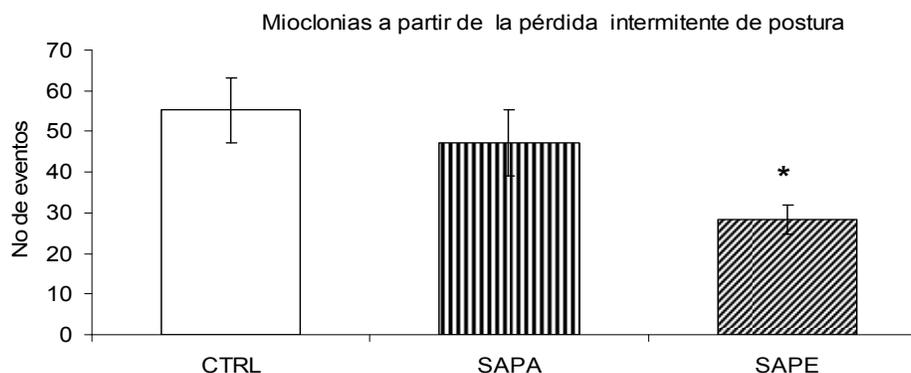


Fig. 8 Media  $\pm$  ES del número de mioclonias en cada uno de los grupos después de haber presentado la primera pérdida de postura intermitente (estado V). Nótese que el grupo SAPE mostró un menor número de mioclonias que los grupos SAPA y CTRL (n=16 por grupo), \*  $p < 0.05$  SAPE significativamente menor que SAPA y CTRL,

En cuanto a los eventos de marcha o deambulación no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F(2,45) = 1.06$ ,  $p = 0.35531$ ), (fig. 9).

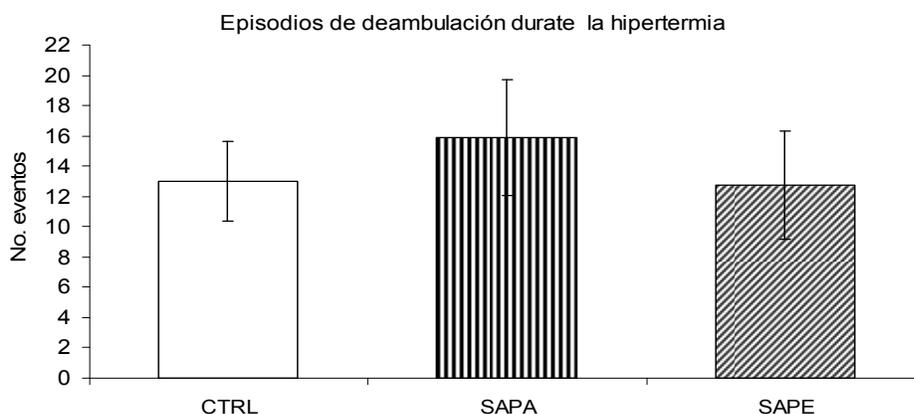


Fig. 9 Media  $\pm$  ES del número de veces que los sujetos de los diferentes grupos iniciaron la marcha o deambulación durante la HP. El grupo SAPA mostró mayores episodios de deambulación, sin embargo estadísticamente no hubo diferencias entre los tres grupos. ( $n=16$  por grupo)

Respecto a los eventos de descanso durante la hipertermia, se observó que el grupo SAPE y el grupo CTRL registraron menor número de descansos que el grupo SAPA, sin embargo estadísticamente no hubo diferencias entre los tres grupos ( $F(2,45) = 2.15$ ,  $p = 0.12$ ) (fig. 10).

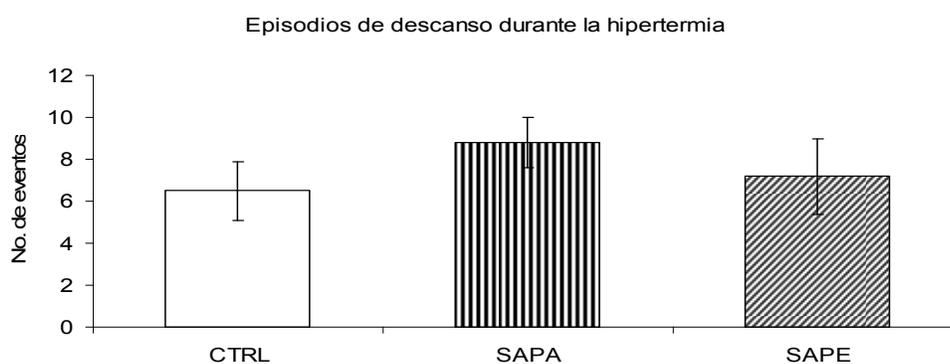


Fig. 10 Media  $\pm$  ES de la cantidad de veces que los sujetos de los diferentes grupos se detenían o descansaban después de deambular o iniciar una marcha durante la HP. El grupo SAPA mostró en promedio mayor número de descansos que los grupos SAPE y CTRL, sin embargo, las diferencias entre los 3 grupos no fueron estadísticamente significativas ( $n=16$  por grupo).

En cuanto al movimiento intermitente o de latiguo de la cola, se encontró que el grupo SAPE registró significativamente un menor número de movimientos de éste tipo, al compararlos con los del grupo CTRL y del grupo SAPA. Este último grupo mostró significativamente un mayor número de movimientos de latiguo de la cola que el grupo CTRL y el grupo SAPE ( $F(2,45)=44.24, p<0.01$ ). (fig. 11).

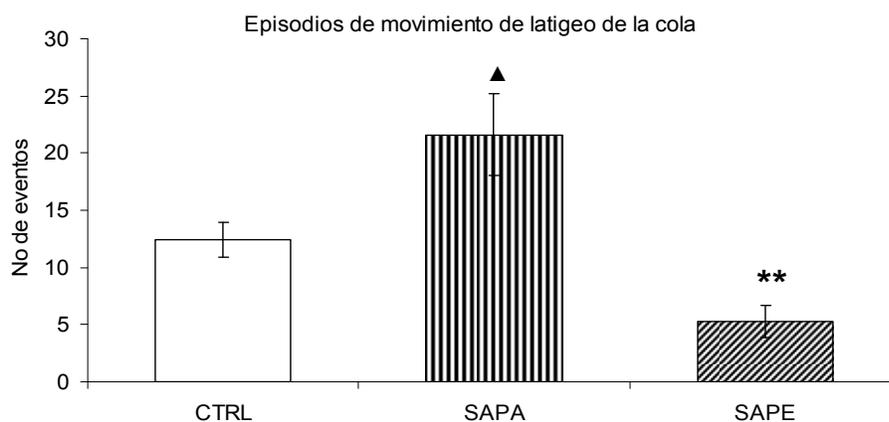


Fig. 11 Media  $\pm$  ES del número de movimientos intermitentes de la cola en forma de latiguo manifestados por los sujetos de los diferentes grupos. El grupo SAPE registró una menor cantidad de eventos que el grupo control y el grupo SAPA. Este último mostró también en promedio un mayor número de eventos respecto al grupo CTRL. (n=16 por grupo), \*\* p < 0.01 SAPE significativamente menor que SAPA y CTRL, ▲ p < 0.01 SAPA significativamente mayor que SAPE y CTRL.

Por lo que respecta a la latencia de aparición de la primera pérdida intermitente de la postura (incontrolable), se encontró que los sujetos del grupo SAPE registraron significativamente mayores latencias para mostrar esta conducta en comparación con los sujetos de los grupos CTRL y SAPA ( $F(2,45)=48.80, p<0.01$ ). No hubo diferencias significativas entre los grupos CTRL y SAPA. (fig. 12).

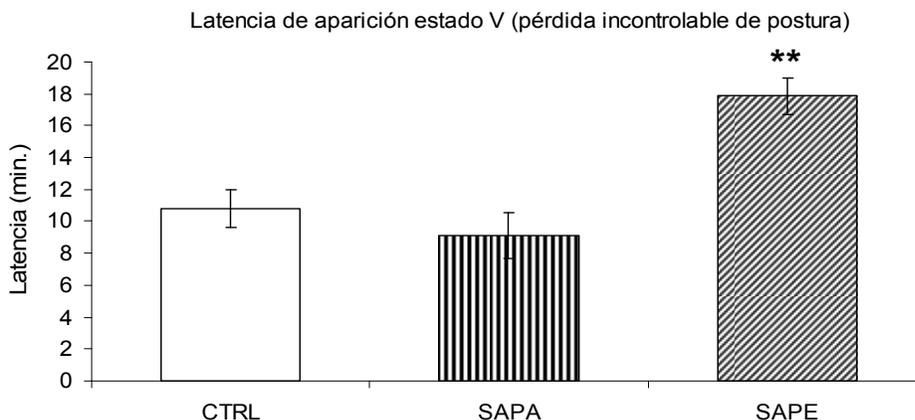


Fig. 12 Media  $\pm$  ES de la latencia para la primera pérdida incontrolable de la postura en los sujetos de cada uno de los diferentes grupos. Se observan diferencias entre el grupo SAPE con el grupo SAPA y el grupo CTRL. Aunque se aprecian diferencias entre el grupo CTRL con el grupo SAPA, éstas no fueron estadísticamente significativas ( $n=16$  por grupo). \*\*  $p < 0.01$  SAPE significativamente mayor que SAPA y CTRL.

En cuanto a la pérdida del control de la postura (estadoV), los sujetos del grupo SAPE registraron significativamente un menor número de pérdidas incontrolables de la postura en comparación con los grupos CTRL y SAPA ( $F(2,45)=32.31$ ,  $p < 0.01$ ). Entre los grupos CTRL y SAPA no hubo diferencias significativas (fig13).

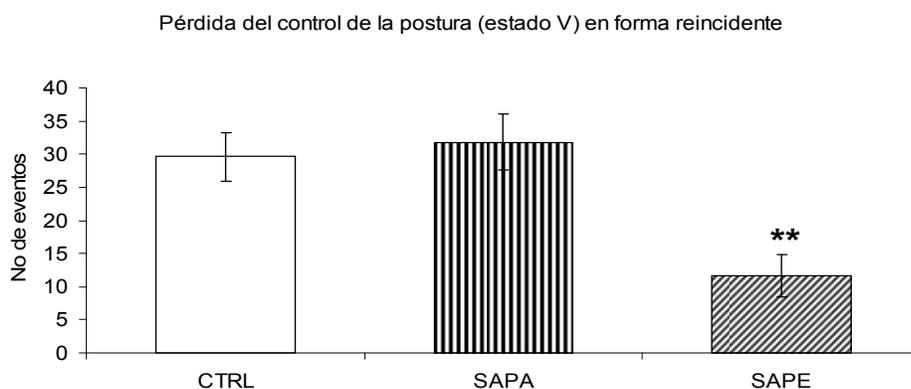


Fig. 13 Media  $\pm$  ES del número de veces que los sujetos de los diferentes grupos perdieron el control de la postura en forma reincidente. El grupo SAPE mostró un menor número de eventos que los grupos SAPA y CTRL. Las diferencias entre éstos dos últimos grupos no fueron significativas ( $n=16$  por grupo). \*\*  $p < 0.01$  SAPE significativamente menor que SAPA y CTRL,

Al analizar el tiempo de permanencia en un estado incontrolable de la postura, se encontró que los sujetos del grupo SAPE permanecieron significativamente menor tiempo en ésta condición que los sujetos del grupo CTRL y SAPA ( $F(2,45)=48.8$   $p < 0,01$ ). No se encontraron diferencias entre los sujetos de éstos dos últimos grupos (fig.14).

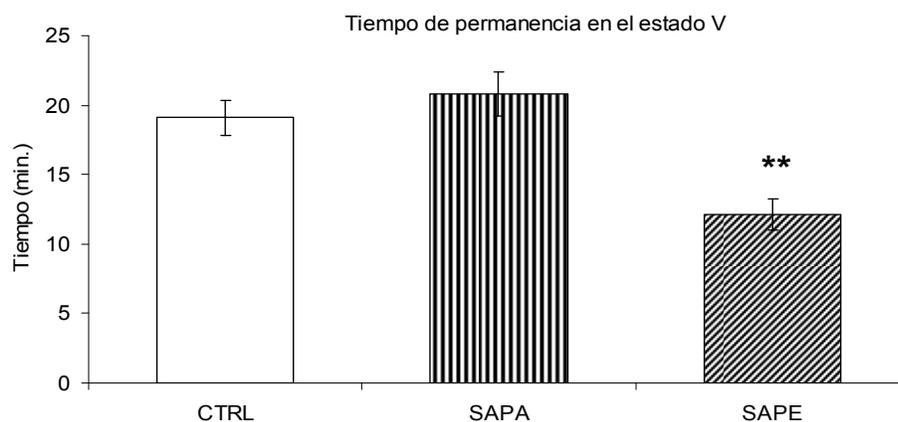


Fig. 14 Media  $\pm$  ES del tiempo (min.) que los sujetos de los diferentes grupos permanecieron en un estado incontrolable de la postura (estado V). El grupo SAPE mostró una menor duración del estado V que los grupos SAPA y CTRL. Aunque se observan diferencias entre los grupos CTRL y SAPA, éstas no fueron estadísticamente significativas ( $n=16$  por grupo). \*\*  $p < 0.01$  SAPE significativamente menor que SAPA y CTRL.

## **7) *Discusión***

En éste experimento mostramos que el suministro crónico de aceite de pescado dado a ratas Wistar como suplemento desde los 45 días de edad y hasta la etapa de amamantamiento, evitó en sus crías, que las alteraciones producidas durante un periodo de hipertermia experimental (HP) fueran tan severas como las observadas en un grupo de crías a cuyas madres se les dio un suplemento de aceite de palma y con otro grupo a cuyas madres se les dio agua como control.

Gran cantidad de evidencias han mostrado el efecto benéfico y neuroprotector que tienen los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (omega-3). En especial, el ácido Docosahexanoico (DHA) y ácido Eicosapentanoico (EPA). Ambos se encuentran en altas concentraciones en el aceite de pescado (AP). Sin embargo la dosis que debe suministrarse ya sea en la dieta o como suplemento adicional a ésta, debe calcularse adecuadamente ya que el consumo de éste tipo de  $\theta$ -3 puede aumentar la lipoperoxidación (LP) y consecuentemente provocar daño al DNA (Megli & Sabatini, 2003). Se ha reportado que los fosfolípidos de la membrana celular son un blanco ideal para la LP en particular la parte que corresponde al DHA (Song y cols., 2001).

En nuestro experimento la cantidad de aceite de pescado que suministramos diariamente a cada una de las ratas al parecer no alteró en gran medida el consumo de energía y/o el metabolismo, situación que se reflejó en la cantidad de alimento consumido y el peso registrado diariamente, parámetros que no difirieron de los registrados en el grupo control y los obtenidos en el grupo de madres a las que se les dio aceite de palma. Asimismo tampoco encontramos diferencias

entre los diferentes grupos en el peso corporal de las crías durante los primeros cinco días de vida.

Es probable que esto se deba a que la dosis de los dos aceites, tanto el de palma como el de pescado, proporcionaron diariamente sólo una décima parte de las calorías necesarias para cada uno de los animales, por lo que no se alteró en gran medida el metabolismo de los animales. Se ha reportado que el requerimiento diario de calorías para el mantenimiento de una rata adulta (200 g de peso) es de 10 a 12 Kcal. (Baker y cols., 1979). En nuestro experimento proporcionamos en cada dosis 1.2 Kcal esto es, una décima parte del requerimiento diario de energía. La razón por la que suministramos ésta dosis se debe a que se ha reportado en otros trabajos que el suministro crónico de AP en la rata pudiera provocar una disminución del peso en las crías al nacimiento (Amusquivar y cols., 2000). Sin embargo, en nuestro experimento no fue así, el suplemento dado diariamente a las madres del grupo SAPE contenía 10.8 mg de  $\theta$ -3, cantidad baja comparada con la usada en otros estudios en los cuales estas sustancias se dan en el orden de g/100g de dieta, reportando efectos benéficos (Chalon y cols.1998; Joshi y cols., 2003; Kikugawa y cols., 2003; Fernández y cols., 2004), o efectos colaterales adversos cuando las concentraciones de  $\theta$ -3 suministradas en el aceite de pescado son relativamente altas (Song y cols., 2000, Miret y cols.). Cabe hacer notar que una rata adulta consume diariamente entre 25-40g de dieta balanceada dependiendo del estado fisiológico que se encuentre.

Por tanto, pensamos que la dosis que usamos en nuestro experimento proporcionaron el equivalente en DHA y EPA necesario para evaluar el posible efecto protector del APE sobre el sistema nervioso bajo una condición adversa (HP), sin alterar otros parámetros vitales para el crecimiento y desarrollo, mismos que tampoco se alteraron en los sujetos del grupo alimentado con aceite de palma, pero en los que se observó un efecto adverso y severo durante la HP.

Uno de los principales objetivos de éste trabajo fue probar la hipótesis de si el suministro crónico de APE inducía resistencia a la presentación y severidad de las convulsiones que frecuentemente están asociadas a un estado de fiebre. Observamos que las crías del grupo SAPE mostraron resistencia a la elevación de la temperatura corporal durante el tiempo que duro la HP experimental (situación que no se observó en las crías de los grupos SAPA y CTRL, las cuales presentaron altas temperaturas desde los primeros 12 min. del experimento). Una de las posibles explicaciones a este resultado, es que dado que la temperatura corporal es regulada principalmente por el hipotálamo, es probable que los  $\theta$ -3 estuvieran actuando a nivel de esta estructura y esto pudiera dar cuenta de la mayor resistencia a la elevación de la temperatura en los sujetos del grupo SAPE. Es probable que esta posible explicación pudiera no tener un sustento sólido debido a la temprana edad de los sujetos (5 días) y la consecuente inmadurez de estos mecanismos regulatorios en el hipotálamo a esta edad; sin embargo, se ha reportado en ratas de 6-8 días de edad una disminución de la temperatura corporal provocada por la administración de demorfina (agonista opioide), lo cual muestra que el cerebro inmaduro puede regular la temperatura a tan corta edad (Colman & Miller., 2002). Se ha reportado que los compuestos opioides tienen efecto sobre la temperatura corporal dependiendo de la especie, ruta de administración, dosis, temperatura ambiente y edad (Adler y cols., 1993). En la rata adulta, la morfina (agonista opioide) causa generalmente hipertermia a dosis bajas, mientras que a dosis altas causa hipotermia (Spencer y cols., 1988). En nuestro conocimiento, parece no haber datos disponibles acerca del efecto de los  $\theta$ -3 en ratas neonatas, sin embargo, es posible que de alguna manera la administración de  $\theta$ -3 haya influido en el adecuado funcionamiento de los receptores a opioides específicos y por tanto, esto haya contribuido a mantener una baja temperatura en condiciones de fiebre en la hipertermia. En apoyo a esta propuesta están los resultados de un estudio reciente realizado en humanos en el que se encontró que la aplicación

de aceite de pescado bajo un cuadro de fiebre inducida por la aplicación de lipopolizacárido (toxina de la pared bacteriana), bloqueó el incremento de la temperatura corporal y la respuesta endocrina asociada al stress (Michael y cols, 2007). Es posible que en el presente experimento pudiera haberse dado un bloqueo similar, puesto que se ha reportado que el receptor opioide  $\mu$  requiere de lípidos para su adecuado funcionamiento (Hasegawa y cols., 1987). Considerando nuestros resultados, es posible sugerir que este requerimiento sea del tipo de lípidos no saturados como los  $\theta$ -3 (dado que los sujetos del grupo SAPE mostraron esta resistencia a la elevación de la temperatura), y no de lípidos o grasas saturadas, en contraste con los sujetos del grupo SAPA quienes registraron temperaturas más altas que el grupo SAPE, asociándose esto con una mayor severidad en las convulsiones provocadas por la hipertermia.

Son necesarios más estudios para determinar si los  $\theta$ -3 dados como suplemento crónico en el aceite de pescado pudieran estar actuando en forma positiva a nivel del sistema opioide, ya que esto implicaría un efecto benéfico en el caso de alteraciones de índole nociceptivo, el cual pudiera estar presente durante un evento convulsivo asociado a fiebre.

En este experimento, una convulsión se manifestó cuando el sujeto, después de caminar moviendo la cola intermitentemente se detenía y perdía el control de la postura, colocándose en decúbito lateral, moviendo o no los miembros, no podía volver a incorporarse por lo que caía nuevamente a una posición de decúbito lateral o decúbito ventral. Los sujetos del grupo SAPE tardaron más tiempo en manifestar éstas conductas y presentaron un menor número y más corta duración que las observadas en las crías del grupo SAPA y CTRL. Es posible que durante la HP pudiera haberse generado en los animales un estado de stress y procesos inflamatorios en los diferentes tejidos, factores que pudieron activar la síntesis de IL-1 $\beta$ . Ya que en los sujetos tratados con  $\theta$ -3 se observó una menor frecuencia y severidad de las crisis por hipertermia, es

posible sugerir que en el grupo SAPE la activación de IL-1 $\beta$  pudo ser menor, mientras que en los sujetos de los grupos SAPA y CTRL la activación pudo haber sido mayor.

Spirer y cols (1994), habían propuesto que una “apropiada” dosis diaria de  $\theta$ -3 pudiera prevenir la aparición de un estado de fiebre con convulsiones. Los autores especularon que el efecto terapéutico de éstos ácidos grasos pudiera deberse a la modulación en la activación de la IL-1 $\beta$ , y no a la inhibición o bloqueo total de ésta citocina. Recientemente, Heida y cols. (2005) han mostrado un incremento de IL-1 $\beta$  en ratas neonatas sometidas a convulsiones por hipertermia; dicho incremento fue significativo en el hipotálamo y en el hipocampo de éstos animales, sugiriendo que las cantidades mayores encontradas en esta estructura pudieran iniciar el proceso de convulsiones mientras el hipotálamo mantiene la síntesis de IL-1 $\beta$ . No se conoce el mecanismo de cómo IL-1 $\beta$  facilita la aparición de convulsiones bajo HP, se ha observado que ésta citosina actúa a través del receptor IL-IRI facilitando la activación de receptores glutamatérgicos. Tal facilitación se ha observado en cultivos de células de hipocampo y es mediada por fosforilación de la subunidad NR2A/B de los receptores NMDA (Viviani y cols., 2003).

En nuestro trabajo pensamos que pudieran existir otras causas que generaron el estado convulsivo tan severo observado en los sujetos de los grupos CTRL y SAPA y que posiblemente fueron contrarrestadas en los sujetos que recibieron el APE (grupo SAPE). Una de ellas podría ser la protección de la membrana neuronal contra daño por el calor, o la reparación de tales daños con mayor eficacia y prontitud. En éste sentido, se ha propuesto que la excitación sináptica promueve la activación de las fosfolipasas en la membrana, las cuales consecuentemente liberan de los reservorios de fosfolípidos en la membrana moléculas lipídicas mensajeras muy activas. Una de ellas es el factor de agregación plaquetaria (FAP), el

cuál es un mensajero muy potente que activa la reparación y el remodelamiento de la membrana neuronal dañada. El PAF no se almacena estructuralmente en la membrana sino que bajo estimulación es sintetizado rápidamente (Bazan y cols., 2005). Para la síntesis del PAF y de otros factores como la prostaglandina endógena 2 (PGE2) [la cual al parecer puede participar en la regulación de la excitabilidad de la membrana vía el monofosfato de adenosina EP2/4 (Chen y cols., 2005)], es indispensable que la membrana tenga niveles óptimos de DHA. Así pues, es probable que en el grupo SAPE una suplementación de éste tipo de omega 3 adicionado a la dieta diaria como lo realizamos en nuestros animales, haya inducido o facilitado la mayor síntesis de PAF y por tanto, esto se haya traducido en una mayor resistencia a presentar hipertermia y a la menor frecuencia y severidad de las crisis convulsivas inducidas por ésta.

En conclusión, este estudio mostró que el suministro crónico de AP en dosis moderada, se asoció con una resistencia a presentar una elevación de la temperatura corporal, contrarrestando la severidad y el número de convulsiones presentadas durante la hipertermia en ratas macho de 5 días de edad.

### **8) Conclusiones**

En la rata macho de 5 días de edad, el aceite de pescado suministrado en forma crónica como complemento de la dieta (comercial) desde la gestación hasta la lactancia se asocia con:

- \* Resistencia a la elevación de la temperatura en un estado de hipertermia experimental.
- \* Baja frecuencia y menor duración de las crisis convulsivas asociadas a la hipertermia.
- \* Menor severidad en la magnitud de las convulsiones producidas por la hipertermia, manifestada por menor número de mioclonías, menor número de movimientos de latiguo de la

cola, menor número de pérdida de postura y menor tiempo en un estado convulsivo caracterizado por pérdida intermitente de la postura asociada con mioclonias.

## **IV EXPERIMENTO 2**

### **EFEECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR EL ACIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO EN RATAS MACHOS DE 150 DÍAS DE EDAD**

Diversos estudios en animales y en humanos han mostrado el efecto benéfico del aceite de pescado (APE) en diferentes patologías, sobre todo a nivel del sistema nervioso central (SNC), sin embargo, los periodos que contemplan la valoración terapéutica de los  $\omega$ -3 contenidos en este aceite, han sido por lo regular de corta duración. En éste sentido, se han reportado hallazgos que sugieren un efecto modesto y de duración relativamente corta, por ejemplo, se ha observado en humanos que, la administración de APE como suplemento en cápsulas a razón de 4g/día durante 8 semanas, corrigió la dislipidemia que se observa comúnmente en pacientes diabéticos tipo 2. Por otro lado, poco se conoce sobre el efecto que pudiera tener el APE suministrado como suplemento en forma crónica, en especial sobre alteraciones neurológicas y particularmente sobre convulsiones. De la escasa información que hay al respecto, se ha observado en pacientes epilépticos que suministrando diariamente y como complemento de la dieta normal 5 grs. de un preparado en forma de unto y que contenía 65% de omega-3, redujo la frecuencia y magnitud de episodios convulsivos observados en un periodo de seis meses. Sin embargo, los resultados no fueron tan concluyentes ya que, por un lado, sólo 5 pacientes terminaron el tratamiento, y por otro, el periodo de observación fue relativamente corto.

Se han realizado experimentos agudos los cuales han mostrado un incremento en el umbral de disparo de las neuronas al aplicarles in vitro omega-3 específicos como el DHA y el EPA. Estos compuestos también se han experimentado en animales bajo condiciones de sobreestimulación

del SNC, pero en periodos relativamente cortos. Dadas estas evidencias, la pregunta general de este experimento es: la suplementación alimenticia con APE, desde la gestación hasta la edad adulta de la rata, podría ejercer un efecto protector sobre las crisis inducidas por el Acido-3 Mercaptopropiónico?

## **1) OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

Evaluar el efecto del aceite de pescado suministrado crónicamente como suplemento alimenticio, sobre los aspectos conductuales y electrofisiológicos de las crisis convulsivas inducidas por la administración de Acido 3- mercaptopropiónico en ratas de 140-150 días de edad

### ***Objetivos específicos.***

1. Describir y caracterizar conductual y electrofisiológicamente las crisis convulsivas inducidas por la administración de una dosis única de Acido 3- Mercaptoproiónico en ratas macho Wistar de 140-150 días de edad.
2. Determinar si la administración de aceite de pescado desde la etapa embrionaria, crecimiento y desarrollo de la rata macho afecta la incidencia e intensidad de las crisis convulsivas provocadas por el Acido 3- Mercaptoproiónico y si éstas se asocian con cambios electroencefalográficos amigdalinos característicos.

## **2) HIPOTESIS**

El suministro crónico de aceite de pescado dado como suplemento, desde la etapa embrionaria (a través de la madre) y durante el crecimiento y desarrollo, inducirá en ratas machos adultas una

mayor resistencia a la presentación de crisis convulsivas inducidas experimentalmente por la aplicación del Acido 3-Mercaptopropiónico y disminuirá la frecuencia y duración de éstas crisis.

La mayor resistencia y menor intensidad de las crisis convulsivas inducidas por el ácido 3-Mercaptopropiónico se asociará con cambios electroencefalográficos amigdalinos característicos, diferentes a los observados en las ratas control y las tratadas con aceite de palma.

### **3) MATERIALES Y METODOS**

#### ***3.1 Animales y dietas***

Dieciocho ratas hembra de la cepa Wistar con peso de entre 45-50 grs. o 45 días de edad, fueron divididas en tres grupos.

Grupo SAPE. Constituido por 6 hembras que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica y desde los 45 días de edad, un suplemento de aceite de pescado (*Lab. Diet Labs®USA*) a una dosis de 350 mg/Kg. de peso.

Grupo SAPA. Constituido por 6 hembras que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica y desde los 45 días de edad, un suplemento de aceite de palma (*Spectrum Chem. MFG Corp,® USA*) a una dosis de 350 mg/Kg. de peso.

Grupo CTRL). Constituido por 6 hembras que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial en pellets (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica y desde los 45 días de edad, 200 µl de agua.

### ***3.2 Apareamiento***

Cuando las hembras de los tres grupos alcanzaron la edad de 135 días, se colocaron en apareamiento programado con machos de la misma cepa con un peso de entre 350-400 g. Al día siguiente se confirmó la presencia de espermatozoides y la formación de tapón vaginal, considerándose este día como el día 1° de gestación.

Las hembras se alojaron en el bioterio en jaulas individuales a una temperatura entre 20-22 °C. en ciclo de luz- oscuridad de 12 X 12 hrs. y se siguieron alimentando con la dieta y el suplemento alimenticio correspondiente. El primer día después del nacimiento, cada camada se ajustó a un número de 8 crías conservando el mayor número de machos posible. Las madres en lactancia continuaron con los esquemas de tratamiento correspondientes hasta que las crías alcanzaron la edad de 23 días, fecha en que se destetaron.

### ***3.3 Obtención de los grupos experimentales***

De las diferentes camadas y en forma aleatoria, se seleccionaron 10 ratas macho para cada uno de los diferentes grupos. Posteriormente los sujetos se colocaron en cajas individuales y continuaron con la alimentación normal y tratamiento respectivo por vía intragástrica, desde la edad de 23 días y hasta que llegaron a la edad de 140 y 150 días, fecha en que inició el proceso de cirugía extereotóxica para la implantación de electrodos. Durante todo el periodo se tomó registro del peso corporal y alimento consumido por los animales de los diferentes grupos.

### ***3.4 Implante de Electrodo***

Cada uno de los sujetos de los diferentes grupos al cumplir con la edad requerida fueron trasladados a un área de cirugía y se les indujo un periodo de anestesia mediante la aplicación de

pentobarbital sódico (50 mg/Kg.) (Pfizer labs.), posteriormente fueron montados en un aparato esterotáxico (Kopf, USA.) y se procedió a colocar 2 electrodos monopolares de acero inoxidable (0.25 mm. de diámetro) uno en la amígdala derecha (Amd) y otro en la amígdala izquierda (Ami) (2.8 mm. posterior a Bregma, 4.8 mm. lateral a la línea media y 8.4 mm. por debajo de la duramadre) de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (1997). (Fig. 15)

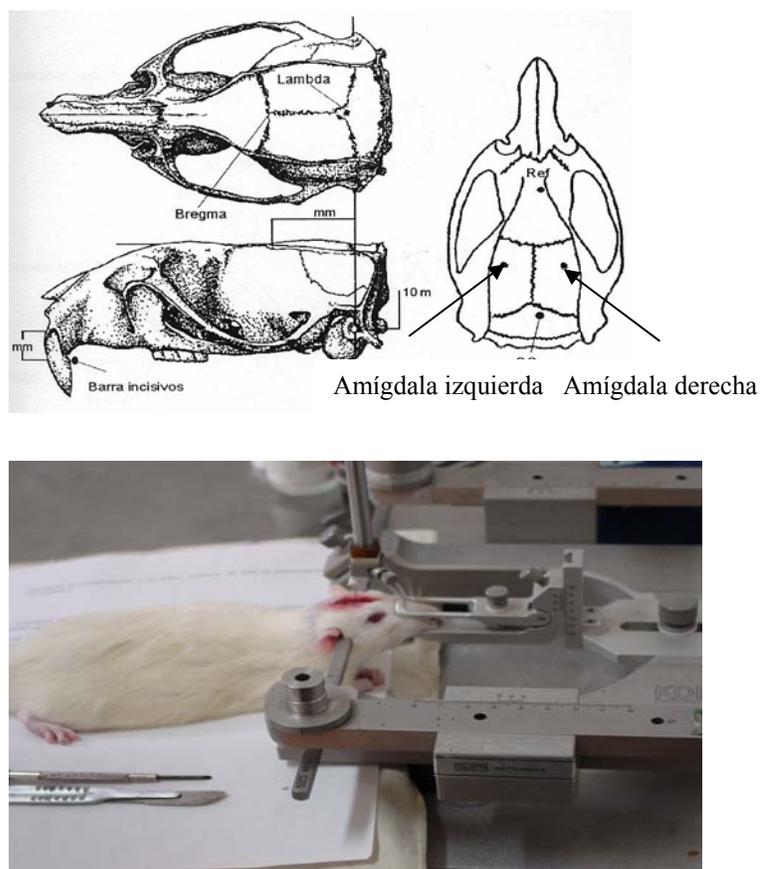


Fig. 15 En la parte superior se observan las cisuras craneales de referencia utilizadas para el implante de electrodos. En la parte inferior se observa la preparación experimental para el implante de electrodos a permanencia en la amígdala derecha (Amd) e izquierda (Ami) de las ratas macho.

### ***3.5 Preparación del agente convulsivante.***

El ácido 3-Mercaptopropiónico (*Spectrum Chem. MFG Corp,® USA*) fue disuelto en una solución de hidróxido de sodio al 5% con el objeto de amortiguar el PH inicial muy ácido y hasta conseguir un PH (6.5-7) neutro. Posteriormente la solución se depositó en un frasco de cristal oscuro y se utilizó el mismo día.

### ***3.6 Registro del EEG e inducción de crisis convulsivas por Acido 3-mercaptopropionico***

#### ***Procedimiento para el registro del EEG***

Después de un periodo de recuperación posquirúrgica de 7 días, el día previo al experimento, cada sujeto se trasladó al cuarto de registro y se les permitió un periodo de habituación en la cámara de registro por un periodo de 30 minutos. Al siguiente día se procedió al experimento. Todos los registros electroencefalográficos y conductuales iniciaron a las 9:30 a.m. y terminaron aproximadamente a las 12:30 a.m. Cada rata fue colocada dentro de una caja de acrílico transparente colocada dentro de una cámara faradizada ubicada en el cuarto de registro a una temperatura de entre 20-23 °C, posteriormente, las salidas de los electrodos fueron conectadas a las entradas de un polígrafo Grass modelo 7 (Grass Instrument. Co, USA) del cual las señales, una vez amplificadas y filtradas, pasaron a un convertidor analógico digital (modelo PCL-812) que funcionó como interfase hacia una microcomputadora programada ex-profeso (CAPTUEEG) para la captura simultánea del EEG (Guevara y cols., 1999).

La captura de las señales se realizó a una frecuencia de muestreo de 512 Hz. en segmentos de 2 seg. (1024 puntos), el filtro pasa bajas estuvo situado en 35 Hz y el pasa altas en 3 Hz. Se capturaron 100 segmentos de señal en cada uno de los sujetos de los diferentes grupos durante la conducta basal de *Quieto en vigilia antes de la aplicación del 3-MPA* (conducta 1) fig. 16).



Fig. 16 Se observa la fotografía de un sujeto que permanecía en una esquina de la caja experimental sin moverse y en estado de alerta, la conducta se presentaba en periodos de segundos o minutos y fue considerada la base del registro del EEG denominada *Vigilia quieta antes de la aplicación del 3-MPA*.

### ***3.7 Inducción de las crisis convulsivas***

Después de capturar el registro basal del EEG, a cada sujeto se le aplicó una dosis única de 25mg/Kg. de peso de Ácido 3-MPA por vía i.p. (Ver Fig. 16), e inmediatamente se inició la captura de los segmentos de EEG en las siguientes conductas:

*Conducta 2 Quieta en vigilia Preconvulsión*

*Conducta 3 Convulsión*

*Conducta 4 Quieta en vigilia posconvulsión*

(fig. 17).

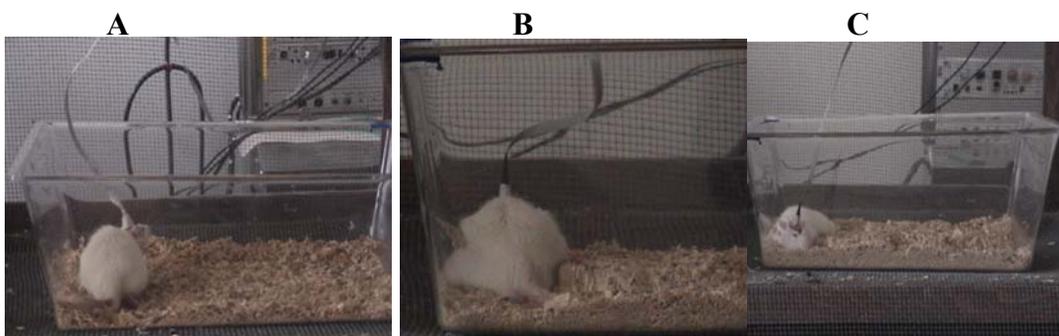


Fig. 17 Fotografías de la conducta manifestada por los sujetos inyectados con 3-MPA antes de la convulsión (A) durante la convulsión (B) y después de la misma (C). Se puede observar en A al sujeto en marchas cortas por la parte lateral de la caja, en B en postración experimentando la convulsión con los miembros y la cola extendidos y en C el sujeto exhausto después de la convulsión con el tronco extendido a lo largo del piso de la caja y la cabeza en posición decúbito-ventral.

Durante la convulsión se registraron estadios, I, II, III, IV, y V los cuales fueron determinados en base a la escala de Racine (ver apéndice).

Asimismo se registraron los siguientes:

### *Parámetros temporales*

1. Latencia de aparición y duración de la 1ª crisis convulsiva (CV)
2. Número total de CV presentadas

### *3.8 Análisis de las señales EEG*

Las señales EEG correspondientes a cada una de las conductas antes mencionadas se capturaron de manera continua antes y después de la aplicación del 3-MPA, asimismo, para la evaluación, fueron tomados 50 segmentos correspondientes a 100 seg. de registro en vigilia quieto, 100 seg. previos a la CV, 100 seg durante la convulsión, y 100 seg posteriores a la CV. Los segmentos capturados fueron seleccionados por medio de un programa elaborado ex profeso (CHECAsEN), (Guevara, 1986). Posteriormente se sometieron a análisis con otro programa computacional denominado POTENCOR (Guevara y cols. 2003), que aplica la Transformada Rápida de Fourier (TRF) y que permite obtener la potencia relativa, la potencia absoluta y la correlación (producto momento de Pearson) de cada una de las frecuencias del EEG en el rango de 4 a 25 Hz.

### ***3.9 Análisis Histológico***

Al final del experimento, todos los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital. El sistema circulatorio se lavó con solución salina isotópica (0.9%) por infusión intracardiaca. Posteriormente se administró una solución de buffer de paraformaldehído al 5.0% para fijar el cerebro, el cual se extrajo y almacenó en la solución fijadora al menos durante dos semanas. Se incluyó en parafina y se realizaron cortes coronales de 80 micras en el micrótopo, los cuales fueron teñidos con Violeta de cresilo para determinar con exactitud el sitio de colocación de la punta del electrodo.

## **4. ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico del EEG se limitó al rango de 4-25 Hz, ya que las frecuencias más bajas tienen una alta probabilidad de contaminación por movimiento del cable. Los datos EEG de las diferentes condiciones fueron analizados por separado. Para comparar los valores de Potencia Absoluta (PA) y de correlación electroencefalográfica ( $r$ ) de cada sujeto en las diferentes condiciones, se aplicaron análisis de varianza de 1 factor para grupos correlacionados, seguida de pruebas de Tukey. Asimismo, para analizar cada una de las frecuencias, se utilizó la prueba T de Student y la de Tukey para las comparaciones múltiples. Una  $p < 0.05$ . se consideró como estadísticamente significativa.

## **5) CONSIDERACIONES ETICAS**

El cuidado de los animales, así como todos los procedimientos en los que participaron, fueron aprobados por el Comité Local de Etica del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Guadalajara, el cual sigue los lineamientos descritos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, 1996).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Peso y consumo de alimento.

Los sujetos de los tres grupos que se destinaron a la implantación de electrodos, no mostraron diferencias significativas en cuanto al peso corporal y el consumo diario de alimento desde los 23 y hasta los 150 días de edad (Fig. 18 y 19).

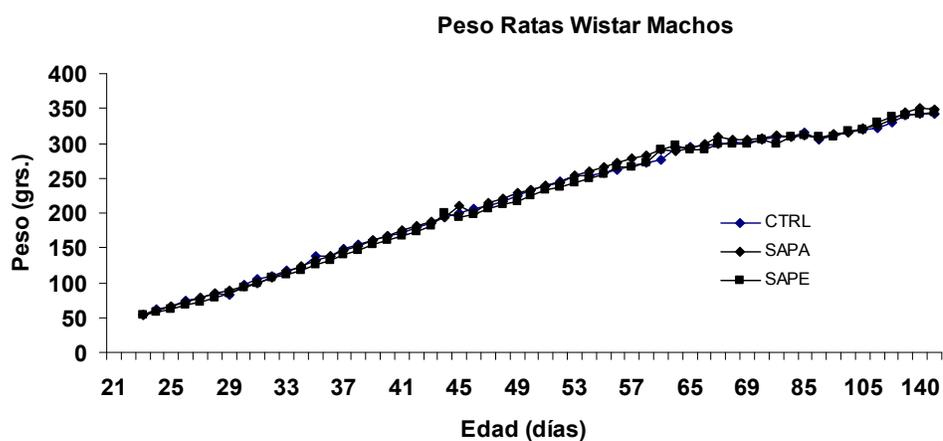


Fig. 18 Peso promedio (n=10) de ratas macho Wistar desde el destete (23 días de edad) hasta los 120 días, fecha en que se implantaron con electrodos.

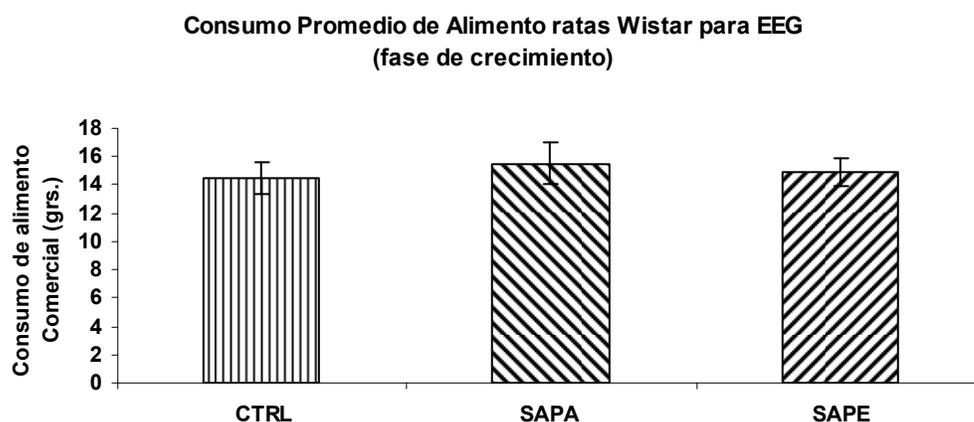


Fig. 19 Media  $\pm$  ES del consumo diario promedio de alimento de ratas machos Wistar durante la fase de crecimiento(n=10).

## 6.2 Resultados Histológicos

Se implantaron un total de 80 animales, de los cuales se descartaron aquellos sujetos en los cuales las puntas de los electrodos no se encontraban específicamente en la Amígdala izquierda y derecha. En total se consideraron 10 sujetos por cada uno de los grupos, en los cuales la punta de los electrodos se ubico entre los 2.8 mm. posterior a Bregma, 4.8 mm lateral a la línea media y 8.4 mm por debajo de la duramadre, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (1997)(fig. 20).

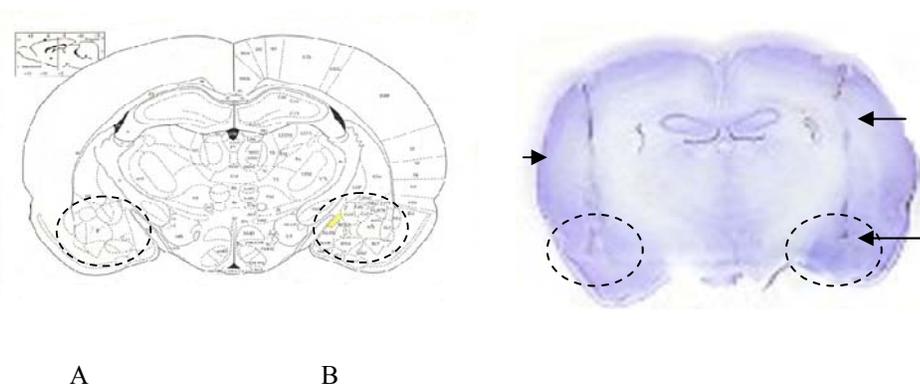


Fig. 20 Esquema modificado de Paxinos y Watson (1997). En A se señala (dentro de las áreas de círculos) los sitios en donde se ubicaron las puntas de los electrodos tanto en la Amígdala izquierda como en la Amígdala derecha, en los sujetos experimentales. B. Fotografía de corte histológico teñido con violeta de cresilo en donde se señala con las flechas la trayectoria de los electrodos en ambas amígdalas, desde la superficie craneal y hasta el lugar en donde se ubicaron las puntas de los electrodos.

## 6.3 Resultados Conductuales y del Análisis del EEG

### 6.3.1 Evaluación conductual y EEG durante la condición *vigilia-quieto- antes de la aplicación del 3-MPA*

Durante esta condición antes de la administración del agente convulsivante, no se observaron diferencias relevantes entre los diferentes grupos en cuanto a su conducta dentro de la caja de registro.

El análisis espectral del EEG mostró que en la Amígdala izquierda de los sujetos del grupo SAPA, la Potencia Absoluta (PA) mostró un incremento significativo en las frecuencias lentas e intermedias desde los 4 Hz ( $F(8,108)= 2.33, p< 0.05$ ) y hasta los 18 Hz ( $F(8,108)= 2.16, p< 0.05$ ), con respecto a

los grupos SAPE y CTRL (Fig.21(B)). En la amígdala derecha se observó la misma tendencia., no obstante las diferencias significativas solo se presentaron en la frecuencia de 10 Hz ( $F(8,108)= 2.15$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 21 (A)).

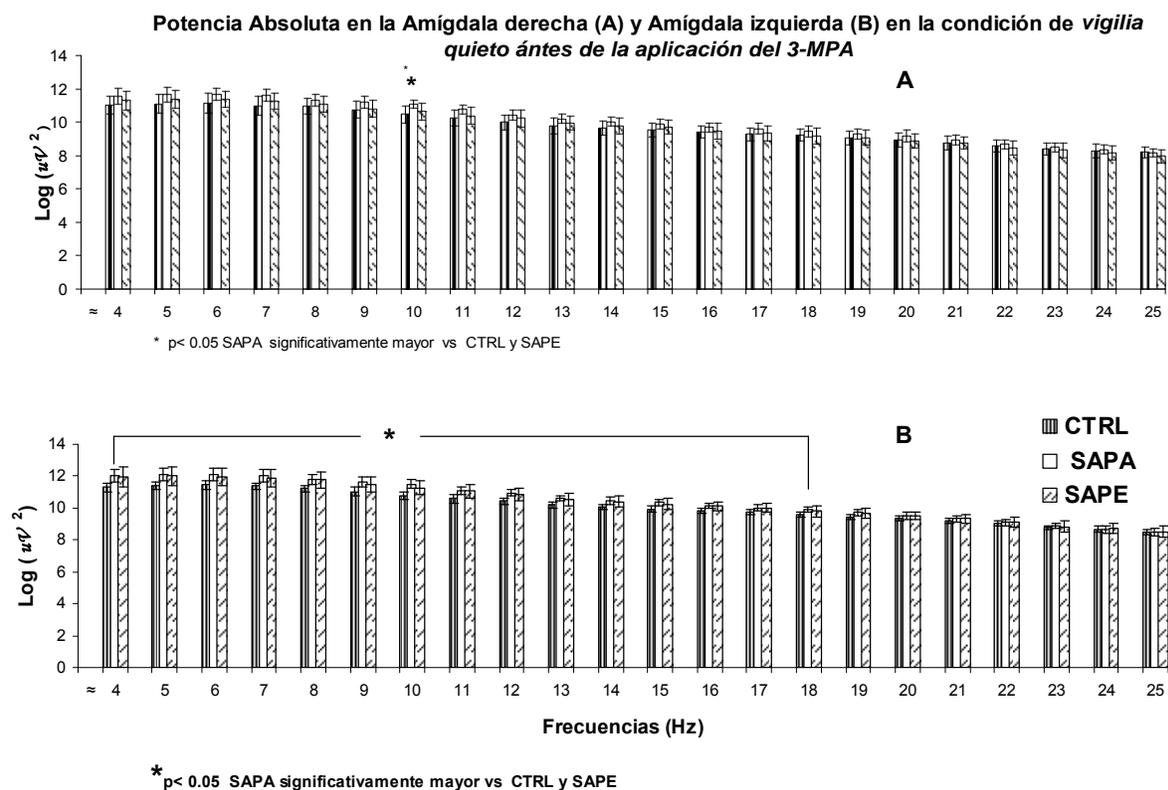


Fig. 21. Media  $\pm$  ES de la Potencia Absoluta (PA) en la Amígdala derecha (A) y en la Amígdala izquierda (B) durante la conducta de vigilia quieta antes de la administración del 3-MPA. Observe la magnitud de la PA en los diferentes grupos y el decremento paulatino de ésta hacia las frecuencias más rápidas, se puede notar en B un promedio mayor de PA en el grupo SAPA, particularmente desde las frecuencias de 4 y hasta los 18 Hz, en relación al grupo CTRL (N=10).

### 6.3.2 Evaluación conductual y EEG en la condición *vigilia-quieto-preconvulsión*

En la fase previa a la convulsión no se observaron diferencias relevantes en la conducta *vigilia-quieto-preconvulsión* entre los grupos. El total de sujetos disminuyó sus movimientos inmediatamente después de aplicarles el 3-MPA y presentaron marchas cortas para luego postrarse en decúbito ventral, este tipo de conductas integró un patrón similar en todos los sujetos.

El análisis espectral del EEG en esta condición que fue registrado exactamente 100 seg. antes de la 1ª CV, mostró que en la Amígdala izquierda la PA en los sujetos del grupo SAPA fue significativamente mayor respecto a los sujetos del grupo SAPE Y CTRL en las frecuencias de 7 Hz ( $F(8,108)= 2.33$ ,  $p <$

0.05) y 14 Hz ( $F(8,108)= 2.61, p< 0.05$ ) (Fig.22 (B)). En la Amígdala derecha, la PA del grupo SAPA fue significativamente mayor en las frecuencias 8, 11, 14, 19 y 21 Hz respecto a los grupos CTRL y SAPE ( $F(8,108)= 2.22, p< 0.05$ ) (Fig.22 (A)).

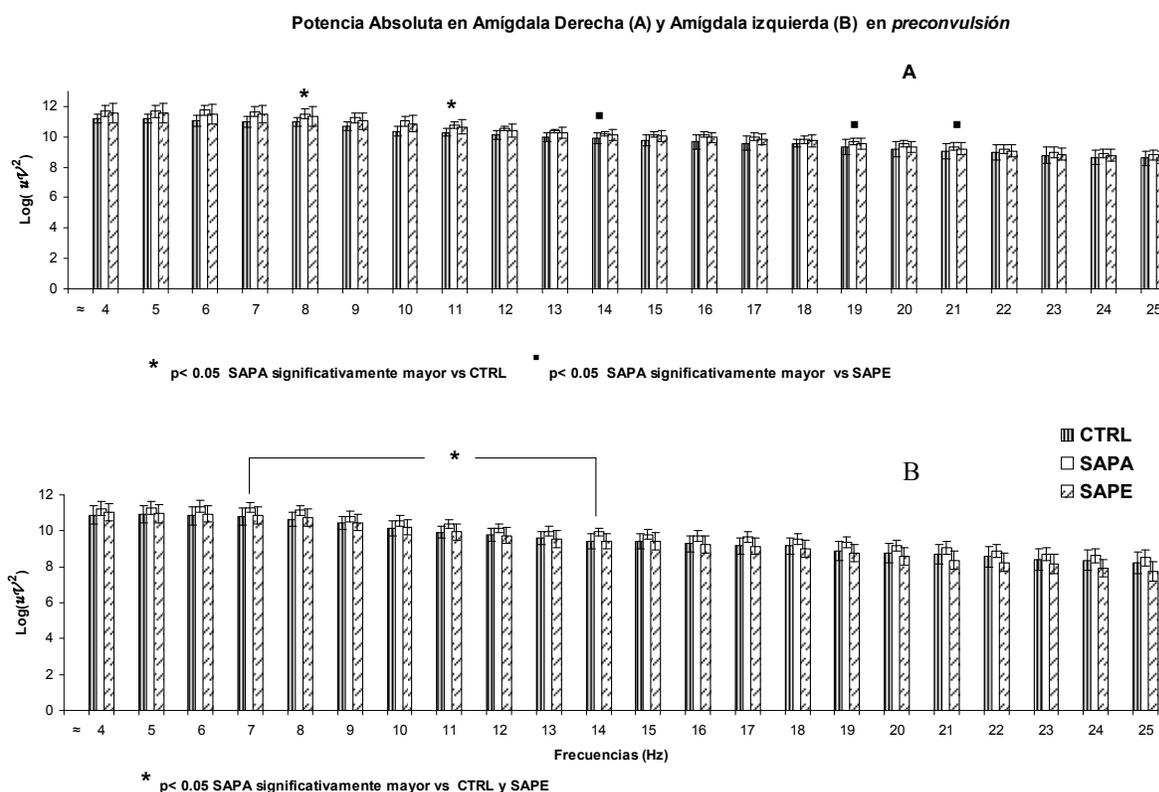


Fig. 22. Media  $\pm$  ES de la Potencia Absoluta (PA) en la Amígdala derecha (A) y en la Amígdala izquierda (B) 100 seg, antes de la 1ª CV, condición *vigilia-quieto-preconvulsión*. Se observa en ambas Amígdalas y en todos los grupos un decremento de la PA hacia las frecuencias más rápidas. En B el grupo SAPA mostró una mayor PA en relación al grupo CTRL en las frecuencias de los 7 a los 14 Hz. En A las diferencias son con el grupo SAPE en los 14,19,31 HZ y el grupo CTRL en los 8 y 11 Hz. En B se puede observar que el grupo SAPE muestra una menor PA en relación al grupo CTRL y SAPA desde los 18 y hasta los 25 Hz aunque la diferencia no fue significativa ( $n=10$ ).

El análisis de los parámetros temporales mostró que en esta etapa previa a la convulsión, el grupo SAPE presentó significativamente una mayor latencia para presentar la 1ª convulsión respecto a los grupos SAPA y CTRL, ( $F(2,27)=30.02, p< 0.01$ ), asimismo el grupo SAPA tardó más tiempo que el grupo CTRL para presentar el primer evento convulsivo ( $HSD=129.500, p<0.05$ ) (Fig. 23).

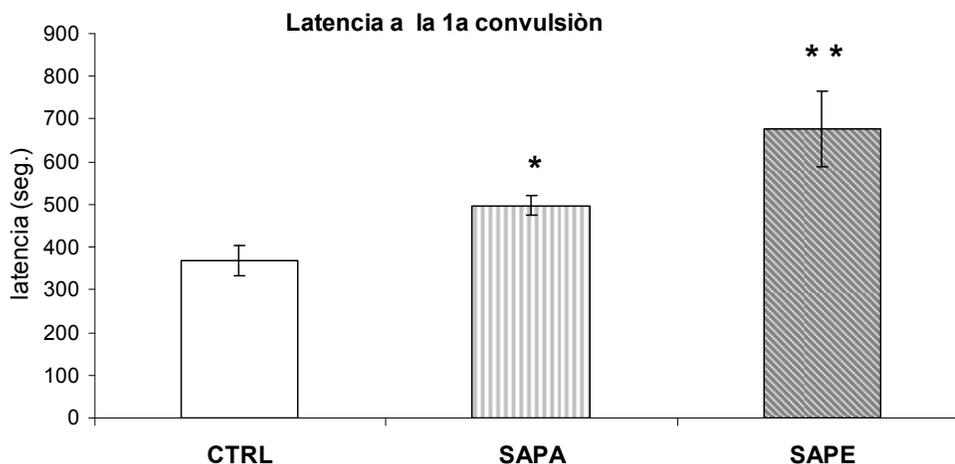


Fig. 23 Media  $\pm$  ES de la latencia en seg. de la 1ª convulsión que presentaron los sujetos de los diferentes grupos. Se observa que el grupo SAPE presentó una latencia significativamente mayor que los grupos SAPA y CTRL, de estos últimos, el grupo SAPA fue el que significativamente presentó mayor latencia que el grupo CTRL. (n = 10). \*\* p < 0.01 SAPE significativamente mayor que SAPA y CTRL, \* p < 0.05 SAPA significativamente mayor que CTRL.

### 6.3.3 Evaluación conductual y EEG durante la convulsión

Tomando como base la Escala de Racine, se encontró que durante la 1ª convulsión un 100% de los sujetos de los grupos CTRL, SAPA y SAPE presentaron las conductas correspondientes a la fase II. Asimismo, el 100% de los sujetos del grupo CTRL y SAPA manifestaron las conductas de la fase III, mientras que sólo un 60% de los sujetos del grupo SAPE presentaron las conductas características de esta fase III.

Respecto a las fases IV y V, se encontró que la incidencia fue más variable entre los diferentes grupos: el 100% de los sujetos del grupo CTRL y el 80 y 90% respectivamente de los sujetos del grupo SAPA mostraron las conductas características, en tanto que en los sujetos del grupo SAPE, sólo un 50% de ellos mostraron las conductas referidas en la escala de Racine (Tabla 2).

**Tabla 2**  
**Evaluación de la 1ª convulsión por la Escala de Racini**

<b>Grupos</b> (N=10)	<b>Fase I</b> <i>Giño del ojo ipsilateral</i>	<b>Fase II</b> <i>Movimientos de cabeza y masticación</i>	<b>Fase III</b> <i>Miclonias de miembros Anteriores</i>	<b>Fase IV</b> <i>Postura de canguro</i>	<b>Fase V</b> <i>Pérdida del tono postural y crisis convulsiva generalizada</i>
<b>CTRL</b>	<b>NR</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>SAPA</b>	<b>NR</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>90%</b>
<b>SAPE</b>	<b>NR</b>	<b>100%</b>	<b>60%</b>	<b>50%</b>	<b>50%</b>

Porcentaje de sujetos de los diferentes grupos que presentaron las conductas evaluadas mediante la Escala de Racine. Podemos observar que del total de sujetos del grupo CTRL, un 100% de ellos presentaron las conductas de la fase II a la fase V, evaluación muy similar a los sujetos del grupo SAPA quienes se diferenciaron solamente en las fases IV y V con un 80 y 90% respectivamente. Aunque un 100% de los sujetos del grupo SAPE presentaron las conductas de la fase II, sólo un 40-50% de ellos mostraron las conductas de las fases III, IV y V de esta escala. (NR= no registrada)

Respecto al análisis espectral del EEG de la **Amígdala derecha** en **convulsión**, no se encontraron diferencias significativas entre grupos para la PA a los 4 Hz ( $F(8,108)=1.88$   $p= 0.7023$ ) 5 Hz ( $F(8,108)=0.69$ ,  $p = 0.70459$ ). Sin embargo A partir de los 6 Hz ( $F(8,108)= 2.33$ ,  $p< 0.05$ ) y hasta los 15 Hz ( $F(8,108) = 2.55$ ,  $p< 0.05$ ) el análisis indicó diferencias significativas entre grupos. Las pruebas *a posteriori* determinaron que el grupo SAPA mostró una potencia absoluta significativamente mayor que el grupo SAPE desde la frecuencia de 6Hz (HSD= 0.903) y hasta la frecuencia de 15 Hz (HSD= 0.915), sin presentarse diferencias entre el grupo SAPA y el CTRL. Además el análisis indicó diferencias significativas entre grupos en los 16 Hz ( $F(8,108) = 2.15$ ,  $p< 0.05$ ) y en los 18 Hz, , para las frecuencias de los 20 a los 25 Hz se encontraron diferencias entre grupos ( $F(8,108) = 2.45$ ,  $p< 0.05$ ), las pruebas *a posteriori* revelaron que los grupos CTRL Y

SAPA registraron una mayor PA que el grupo SAPE (HSD= 0.985) no encontrándose diferencias entre los grupos SAPA y CTRL (Fig. 24).

Por lo que corresponde a la **Amígdala izquierda** en *convulsión*, las características EEG fueron diferentes. Se encontraron diferencias entre grupos para la PA, en la frecuencia de 12 Hz ( $F(8,108)= 2.15$   $p < 0.05$ ), el análisis *a posteriori* indicó que el grupo SAPA y CTRL registraron significativamente una mayor PA que el grupo SAPE (HSD=0.783), sin haber diferencias entre SAPA y CTRL. En los 16 Hz los grupos CTRL y SAPA nuevamente registraron una PA significativamente mayor en comparación con el grupo SAPE ( $F(8,108)= 2.90$   $p < 0.01$ ) sin haber diferencias entre CTRL y SAPA. Finalmente, al igual que en la amígdala derecha, se encontraron diferencias entre grupos, desde los 19 Hz ( $F(8,108)= 2.16$   $p < 0.05$ ) y hasta los 25 Hz ( $F(8,108)= 2.50$   $p < 0.05$ ); el análisis *a posteriori* indicó que los grupos SAPA y CTRL registraron una PA significativamente mayor que el grupo SAPE, y no hubo diferencias entre el grupo CTRL y SAPA. (Fig.24)

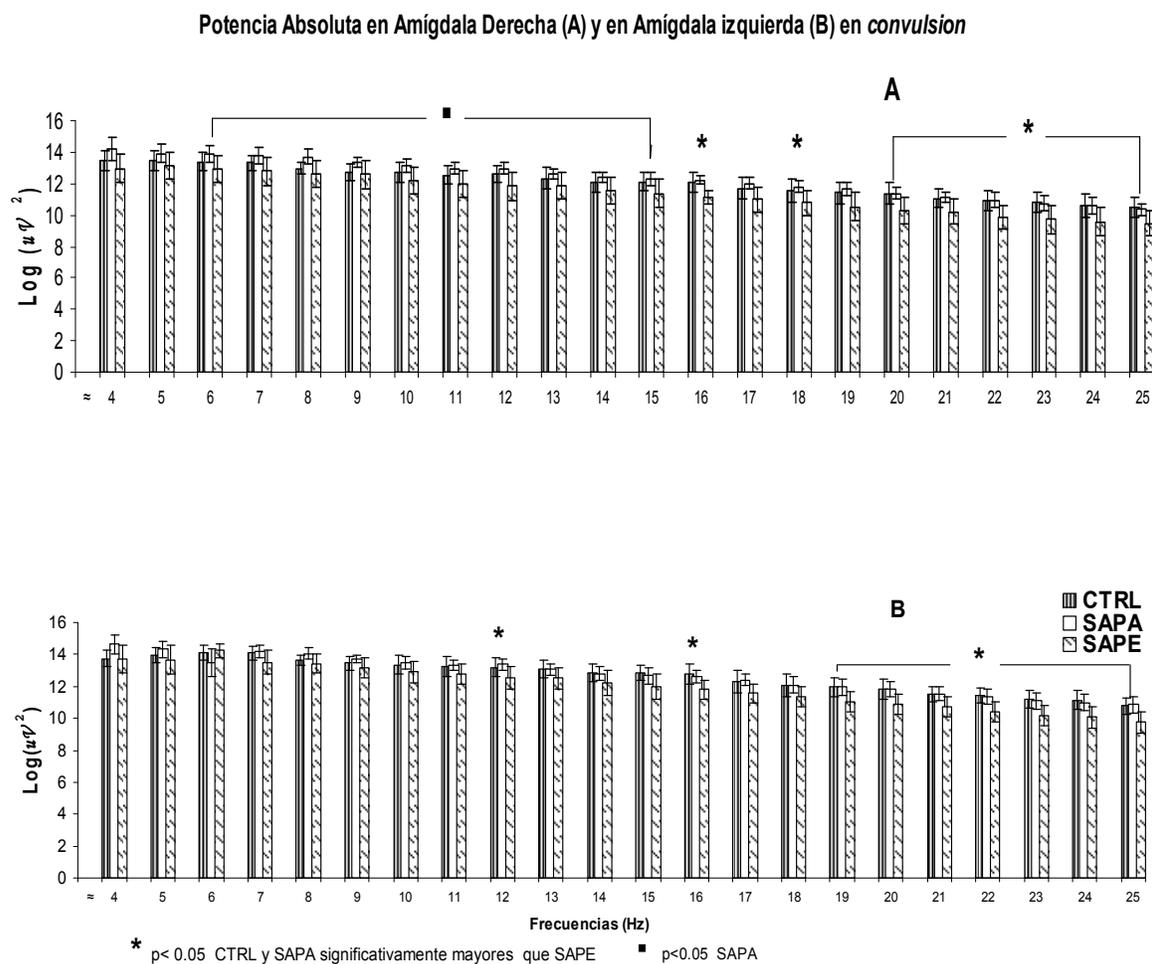


Fig. 24. Media  $\pm$  ES de la Potencia Absoluta (PA) en la Amígdala derecha (AD) y en la Amígdala izquierda (AI) durante la convulsión. El grupo SAPE presentó una menor PA de las frecuencias rápidas tanto en la AD como en la AI en comparación con los grupos SAPA y CTRL particularmente en las frecuencias de 19 a los 25 Hz, nótese la tendencia consistente del grupo SAPA y CTRL para mostrar la mayor PA en contraste con el grupo SAPE cuya tendencia es hacia una menor PA. (n=10).

En cuanto a la duración de la 1<sup>a</sup> convulsión, se observó que el grupo SAPA mostró una tendencia a presentar una mayor duración de la convulsión respecto a los grupos SAPE y CTRL, sin embargo estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ( $F(2,26)=2.06$ ,  $p = 0.14671$ ) (fig.25).

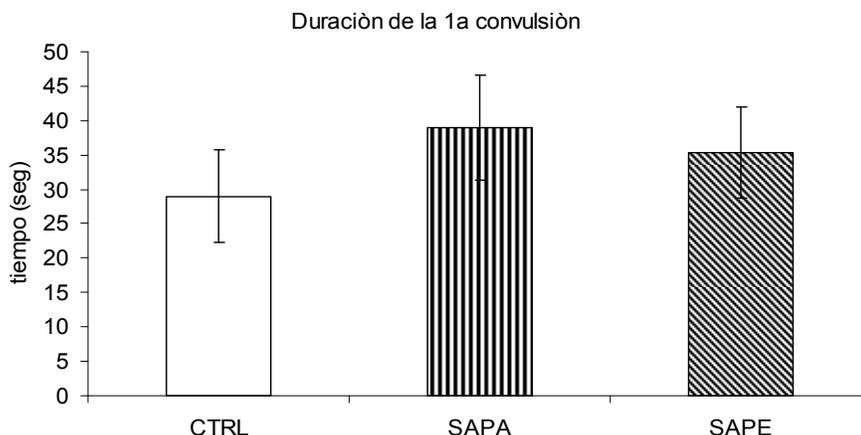


Fig. 25 Media  $\pm$  ES de la duración (seg.) de la 1ª crisis convulsiva manifestada por los sujetos de los diferentes grupos después de la administración i.p de 3-MPA. La 1ª convulsión presentada por los sujetos del grupo SAPA tuvo mayor duración que la presentada por los sujetos de los grupos SAPE y CTRL (n=10).

#### 6.3.4 Resultados Conductuales y EEG durante la postconvulsión

Las conductas manifestadas por los sujetos durante el periodo que va desde el término de la 1ª convulsión hasta el inicio de convulsiones subsecuentes y/o finalización de la etapa convulsiva, no fueron muy diferentes entre los diferentes grupos. En general los sujetos permanecieron postrados, y eventualmente presentaban marchas cortas y rápidas para luego detenerse y caer exhaustos con los miembros posteriores extendidos.

El análisis espectral del EEG durante los 100 seg. posteriores a la CV mostró que en la Amígdala derecha hubo diferencias en la PA, específicamente en las frecuencias desde los 7 Hz ( $F(8,108)= 2.70$ ,  $p < 0.01$ ), 8 Hz ( $F(8,108)= 2.22$ ,  $p < 0.05$ ) y 13 Hz ( $F(8,108)= 2.15$ ,  $p < 0.05$ ). Los resultados *a posteriori* indicaron que el grupo SAPA registró una PA significativamente mayor (HSD= 0.7839) en comparación con los grupos CTRL y SAPE y no se encontraron diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. (Fig. 26 (A)).

Por lo que respecta al análisis EEG en la Amígdala izquierda, se encontraron diferencias significativas únicamente en las frecuencias de 7 Hz ( $F(8,108)= 2.70$ ,  $p < 0.01$ ) y hasta los 10 Hz

( $F(8,108)= 2.15, p < 0.05$ ). El análisis *a posteriori* indicó que el grupo SAPA mostró una PA significativamente mayor que los grupos CTRL y SAPE desde los 7 Hz (HSD= 0.878) hasta los 10 Hz (HSD=0.877), sin presentarse diferencias entre el grupo SAPE y CTRL. (Fig. 26 (B)).

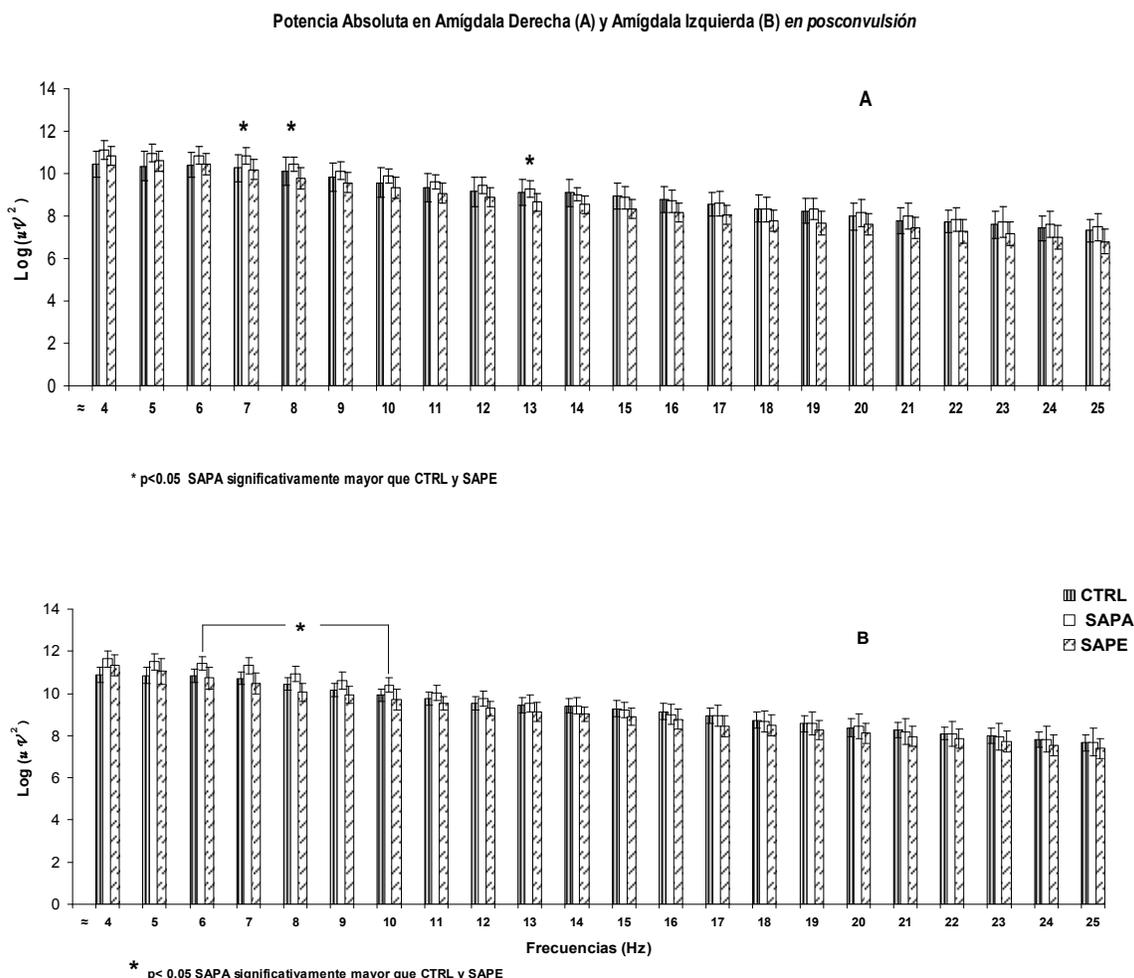


Fig. 26. Media  $\pm$  ES de la Potencia Absoluta (PA) en la Amígdala derecha (A) Amígdala izquierda (B) durante la *posconvulsión*. Se observa una menor PA en el grupo SAPE en A y B, en comparación con los grupos SAPA y CTRL, aunque esta diferencia solo fue significativa entre los 6 y 13 Hz, la tendencia se mantiene hasta las frecuencias rápidas de 24 y 25 Hz en las dos estructuras. Nótese la semejanza entre los valores promedio en los grupos CTRL y SAPA particularmente desde las frecuencias de 13 Hz y hasta las de 25 Hz en las dos Amígdalas ( $n=10$ ).

### 6.3.5 Evaluación de la frecuencia y duración de las convulsiones

Respecto al número de convulsiones manifestadas durante los 40 min. de registro posteriores a la administración del 3-MPA, el análisis mostró diferencias significativas entre los diferentes

grupos ( $F(2,27)= 4.50, p < 0.05$ ). Las pruebas *a posteriori* indicaron que el grupo SAPE presentó significativamente una menor cantidad de convulsiones que los grupos CTRL y SAPA (HSD= 0.819), sin presentarse diferencias entre los grupos SAPA y CTRL (Tabla 3).

Tabla 3

Grupos (n = 10)	% de sujetos con una convulsión	% de sujetos con dos o más convulsiones	Media	E. S.
CTRL	30%	70%	2.2	1.3
SAPA	20%	80%	2.1	0.56
SAPE	70%	30%	1.3 *	0.48

\*  $p < 0.05$  SAPA y CTRL significativamente mayores que SAPE

Tabla 2. Porcentaje y media  $\pm$  ES de la cantidad de convulsiones que presentaron los sujetos de los diferentes grupos durante los 40 minutos posteriores a la administración i.p de Acido- 3 Mercaptopropiónico (25mg/Kg. de peso). En el grupo SAPE la mayoría de los sujetos solamente presentaron una convulsión, en comparación con los grupos SAPA y CTRL cuyos sujetos presentaron 2 o más convulsiones.

## 7) DISCUSION

Hace más de 30 años, investigadores Daneses postularon la hipótesis de que la baja prevalencia de enfermedades del corazón en los esquimales, podría estar asociada al alto consumo de productos de origen marino, en especial el aceite de pescado (Bang y cols., 1971). Desde entonces, múltiples trabajos han dado evidencia del efecto benéfico de éste producto natural y de la acción terapéutica de moléculas de ácidos grasos Omega-3 ( $\omega$ -3) como el Ácido Docosahexanoico (DHA) y el Acido Eicosapentanoico (EPA) que se encuentran en gran proporción en éste aceite. Oh (2005), en una revisión encontró más de 7000 reportes en los que

se incluían 900 estudios clínicos realizados en humanos y en los que se había empleado el aceite de pescado así como los  $\omega$ -3 en diversos problemas de salud. Sin embargo, a la fecha es muy escasa la información respecto a los beneficios que puede aportar el aceite de pescado si se consume como un complemento alimenticio en forma crónica.

En el presente experimento se observó que las ratas macho tratadas con un complemento alimenticio de aceite de pescado (APE), mostraron un menor número de convulsiones y menor severidad en las crisis inducidas por el ácido 3-MPA respecto a las ratas que se les había dado aceite de palma (APA), y a las que se les había dado agua como suplemento (CTRL). Los resultados descritos en este experimento, confirmaron la hipótesis propuesta de que el suministro crónico de APE dado como suplemento, induciría en ratas macho adultas una mayor resistencia a la presentación de crisis convulsivas inducidas experimentalmente por la aplicación del Acido 3-Mercaptopropiónico (3-MPA) y disminuiría la frecuencia y duración de éstas crisis. Se encontró además que la mayor resistencia y menor intensidad de las crisis convulsivas inducidas por el ácido 3-Mercaptopropiónico en las ratas tratadas con APE se asoció a cambios conductuales y electroencefalográficos característicos, diferentes a los observados en las ratas del grupo CTRL y APA.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto del APE sobre las convulsiones inducidas por el 3-MPA. Para tal efecto era necesario que no se presentaran alteraciones en la salud, o en el metabolismo de cada uno de los sujetos de los distintos grupos como consecuencia del tratamiento. En éste contexto, se observó que los sujetos del grupo SAPA mostraron un peso un poco mayor que los sujetos del grupo SAPE y CTRL, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre grupos y tampoco en el consumo de alimento.

Una posible explicación a lo anterior es que se ha reportado que las grasas saturadas son las que presentan mayor dificultad para su desdoblamiento, digestión y metabolismo en el organismo (Kabagambe y cols., 2005), de tal manera que la ingestión de APA, pudo haber propiciado mayores cantidades de grasa en el tejido adiposo en comparación con los sujetos a los que se les dio APE o agua. Se ha descrito que los ácidos grasos son almacenados en moléculas de Triacilglicerol, con contenido principalmente de grasas saturadas y en menor proporción ácidos grasos polinsaturados como el ácido Linoleico ( $\omega$ -6 que constituye de un 12-16% del total de ácidos grasos en el tejido adiposo), el ácido  $\alpha$ -Linolénico ( $\omega$ -3 en muy bajas proporciones), y en mucho menores proporciones el DHA y EPA (Clifton, 2004; Geerling, 1999). Por otro lado, se ha sugerido que la capacidad de almacenamiento de los  $\omega$ -3 en el tejido adiposo es limitada, debido entre otras cosas a que el organismo lo necesita con mayor prioridad y mayor cantidad que los demás PUFAS. Así, es probable que una ingestión mayor de grasas saturadas propició en éstos animales mayor cantidad de tejido adiposo que en los animales de los otros grupos y debido a esto mostraron un peso ligeramente mayor que los sujetos del grupo SAPE y del grupo CTRL, aunque no significativo.

En este experimento diariamente se proporcionó a las ratas del grupo SAPA y SAPE aproximadamente un 20% más de grasas respecto al grupo CTRL (quien consumió la dieta base) en sus respectivos tratamientos. El suplemento proporcionó a los sujetos del grupo SAPE grasas saturadas y  $\omega$ -3 particularmente DHA y EPA, en comparación con los sujetos del grupo SAPA a quienes el suplemento proporcionó un 30% de grasas saturadas, otro 30% de  $\omega$ -6 particularmente ácido Linoleico y no tenía  $\omega$ -3 (ver cuadro Tabla I).

Resultados de otros estudios han mostrado que ratas alimentadas durante 6-8 semanas con dietas semipurificadas con 19.5% de grasas saturadas (GS) tenían mayor peso que un grupo al

que se le dio la dieta semipurificada conteniendo 13.5% de GS y 6.5% de APE; aunque las diferencias no fueron significativas en cuanto al peso de los sujetos y la cantidad de alimento consumido. Los autores concluyeron que administrar mayor cantidad de APE en la dieta puede promover cambios en la cantidad de lípidos contenidos en el plasma y una reducción en el almacenamiento de triacilglicerol en el tejido adiposo a consecuencia de un menor flujo de ácidos grasos en circulación (Russtan y cols, 1993). En el experimento de Russtan y cols. el consumo promedio diario de alimento en el grupo que consumió grasas saturadas fue de  $16.5 \pm 1.4$  grs., y en el que consumió la dieta con aceite de pescado fue de  $16.1 \pm 1.8$  grs. En otro estudio realizado en ratones tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al peso corporal y el consumo de alimento al comparar el grupo que fue tratado con APA y el grupo que fue tratado con APE+APA (Fontani y cols, 2007).

En nuestro experimento el consumo de alimento promedio diario del grupo SAPA fue de  $15.5 \pm 1.5$  grs, el del grupo SAPE fue de  $14.9 \pm 1$  grs y el del grupo CTRL fue de  $14.5 \pm 1$ , es decir, no hubo diferencias. Haciendo los cálculos necesarios, encontramos que con el suplemento de aceites proporcionamos alrededor del 5% de grasas que normalmente vienen incluidas en las dietas comerciales, más 350 mg/kg de peso de APE para el grupo SAPE y la dosis equivalente de APA para el grupo SAPA, lo que sumaría un 5.3 % de grasas totales consumidas por cada uno de éstos grupos. Ya que no hubo cambios ni en el peso corporal ni en la cantidad de alimento consumido, consideramos éste como un porcentaje adecuado de grasas que no alteró procesos vitales como el crecimiento y el desarrollo de los animales, ni tampoco se observó un desbalance drástico en el consumo energético, variable que podría haberse visto reflejada en el consumo de alimento. Por tanto, las dosis de ácidos grasos utilizadas permitieron evaluar en este experimento el efecto del APE y del APA sobre un sistema nervioso intacto que

fue sometido en la edad adulta a una condición adversa, como lo es la convulsión experimental inducida por la administración de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA).

### ***Discusión de resultados conductuales y electroencefalográficos***

Este es uno de los primeros estudios en los cuales se evalúa el posible efecto neuroprotector del aceite de pescado en animales tratados crónicamente desde la gestación, lactancia (el aceite fue administrado por vía intragástrica a las madres) y hasta la edad adulta (administrando el aceite a las propias crías desde el destete). La intención fue probar la hipótesis de que la ingestión crónica de APE en ratas machos adultas se asociaría a una mayor resistencia para presentar crisis convulsivas inducidas experimentalmente por la aplicación del 3-MPA y disminuiría la intensidad y duración de éstas crisis, todo esto asociado a cambios electroencefalográficos característicos, y distintos a los observados en las ratas control y las tratadas con aceite de palma.

#### ***7.1 Resultados conductuales***

##### ***7.1.1 Vigilia-quieto antes de la aplicación del 3-MPA***

La evaluación de la condición *vigilia-quieto antes de la aplicación del 3-MPA*, no indicó diferencias entre los sujetos de los diferentes grupos. Los sujetos deambulaban por los lados de la caja de acrílico, eventualmente se paraban de manos sobre el borde de la caja, y/o se detenían, se acicalaban, e incluso algunos llegaban a dormir hacia el final del periodo de evaluación. Esta actitud uniforme en todos los animales, posiblemente se debió entre otras cosas a que los sujetos de los tres grupos, fueron manipulados diariamente, desde la edad de 23 días hasta el día de la prueba, lo cual pudiera haber contribuido a reducir en cierta manera el stress que se genera ante una situación novedosa, de alerta o de miedo, al ponerlos a deambular

en un espacio más grande. En diversos estudios se ha visto que el manejo (*Handling en inglés*) constante de los animales provoca cambios en su fisiología, por ejemplo, se ha observado que la manipulación de ratas Wistar 1 min. por día durante 3 días, fue suficiente para reducir hasta en un 45.5% la respuesta en los niveles de corticosterona cuando estos animales fueron expuestos a una condición de stress (24 hrs después de la última manipulación) (Gadek y cols., 2003).

### ***7.1.2 Vigilia-quieto-preconvulsión después de la administración de 3-MPA.***

No se encontraron diferencias significativas en la conducta mostrada por los sujetos después de la administración del 3-MPA pero anterior a la ocurrencia de la primera convulsión. Este resultado pudo deberse, entre otros factores, a que los sujetos de los diferentes grupos experimentaron al inicio cambios internos muy similares, resultado de la presencia del convulsivante dentro de su organismo. Sin embargo, es complicado intentar definir la o las causas que provocaron el que los animales disminuyeran su movilidad, que permanecieran postrados y que eventualmente efectuaran caminatas cortas y rápidas para nuevamente postrarse. Existen reportes de que el consumo de dietas con APE modifica el metabolismo. Por ejemplo, se ha observado en ratas alimentadas con una dieta a base de APE, una menor frecuencia cardíaca, debido a una baja en la resistencia al flujo de la sangre por la aorta y a un menor esfuerzo del corazón para expulsar la sangre hacia el organismo (Demaison y cols., 2000). Anteriormente ya se había sugerido que estos efectos hemodinámicos, se asocian a un incremento en el Factor de Relajación Endotelial (FRE) en los vasos sanguíneos (Lortet y Verger, 1995). Por otro lado y en contraste con lo anterior, también se han reportado otros estudios en los cuales se ha reiterado el efecto adverso de grasas saturadas sobre el sistema circulatorio, por ejemplo se ha observado en ratones alimentados con este tipo de dieta, una

deficiencia del FRE en segmentos de la aorta torácica, por lo que se piensa que bajo estas circunstancias puede existir una vasoconstricción anormal (Roberts y cols., 2005). En nuestro experimento los sujetos del grupo SAPA consumieron APA abundante en grasas saturadas y el grupo SAPE consumió APE alto en  $\omega$ -3. Es posible que las características hemodinámicas del aparato circulatorio de los sujetos de ambos grupos difirieran, tal que los cambios en la conducta aparecieron hasta que el 3-MPA hizo su efecto. La dosis de 25 mg/kg de 3-MPA, fue seleccionada de un estudio piloto, en el cual las convulsiones no fueron tan severas. En el experimento actual esta dosis de 25 mg/kg de peso, se seleccionó ya que induce crisis con cambios motores no tan drásticos, fácilmente identificables y que se asocia con un registro del EEG en forma clara, sin los artefactos que se generan cuando ocurren crisis convulsivas de gran magnitud.. En estudios con ratas y con una dosis de 50 y 100mg/kg, ha sido necesario anestesiarse a los animales para lograr obtener un registro del EEG adecuado (Karlsson y cols., 1974; Netopilova y cols., 1997; Crick y cols., 2007). En el presente trabajo los sujetos antes de la convulsión permanecieron sin restricción de movimiento durante y después de la aplicación del 3-MPA, por lo tanto los cambios hemodinámicos que presentaban los sujetos de los diferentes grupos no fueron influenciados por otros factores como un estado de anestesia y si por el tratamiento de los aceites. Bajo esta premisa, los presentes resultados mostraron que el grupo SAPE suplementado con APE tardó más tiempo en presentar la convulsión en comparación con el grupo SAPA que recibió APA y el CTRL. Una posible explicación a lo anterior es considerar los reportes acerca de que las dietas con APE mejoran la circulación sanguínea. Si esto sucede a nivel periférico no sería ilógico pensar que esto también ocurra a nivel de la circulación cerebral, provocando con ello, mecanismos de protección que asignan una mayor resistencia al SNC de desencadenar una actividad epileptiforme. Por ejemplo, se ha mostrado en cerdos alimentados con una dieta alta en  $\omega$ -3, una facilitación de la síntesis del

FRE a nivel de la arteria Basilar, inhibiendo prostaglandinas vasoconstrictoras e interfiriendo la acción del ácido Araquidónico (Kim y cols., 1992); por otro lado, se ha reportado también en arteriolas cerebrales de ratones que la administración intragástrica de APE a una dosis de 350 mg/kg de peso por seis semanas produjo una reducción significativa en la producción del Trombohexano B2 (una molécula involucrada en el infarto cerebral), sin afectar la funcionalidad de las plaquetas (Heizer y cols., 1992).

En cuanto a las diferencias encontradas en la latencia entre los grupos SAPA y el grupo CTRL, el grupo SAPA también mostró una mayor latencia para la aparición de la convulsión, la posible explicación a esto es que, como lo describimos anteriormente, la ingestión de APA (cuyos niveles de grasas saturadas con elevados), pudiera haber modificado el riego sanguíneo a nivel cerebral retardando la diseminación del 3-MPA. Esto no pudo ocurrir en el grupo CTRL y por lo tanto los sujetos de este grupo mostraron la menor latencia de todos los grupos para presentar la convulsión.

Recientemente Crick y cols., (2007) han reportado hallazgos similares en cuanto al tiempo de acción y o absorción del 3-MPA en ratas Wistar normales. Crick observó que con una dosis i.p. de 50mg/kg, de 3-MPA, la latencia para que se presentara la primera convulsión fue de  $680.7 \pm 123.5$  seg. En el presente experimento la latencia a la primera convulsión en el grupo CTRL fue de  $367.5 \pm 36.18$  seg, pero con una dosis de 25mg/kg; las ratas del grupos SAPA mostraron una latencia intermedia ( $497 \pm 23.8$  seg.), y las del grupo SAPE una latencia más larga ( $678 \pm 88.7$  seg.) Cabe hacer notar que en el experimento con 50 mg/kg, las ratas fueron anestesiadas con el objeto de llevar a cabo un registro electroencefalográfico y en el estudio no se aclara la influencia de este factor en los resultados. En el presente estudio las ratas presentaron la convulsión sin ningún tipo de restricción y no se expusieron a otra alteración que no fuera la administración diaria de los suplementos. Por lo que podemos sugerir que los efectos

observados en este nivel y en los siguientes, están asociados a los distintos tratamientos, y que en la *preconvulsión*, el tratamiento con APE mostró en los sujetos un efecto protector y/o indujo mayor resistencia a la presentación de la convulsión.

### **7.1.3 Convulsión**

En el presente trabajo utilizamos el ácido 3-MPA, para inducir las convulsiones, debido a su mayor especificidad para inhibir la *Glutamato-decarboxilasa*, enzima que cataliza la formación del ácido Gama-aminobutírico (GABA) a partir de la decarboxilación del glutamato (Lamar, 1970). Esta sustancia ha sido utilizada en diversos estudios debido a que induce convulsiones. Generalmente son dos tipos de convulsiones; las *Convulsiones mínimas* que se generan con dosis entre 25-30mg/kg y las que se generan con dosis de entre 40-60 mg/kg llamadas *Convulsiones máximas*, en éste último tipo de convulsiones hay un mayor predominio de las fases tónicas y tónico clónicas, con una mortalidad entre 30-50% y técnicamente es imposible registrar la actividad electroencefalográfica sin anestesia previa del animal (Mares, 1993).

En el presente experimento se utilizó la dosis de 25 mg/kg y observamos en los tres grupos los dos tipos de convulsiones, sin embargo hubo un mayor predominio de las *Convulsiones mínimas*. El análisis conductual se realizó tomando como base la escala de Racine (1972). Dicha escala se ha utilizado para evaluar las conductas características en las convulsiones generadas por el Kindling (Racine y cols., 1972), o por la aplicación de sustancias químicas como el Acido Kaínico o el Fentilentetrazol (López y cols., 2005). En el presente estudio, el 100% de los sujetos en los tres grupos no mostraron la fase I de la Escala de Racine, que consiste en el guiño del ojo ipsilateral al sitio de la estimulación. Una posible explicación a esto es que, en el presente estudio se usó una sustancia química para provocar las convulsiones, en este contexto, la escala de Racine se estandarizó con un método que provoca las convulsiones

por estimulación eléctrica (Kindling). Así, es probable que los estadios iniciales de las convulsiones inducidos por Kindling difieran un poco en términos de conducta, de los inducidos por sustancias como el 3-MPA, u otro compuesto químico como la penicilina-G sódica, en donde tampoco se reporta la presentación consistente de esta conducta (González y cols., 2006; Constantin y cols., 2005; Yilmaz y cols, 2006)

Por otro lado es posible que durante los primeros minutos posteriores a la inyección i.p., ya existieran niveles de 3-MPA a nivel cerebral, pero que estos fueran bajos, de tal manera que no se alcanzaba a producir un efecto sobre las estructuras neuronales y vías descendentes que controlan el movimiento de los músculos palpebrales. Esta sugerencia puede ser apoyada por estudios en los que se ha reportado en ratas Wistar de entre 300-450gr de peso, que en los primeros 2 minutos post- inyección i.p del 3-MPA con una dosis de 50mg/kg, se detectó una concentración de aproximadamente 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  en sangre, pero en el cerebro solo fue de entre 0.1 a 1.1 mg/kg. Cabe hacer notar que en el estudio anterior, las concentraciones máximas se alcanzaron aproximadamente entre los 23-25 min tanto a nivel sanguíneo como a nivel cerebral, sin embargo la latencia para la convulsión fue de  $12 \pm 2$  min.(Crick y cols., 2007).

En el presente experimento, se utilizó una dosis de 25mg/kg, por lo tanto, es probable que los niveles del 3-MPA estarían en el orden de .05 al .055  $\mu\text{g/ml}$  dentro del cerebro (la mitad de la dosis del estudio anterior) posiblemente cantidad muy pequeña para que se observara la conducta de *guiño del ojo*. Hallazgos similares se han encontrado en otros estudios en los cuales se ha empleado la misma escala para evaluar la conducta bajo un estado convulsivo, y tampoco se ha reportado la presencia de la fase I de la Escala de Racine (Constantin y cols., 2005; González y cols., 2006).

Por lo que respecta a la fase II, el 100% de los sujetos en los tres grupos presentaron esta conducta que consiste en mayores movimientos de cabeza y masticación, Este resultado

posiblemente se deba por un lado, a que las concentraciones del 3-MPA en el cerebro pudieran ser mayores que en la fase I, por lo tanto en la fase II ya había más 3-MPA y se iniciaba conductualmente la convulsión, es decir, las estructuras centrales que controlan la actividad muscular a nivel de la cara y del tronco, estaban en un proceso de sobreexcitación manifestándose en mayores movimientos de masticación, y de la cabeza. Todos los grupos presentaron este nivel II, sin embargo los sujetos del grupo SAPE tardaron mas tiempo en presentar esta conducta ya que su latencia para presentar la convulsión fue significativamente mayor que los sujetos de los grupos CTRL y SAPA. La posible explicación a esto es que en los sujetos que consumieron APE el 3-MPA tardó más en ejercer sus efectos, de tal manera que se dio la mayor inhibición de la GAD, menor síntesis y liberación de GABA y, por tanto, menor control motor sobre las estructuras nerviosas que controlan el movimiento en los sujetos del grupo SAPA y CTRL, en tanto que en el grupo SAPE también aparecieron mas movimientos masticatorios y mas movimientos de cabeza, pero su presentación fue tardía en relación a los grupos CTRL y SAPA. En apoyo a estos argumentos, se ha determinado en otros estudios realizados en ratas adultas, que la latencia para que ocurriera la convulsión ( $328 \pm 107$  seg.), se correlacionó con una inactivación de la GAD en solo un 50-60% (Netopilova y cols., 1997), por otro lado, Karlson y cols. (1974), reportaron en ratas inyectadas i.p. con 50mg/kg de peso de 3-MPA, mayor inhibición de la GAD (15%) en corteza que en el hipocampo, la inhibición en la corteza fue de hasta un 50% mayor que el valor determinado en los sujetos control, en los cuales las *convulsiones mínimas* ocurrieron 240 seg después de la aplicación del 3-MPA, sin embargo las *convulsiones máximas* se presentaron hasta los 420 min., lo cual pareciera sugerir por una lado que hay un efecto diferencial del 3-MPA a nivel de estructuras cerebrales, y que la inactivación de la GAD en esas estructuras esta en relación con los niveles de 3-MPA

presentes. De tal manera que pudieron afectarse diversas zonas cerebrales que controlan el movimiento.

Se ha mostrado que los movimientos masticatorios y salivación excesiva son disparados por proyecciones descendentes de la Amígdala hacia el área tegmental del mesencéfalo, tallo cerebral y médula (Prince y cols., 1987), el núcleo central amígdalino en particular, y la parte lateral del núcleo rojo en la *Stria terminalis* proyectan hacia la región del trigémino en donde elementos premotores generan una programación para contracción rítmica de la masticación (Otha, 1986; Hosltege, 1991). Por otro lado, se ha reportado que neuronas del núcleo central amígdalino participan junto con el hipotálamo en la regulación de la secreción salival específicamente en las glándulas submandibulares (Jensen y cols, 1992). Por lo tanto, cambios inespecíficos en la excitabilidad de neuronas a nivel de la Amígdala y de motoneuronas a nivel del tallo y de la médula espinal debido al 3-MPA, pudieron afectar la funcionalidad de estas estructuras en todos los sujetos. El hecho de que en los sujetos del grupo SAPE se observó un retraso, pudo deberse al efecto del APE a nivel de tejido nervioso y particularmente a nivel de las membranas, lo cual probablemente activó una serie de mecanismos para evitar la sobreexcitación. En este sentido se ha propuesto que los  $\theta$ -3 afectan la neurotransmisión dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica y GABAérgica a diferentes niveles y en áreas específicas del cerebro (Chalon y cols, 2001). Por ejemplo, hay evidencias que indican que los  $\theta$ -3 modifican los canales de sodio uniéndose a las proteínas de este tipo de canales (Kang y Leaf, 1996). Por otro lado se ha observado en neuronas del hipocampo de ratones, que la aplicación de EPA hiperpolarizó la membrana elevando el umbral de disparo en la neurona (Xiao y li, 1999), además, también se ha reportado un bloqueo por parte del DHA sobre las corrientes rectificadoras en el canal de  $K^+$  (Poling y cols., 1995). Pudiera ser que en el grupo que consumió APE, se suscitara cambios como los descritos, además de la activación de

mecanismos de restauración y normalización de la función neuronal, como por ejemplo, una mayor activación de la  $Na^+/K^+ATPasa$ . Se ha reportado que un incremento del DHA a nivel de membrana genera una mayor activación de la  $Na^+/K^+ATPasa$  (Tumer y cols, 2003).

Es probable que tales propuestas tengan mayor cabida en el presente experimento, debido a que en la fase III (más mioclonías de miembros anteriores) solamente en el 60% de los sujetos del grupo SAPE presentaron esta conducta en comparación con el 100% de los sujetos del grupo CTRL y SAPA.

Es importante señalar que además de los mecanismos propuestos, posiblemente también existieron otros que influyeron de alguna manera en la cantidad y duración de las convulsiones. En el experimento observamos que no hubo diferencias entre los grupos en cuanto a la duración de la 1ª convulsión, lo cual pudiera indicar que una vez que se desencadenó la despolarización de las neuronas, el proceso (aunque tardó en el grupo SAPE) se desarrolló activamente. Los sujetos del grupo SAPE mostraron menor número de convulsiones que el grupo SAPA y el CTRL, lo que pareciera sugerir que la funcionalidad cerebral estaba influenciada por los tratamientos, pero en razón del tiempo en el que se había iniciado la convulsión, y en la medida que eran requeridos mayores recursos para evitar un mayor número de convulsiones. Hallazgos similares se han reportado para otras sustancias que pudieran ser neuroprotectoras. Por ejemplo, en ratas a las que se les provocaron las convulsiones mediante la inyección de Acido Kaínico (AK) o Kindling, y a las que previamente se les había inyectado i.v. en el hipocampo, la toxina botulínica-E (una molécula aislada de la bacteria *Costridium botulinum*, que provoca un bloqueo de la liberación de neurotransmisores preferentemente en la vía glutamatérgica) se observó que tanto los sujetos control como los tratados con la toxina-E presentaron convulsiones provocadas por el AK, pero solamente 16% de los sujetos (n=30) inyectados con toxina presentaron la fase IV y V de la escala de Racine; asimismo, éstos presentaron menor

número de convulsiones que el grupo control y tardaron mas tiempo en manifestarlas (Constantin y cols, 2007).

Es conveniente señalar que en el estudio anterior la aplicación de la molécula protectora se infundió directamente en la estructura y actuó predominantemente sobre la liberación de neurotransmisores. En el presente experimento, la administración fue intragástrica y los mecanismos de neuroprotección inducidos por el APE a nivel del SNC fueron probablemente más diversos, de tal manera que es probable que algunos estuvieran actuando antes de que ocurrieran la convulsión y otros se activaron al ocurrir la convulsión.

#### ***7.1.4 Postconvulsión***

No encontramos diferencias entre los grupos para esta condición en términos de conducta, es decir los animales después de experimentar la convulsión, se observaron letárgicos, en una posición decúbito ventral con los miembros extendidos y prácticamente inmóviles. Es conveniente aclarar que evaluamos la conducta después de la 1ª convulsión, y no de las subsecuentes, la razón se debe a que no todos los sujetos presentaron una segunda o tercera convulsión, particularmente los sujetos del grupo SAPE, quienes mostraron un promedio de  $1.3 \pm 0.03$  convulsiones en comparación con los grupos SAPA y CTRL que mostraron mas de 2 convulsiones. Las no diferencias observadas para esta condición, pudieron deberse a que los sujetos experimentaban cambios internos debidos, por un lado a los tratamientos, y por el otro, al decremento en las concentraciones del 3-MPA. Sin embargo estos cambios sobre todo a nivel cerebral no pudieron ser determinados a través de la conducta.

Es importante considerar que el 3-MPA tiene una cinética dentro del organismo, y no siempre las convulsiones ocurren cuando hay la máxima concentración dentro del SNC. En este sentido, se ha reportado en ratas adultas que las máximas concentraciones de 3-MPA se alcanzaron

entre los 20-30 min. después de la administración i.p. de 50 y 100 mg/kg, sin embargo, las manifestaciones conductuales y particularmente las de la fase III y IV, se observaron entre los 4 y 6 minutos; asimismo, las concentraciones en estructuras cerebrales comenzaron a declinar entre los 40-50 min reportando en el hipocampo, niveles de entre 2-4  $\mu\text{g/ml}$  después de 2 horas de haber aplicado la inyección (Crick y cols 2007). En el experimento actual la evaluación conductual de la *posconvulsión* se efectuó sólo durante 35 minutos, de tal manera que los sujetos pudieron tener concentraciones significativas de 3-MPA en el cerebro y no presentar una nueva convulsión, como sucedió en el 70% de los sujetos que consumieron APE, en comparación con un 100% de los sujetos del grupo CTRL y SAPA quienes presentaron más convulsiones. Probablemente esta diferencia se deba al tratamiento y no a las concentraciones del 3-MPA, es decir, es probable que los sujetos del grupo SAPE a pesar de presentar la misma conducta de letargo y postración, experimentaron un efecto protector contra la presentación de más crisis convulsivas. Esto pudiera ser apoyado por estudios en los cuales se ha mostrado que ratas alimentadas con una dieta alta en  $\theta$ -3 durante cuatro semanas, después de una lesión experimental a nivel cerebral, presentaron una reducción del daño oxidativo, normalización de neurotrofinas como el BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y recuperación del daño en funciones cognitivas (Wu y cols, 2004).

## ***7.2 Resultados electrofisiológicos***

### ***7.2.1 EEG durante Vigilia-quieto antes de la aplicación del 3-MPA***

Durante el estado *vigilia-quieto antes de la aplicación del 3-MPA*, la actividad EEG mostró diferencias entre grupos en la Amígdala izquierda (AI), en donde los sujetos del grupo SAPA o tratados con aceite de palma mostraron una mayor PA desde los 4 hasta los 18 Hz respecto al grupo CTRL (Fig. 17 (B)). Este mismo grupo mostró también mayor PA en la Amígdala

derecha aunque la diferencia solo fue significativa en la frecuencia de 10 Hz. Los grupos CTRL y SAPE mostraron una PA similar en ambas estructuras. En resumen, solamente el grupo suplementado con aceite de palma mostró una mayor potencia absoluta (PA) y la tendencia fue que la amígdala izquierda fue la estructura que presentó mayores cambios.

Para dar una posible explicación a los resultados anteriores y de los subsecuentes, en términos de actividad eléctrica cerebral, es indispensable considerar que el Análisis espectral del EEG que se llevó a cabo en este trabajo, es un método cuantitativo considerado como una herramienta útil para observar cambios temporales en la actividad eléctrica cerebral bajo estados fisiológicos y conductuales específicos. La energía emergente de diversas áreas cerebrales puede ser estimada en el tiempo como un espectro de frecuencias (Chen y cols., 1983), por lo tanto, los resultados en esta condición reflejaron la actividad eléctrica cerebral de los sujetos bajo una condición de poco o nulo movimiento, pero con una actitud vigilante. En esta condición, la variable independiente fue el tratamiento, es decir, suplementos alimenticios energéticos, en este caso grasas, de tal manera que los registros del EEG obtenidos de los diferentes sujetos muy probablemente reflejan el efecto del suplemento alimenticio dado diariamente. En el presente experimento, los sujetos del grupo SAPA mostraron mayor potencia absoluta de las frecuencias de 4-18 Hz que los grupos CTRL y SAPE. El aceite de palma fue elegido para usarlo en un grupo experimental en virtud de que prácticamente carece de ácidos omega-3 y para controlar la variable de administrar por vía i.g una sustancia aceitosa alimenticia, similar a la del aceite de pescado. No se contempló la posibilidad de que al ser administrado de forma crónica desde la gestación hasta la edad adulta, este aceite pudiera afectar la funcionalidad amigdalina. El hecho de que de forma tan consistente el aceite de palma indujo un incremento de la PA de las frecuencias electroencefalográficas, muestra que efectivamente este aceite tuvo un efecto directo sobre la actividad eléctrica de la Amígdala,

efecto que no se observó en los sujetos del grupo SAPE y los del grupo CTRL. Cabe hacer notar que a la fecha la información al respecto es escasa, los hallazgos de otros estudios a los que nos podemos referir, no contemplan la manipulación de una sola variable como en el presente trabajo, sino dietas con elevadas cantidades de carbohidratos y grasas (muy similares a las dietas occidentales) y en las que se ha reiterado el efecto adverso sobre la funcionalidad del SNC. Por ejemplo, hace mas de 25 años se reportó en ratas implantadas en la Amígdala y en el Septum, un incremento de la amplitud de frecuencias EEG lentas, asociado a una dieta con mayores concentraciones de grasas saturadas y proteínas. El incremento en la amplitud fue significativamente menor en el Septum e comparación con la Amígdala, en donde el cambio fue mayor en los animales tratados con grasas saturadas que en los tratados con mayor cantidad de proteínas (Kosta, y cols., 1981). Se ha reportado que este tipo de dietas ricas en grasas saturadas pueden alterar funciones tan importantes como la memoria y el aprendizaje (Greenwood y Winocur, 1990; Molteni y cols, 2002), además de interferir en la recuperación después de un daño al tejido nervioso (Wu y cols, 2003).

En el presente experimento solamente utilizamos grasas como suplementos y se encontró que la AI en el grupo SAPA presentó una mayor susceptibilidad a manifestar cambios en las frecuencias de los 4 a los 18 Hz.

El tratar de explicar el porqué de estos resultados es difícil, sin embargo, podemos hacer algunas especulaciones. En la rata, la prevalencia de frecuencias lentas se ha asociado con estados de relajación, pero también con estados de atención en vigilia-quieto, y se ha descrito que las proyecciones de la Am pudieran tener conexiones con estructuras mesencefálicas ipsilaterales relacionadas con el alertamiento y la atención (Kreindler y Steriade, 1964).

Si consideramos el trabajo realizado por Kosta y cols (1981), ellos encontraron que las ratas alimentadas con grasas saturadas presentaron una mayor amplitud de las frecuencias lentas en

septum y amígdala, por tanto, es probable que en nuestro trabajo, la mayor actividad de frecuencias lentas en la AI y por tanto mayor diferencia funcional entre amígdalas pudiera reflejar una anormalidad preferentemente en los sujetos del grupo SAPA, ya que esta lateralización funcional amigdalina no se observó en los sujetos del grupo SAPE y CTRL.

Otra posible explicación a esta mayor PA en la AI de los sujetos del grupo SAPA durante la condición de *vigilia-quieto antes de la aplicación del 3-MPA*, es que los sujetos que consumieron APA hayan presentado un mayor estado de alertamiento generalizado, el cual pudiera estar asociado con la mayor amplitud de las frecuencias de 4-18 Hz en la amígdala izquierda. Esta sugerencia pudiera ser apoyada por el hecho de que los sujetos del grupo SAPA, durante todo su desarrollo, se diferenciaron de los otros grupos en que siempre fueron más hiperactivos, agresivos y sensibles a todas las manipulaciones. Inclusive cada vez que se iban a inyectar siempre fue más difícil su manipulación. Por tanto, aunque el registro de EEG en esta condición se efectuó en una situación estática y carente de situaciones adversas, es probable que en los sujetos del grupo SAPA su estado de alertamiento haya estado exacerbado y esto hubiera sido manifestado por la lateralización funcional amigdalina. Sin embargo y aunque se ha mostrado en humanos que hay mayor activación de la AI en pacientes con tristeza (Crawford y cols, 1996) o en hombres ante estímulos eróticos (Waissman y cols, 2003), es decir, situaciones que involucran información sensorial y emocional relevante, es difícil en este contexto de la rata determinar a que estado afectivo emocional se pudo haber asociado esta diferente funcionalidad amigdalina.

### ***7.2.2 EEG durante Vigilia-quieto después de la aplicación del 3-MPA (preconvulsión)***

En esta etapa del experimento se encontró que la potencia absoluta en la AI de los sujetos del grupo SAPA fue significativamente mayor respecto a la PA en el mismo hemisferio de los

sujetos del grupo SAPE y CTRL, particularmente en las frecuencias de 7 Hz y hasta los 14 Hz. Por lo que respecta a la Amígdala derecha, la PA del grupo SAPA también fue significativamente mayor en las frecuencias 8, 11, 14, 19 y 21 Hz al compararse con la PA de los grupos CTRL y SAPE. Nuevamente, estos resultados muestran que el grupo SAPA mostró los principales cambios EEG en la AI, particularmente una mayor PA en las frecuencias que corresponden a oscilaciones del ritmo theta en el EEG de la rata. Esto indica que estos sujetos continuaron con una diferente funcionalidad de la Am, en comparación con los sujetos de los otros grupos, No obstante, en esta etapa del experimento, se añadió otra variable consistente en la aplicación del 3-MPA. Cabe aclarar que el periodo de registro del EEG durante esta condición de *vigilia quieto después de la aplicación del 3-MPA*, se llevo a cabo 90 seg. antes de que ocurriera la primera convulsión (CV). En estas condiciones, el 3-MPA se encontraba ejerciendo sus mayores efectos (Crick y cols, 2007) y por lo tanto la actividad del EEG pudiera estar reflejando la respuesta Amigdalina de los sujetos que se encontraban bajo los distintos tratamientos, y ante una excitabilidad creciente que desencadenaría posteriormente en una CV. Es importante hacer hincapié que una mayor PA en el grupo SAPA ya se había contemplado desde antes de la aplicación del 3-MPA y sobre todo lateralizada hacia la amígdala izquierda, por lo tanto, es probable que ésta estuviera indicando una mayor sensibilidad neuronal y posiblemente un estado de alertamiento exacerbado. Takeuchi y cols, (2002) demostraron en ratas alimentadas con dietas bajas en  $\theta$ -3 un incremento en la potencia relativa de la banda theta, asociado a un menor aprendizaje en pruebas de evitación. En el presente experimento hubo un incremento de la PA de 7-14 Hz en la AI, lo cual es posible que influyera en un estado conductual de “mayor inatención”, “supuesta relajación” o incluso “somnolencia” que pudiera preceder a la CV. Camp y cols., (2003) han reportado un predominio de ritmo theta en el EEG de ratas normales minutos previos a la CV inducida por la aplicación de Fentilentetrazol

(antagonista GABAérgico). En este sentido, los resultados descritos muestran que la situación prevaleciente en los sujetos de los diferentes grupos segundos previos a la CV, en una marcada desincronización hemisférica en la actividad eléctrica de la Am, es decir la AI presentó mayor predominio de las frecuencias lentas que la AD en todos los sujetos, lo cual indicaría que los tratamientos no modificaron esta tendencia, pero si ejercieron un efecto sobre la latencia para la presentación de la 1ª CV, la cual fue significativamente mayor en el grupo SAPE que en el grupo SAPA y CTRL. Se ha observado que la pérdida de sincronización en la señales del EEG en los dos hemisferios cerebrales es un suceso que se presenta antes de que ocurra la CV (Wendling y cols, 2003). Esta es una característica EEG muy particular que se cree puede ser una herramienta valiosa para predecir cuando va a ocurrir la CV y determinar con mayor precisión el área afectada (Mormann y cols., 2003). En el presente experimento la mayor PA observada en el grupo SAPA en la AI da cuenta de una marcada desincronización hemisférica de la actividad eléctrica en la Am además de asociarse a una mayor sensibilidad para presentar crisis convulsivas más severas y en mayor número. Esto explicaría entonces el porqué en el 80% de los sujetos del grupo SAPA se presentaron más de 2 convulsiones y solamente en 70% de los sujetos del grupo SAPE presentaron 1 CV. Los sujetos del grupo SAPE mostraron mayor resistencia a presentar un mayor número de convulsiones y menor severidad de ellas, corroborado uno de los objetivos de este estudio y dando sustento desde esta etapa, a la hipótesis propuesta, en el sentido de que el suministro crónico de APE como suplemento tiene efectos neuroprotectores.

Hallazgos similares se han observado en estudios en los que los efectos benéficos del APE se han explorado en otros contextos, por ejemplo (Fontani y cols., 1995) encontraron en humanos que el consumo de aceite de pescado dado como suplemento de la dieta durante 35 días, se asocio a un menor tiempo de reacción en pruebas de índole cognitivo, al compararlo con el

tiempo de reacción registrado en la condición basal o de ausencia del suplemento; éste efecto benéfico se asoció con un incremento significativo en el porcentaje de ritmo theta y alfa particularmente en las pruebas de alertamiento y atención sostenida, mientras que el porcentaje de la banda beta disminuyó significativamente. En el experimento presente, el ritmo theta y el correspondiente a alfa presentó incrementos en esta etapa, pero de forma lateralizada, lo cual probablemente se asociaría con un estado de alertamiento previo a la inminente convulsión.

En resumen, en esta etapa de *vigilia quieto después de la aplicación del 3-MPA*, los resultados muestran dos hechos importantes: uno, que la actividad observada en el EEG fue fundamentalmente lateralizada a la AI, lo cual, como ha sido sugerido en otros estudios (Silveira y cols, 2000; Hewapathirane y cols, 2005), probablemente constituyó un preámbulo a la CV, y 2) que los sujetos del grupo SAPE, a pesar de mostrar una tendencia a la lateralización funcional amigdalina, presentaron una mayor latencia para la ocurrencia de la CV, corroborado uno de los objetivos de este estudio que era determinar si el consumo crónico del APE como suplemento alimenticio incrementaba la latencia para la aparición de la 1ª CV.

### ***7.2.3 EEG-Convulsión***

En un contexto general observamos que efectivamente el consumo de APE en forma de suplemento durante 130-150 días se asoció con una mayor resistencia para la aparición de convulsiones provocadas por efecto del 3-MPA, por otro lado, un hallazgo inesperado consistió en que el consumo de APA también en forma de suplemento y durante el mismo periodo se asoció a la presencia de mayor número de convulsiones, incluso más severas que las observadas en el grupo CTRL.

Los resultados del EEG mostraron que durante la ***Convulsión***, los sujetos de los grupos CTRL y SAPA registraron una mayor PA en la AD, en comparación con la registrada en los sujetos

del grupo SAPE, tanto en las frecuencias bajas e intermedias (6-15, 16 y 18 Hz), como en las altas (20-25 Hz). Por lo que respecta a la AI los grupos CTRL y SAPA mostraron también una mayor PA que el grupo SAPE en las frecuencias de 12 y 16 Hz y de los 19 hasta los 25 Hz. Por lo tanto observamos en la Amígdala dos patrones en la actividad electroencefalográfica, por un lado la que correspondería a la actividad lenta y semi-rápida con predominio principalmente de las frecuencias en la banda de  $\theta$  y de  $\alpha$ , y por el otro lado la correspondiente a la actividad rápida en la que se presentaron señales de bajo voltaje y de alta frecuencia principalmente en la banda de  $\alpha_2$  y la banda de  $\delta$  (20-25 Hz). Estas últimas son componentes de un patrón característico en el EEG de pacientes epilépticos durante las convulsiones (Wendling y cols., 2003). En general se ha asumido que las convulsiones son el resultado de descargas hipersincrónicas anormales de grupos de neuronas en el cerebro (Nyikos y cols, 2003), y esta anomalía se caracteriza en el trazo EEG por ondas con espigas muy pronunciadas en conjunto o trenes. En el humano, cada conjunto puede estar constituido por un número de entre 2 y 6 espigas recurrentes con una frecuencia de 12-45 Hz, seguidas de una onda negativa, la amplitud registrada durante este evento es variable (Hamer y cols., 2003).

En este contexto se observó en el EEG de todos los sujetos un incremento de la PA con relación al registro realizado en la etapa de preconvulsión, pero los sujetos del grupo SAPA y CTRL mostraron una mayor PA que el grupo SAPE sobre todo de las frecuencias rápidas; lo cual pareciera indicar que el tratamiento con APE se asoció a una menor PA de las frecuencias altas (20-25 Hz) características de las crisis convulsivas

El hecho de que la diferencia entre los grupos fuera significativa particularmente entre los 20 y 25 Hz y los valores muy similares en los dos hemisferios, revela un cambio en el espectro de frecuencias del EEG, caracterizado por una actividad eléctrica de alta frecuencia y bajo voltaje

pero de manera bilateral, es decir, hubo una aparente sincronización entre la AI y la AD bajo los efectos del 3-MPA durante la convulsión. Esto constituye un parámetro electrofisiológico comúnmente reportado en el EEG de pacientes epilépticos en estado convulsivo (Mormann y cols., 2003; Hewapathirane y cols., 2005).

Por lo tanto, el resultado de que sólo las ratas del grupo SAPE hayan mostrado menor potencia de las frecuencias rápidas en la Amígdala, pudo asociarse con un estado de menor sobreactivación neuronal durante la convulsión, y esto pudiera sugerir un incremento en el umbral para desencadenar la primera convulsión y probablemente el menor número de convulsiones presentadas por estas ratas que consumieron en forma crónica APE como suplemento alimenticio.

Hallazgos similares se han reportado en ratas a las que se les inyectó durante 21 días un preparado a base de ácido  $\omega$ -linolénico ( $\theta$ -3) y ácido linoléico ( $\theta$ -6) en una proporción de 1:4 respectivamente. En el estudio se encontró que el 85% de los animales inyectados con este suplemento no mostraron convulsiones tónico clónicas (estado V en la escala de Racine) en comparación con un 95% de las ratas control que si presentaron este estado inducido por la inyección de 50 o 10 mg de Fentilentetrazol (antagonista GABAérgico); asimismo, los animales con suplemento de  $\theta$ -3 registraron una mayor latencia para la presentación de las convulsiones al compararla con los sujetos control. Como posible explicación a estos resultados, los autores sugirieron la posibilidad de que el preparado con  $\theta$ -3 afectó la composición y fluidez de la membrana neuronal actuando como un “estabilizador de la membrana” que pudiera contrarrestar descargas eléctricas incontrolables en el cerebro (Yehuda y cols, 1994). Por tanto no sería ilógico pensar que un mecanismo similar sobre la membrana neuronal estuviera presentándose en los sujetos tratados con APE en nuestro experimento, donde el tratamiento crónico se administró diariamente por vía intragástrica durante 140 días,

pre-estableciendo mecanismos protectores a nivel de la membrana neuronal que se activaron al inicio de la sobreexcitabilidad neuronal en la Amígdala. Una de las razones que se contemplan para la propuesta de que es necesario un tiempo largo de tratamiento con APE, es que se ha reportado en humanos que después de ingerir un preparado que contenía entre otras cosas APE, los niveles de  $\theta$ -3 en sangre declinaron a su línea base a las 8-9 hrs postingestión (Yongsoon y Harris, 2003; Garaiova y cols, 2007), así, es posible que el suministro de  $\theta$ -3 por corto tiempo no sea suficiente para que se logre modificar la constitución de la membrana neuronal y los mecanismos protectores se limiten a la actuación de moléculas libres de  $\theta$ -3 en la sangre. En este sentido, se ha reportado en ratas que la aplicación iv. de 40  $\mu$ mol de EPA o de DHA durante 30 min. incrementa el umbral para la convulsión en un modelo de estimulación cortical; el umbral permanece elevado hasta por 6 hrs y retorna a su línea base 24 hrs después de la infusión. Los autores de este trabajo concluyeron que este es un efecto anticonvulsivo “modesto”, proponiendo que posiblemente la administración crónica de DHA y EPA en forma de suplemento pudiera inducir un efecto anticonvulsivo más largo (Voskuyl y cols., 1998).

En el presente trabajo los sujetos que recibieron como suplemento alimenticio el DHA y EPA contenidos en el APE durante 150 días, presentaron una latencia mayor para la presentación de la convulsión y un número menor de convulsiones asociado todo ello a una menor PA de las frecuencias rápidas a comparación de los sujetos CTRL y SAPA. Así, es posible que el suministro crónico de APE en forma de suplemento alimenticio pudiera haber propiciado una mejor respuesta ante el agente convulsivo que en el experimento de Voskuyl, en donde la infusión con los  $\theta$ -3 se llevó a cabo durante 30 min y de inmediato los sujetos fueron expuestos al convulsivante fentilentetrazol. En el presente experimento los sujetos del grupo SAPE fueron expuestos al efecto del 3-MPA entre 12 -13 hrs posteriores a la última dosificación (la aplicación i.g. de los diferentes tratamientos se realizó diariamente entre las 9-10 pm. y el

registro bajo el 3 MPA se llevó a cabo entre las 11 y 12 a.m.) por lo tanto, el efecto del tratamiento con APE desde la gestación a la edad adulta, posiblemente haya producido cambios a largo plazo de la membrana neuronal, como un incremento en la fluidez, compactamiento y elasticidad, asociados a la incorporación de  $\theta$ -3 (particularmente DHA y EPA contenidos en el APE). Esta sugerencia es apoyada por estudios que han propuesto que el efecto neuroprotector de los  $\theta$ -3 pudiera sustentarse principalmente en cambios estructurales y funcionales, básicamente en la membrana neuronal (Yehuda y cols., 1994; Valentine y cols., 2004; Bazan y cols., 2005), y que estos cambios pudieran dar cuenta de un efecto protector en contra de una hiperexcitabilidad en el tejido neuronal (Xiao y cols., 1999; Blondeau y cols., 2002). No obstante los cambios reportados a nivel de membrana, se ha sugerido que se requiere de otros complejos procesos que aún no se han aclarado debidamente (Stillwell y cols., 2005). Por otro lado, es posible que en el presente experimento el consumo crónico de un producto natural como el APE en forma de suplemento alimenticio hubiera activado además otros mecanismos que contrarrestaran la convulsión provocada por el 3-MPA, como por ejemplo; un bloqueo selectivo del canal de  $\text{Na}^+$ , el cual solamente pudiera darse en el caso de una actividad neuronal de alta frecuencia, es decir los  $\theta$ -3 favorecerían una inactivación dependiente del voltaje y la frecuencia (Young y cols., 2000). También es posible que se activara la síntesis de péptidos neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF-Neurothrophic Growth Factor), del cual se ha reportado que retarda el desarrollo de la convulsión e inhibe la reorganización aberrante de células nerviosas después de la convulsión (Elmer y cols., 1996). Esto explicaría el por qué los sujetos del grupo SAPA que consumieron APA (un aceite abundante en grasas saturadas y carentes de  $\theta$ -3), presentaron una menor latencia y mayor número de convulsiones asociadas a una mayor PA de las frecuencias rápidas durante la convulsión. Se ha reportado que una deficiencia de  $\theta$ -3 se asocia con un decremento del NFG en el hipocampo de ratas

(Ikemoto y cols, 2000), Por lo tanto la mayor PA y por ende una mayor excitabilidad neuronal mostrada por el grupo SAPA pudiera explicarse por una deficiencia de sustancias específicas como el NFG o de otras neurotrofinas como el BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). La reducción significativa del BDNF ha impedido en ratas con dietas altas en grasas y carbohidratos, la resolución favorable de un daño en el tejido nervioso (Wu y cols, 2003). En el experimento actual cabe la posibilidad de que en el grupo SAPA la convulsión pudiera haber generado una mayor alteración en la excitabilidad de la Amígdala que no pudo ser contrarrestada debido al tratamiento con grasas saturadas, esto pudiera explicar que estos sujetos manifestaran un mayor número de convulsiones y mas severas en comparación con los sujetos de los grupos SAPE y CTRL.

En resumen, en esta etapa de **Convulsión** encontramos datos que apoyan la hipótesis plantada en este experimento en el sentido de que el suministro crónico de aceite de pescado en ratas induciría una mayor resistencia a la aparición de convulsiones generadas por la aplicación del 3-MPA que en ratas controles y a las que se les dio aceite de palma, Asimismo, la mayor resistencia y menor intensidad de las crisis convulsivas observadas en las ratas del grupo SAPE se asoció con cambios electroencefalográficos amigdalinos característicos, distintos a los observados en las ratas control y las tratadas con aceite de palma.

#### **7.2.4 EEG durante la etapa de Postconvulsión**

En esta etapa, el análisis mostró que el grupo SAPA registró una mayor PA en la AD, en las frecuencias de 7, 8, y 13 Hz, en comparación con la PA de los grupos SAPE y CTRL. En contraste, en la AI el grupo SAPA mostró nuevamente una mayor PA en las frecuencias de 7, 8, 9 y 10 Hz en comparación con el grupo SAPE y CTRL y no hubo diferencias entre estos dos últimos grupos.

Una explicación a estos resultados consistiría en que, por un lado, pareciera que la Amígdala tendiera a normalizar su actividad después de la convulsión, esto determinado por el hecho de que en el EEG se registró una actividad semilenta de entre los 7 y los 13 Hz (muy distinta a las frecuencias rápidas de 20-25 Hz observadas en la *Convulsión* y con predominio en la AI izquierda, situación semejante a las etapas previas a la crisis convulsiva.

En esta etapa, el grupo SAPA mostró mayor PA que los otros grupos, tal situación podría sugerir que estos sujetos continuaron con un actividad eléctrica probablemente anormal en la Amígdala, de hecho los valores en este grupo y en esta etapa fueron similares a los registrados en *Vigilia quieto-Preconvulsion*, en donde estos sujetos también presentaron una mayor PA en la AI y en el mismo rango de frecuencias (7-14 Hz) registradas en la presente etapa. Estos datos pudieran indicar una persistencia en la alteración funcional en la Amígdala, propiciando una mayor sensibilidad en estos sujetos y predisponiéndolos a un mayor número de convulsiones, situación que de hecho ocurrió en este grupo. En el grupo SAPE los sujetos mostraron una PA similar a la registrada durante la etapa de *vigilia quieto sin el 3-MPA*, es decir, valores de PA similares a una condición basal; esto probablemente sugeriría una recuperación más rápida después de la crisis convulsiva, una menor excitabilidad del tejido neuronal y menor sensibilidad para desencadenar otra convulsión. Hallazgos similares se han reportado en ratas en un modelo de isquemia producida por infarto cerebral (Williams y cols., 2001). En ese experimento los sujetos inyectados con GP15232 (substancia que inhibe la n-acetil- $\alpha$ -peptidasa, enzima responsable de la activación de la n-acetil- aspartoglutamato que se desdobra para la formación de glutamato) presentaron en el EEG una PA similar a la condición basal antes del infarto, 24 hrs después de la inyección del GP15232, situación que no ocurrió en los sujetos CTRL.

En el presente experimento, como ya ha sido demostrado, es probable que el 3- MPA haya inhibido la Glutamato-decarboxilasa y por lo tanto al no haber más síntesis de GABA se indujeron las convulsiones en los sujetos de los diferentes grupos. El EEG en lo sujetos del grupo SAPE mostró que 1.4 min. después de haber ocurrido la 1a convulsión, los valores de la PA fueron similares a los registrados cuando a los sujetos no se les había aplicado el convulsivante, lo cual sugeriría una más rápida recuperación en la funcionalidad amígdalina asociada a el tratamiento con APE, situación que no ocurrió en los sujetos de grupo SAPA.

## **V DISCUSIÓN GENERAL**

El principal objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del APE sobre las convulsiones inducidas por hipertermia experimental en ratas machos neonatas, y las convulsiones inducidas por el ácido 3-mercaptopropiónico en ratas adultas. Se encontró que el suministro crónico de APE dado como suplemento adicional a la nutrición diaria desde la gestación, lactancia y edad adulta de ratas macho, se asoció a un efecto neuroprotector en contra de una mayor excitabilidad neuronal provocada por un estado de hipertermia y/o por la administración i.p del convulsivante ácido 3-Mercaptoproiónico (3-MPA) que altera la síntesis del GABA, el principal mecanismo inhibitorio del SN.

Se ha sugerido la participación de lípidos cerebrales en la epilepsia (Yehuda,1993), asimismo, se sabe que los lípidos son constituyentes importantes de las membranas neuronales, de tal manera que cambios en la composición lipídica de tales estructuras pueden alterar funciones que involucran receptores, canales iónicos y enzimas (Sthal & Harris, 1998). En este sentido, la actividad convulsiva en el SNC induce cambios drásticos en el metabolismo de los lípidos en las membranas neuronales, induciendo la acumulación de ácidos grasos libres, diacilglicerol y

productos proinflamatorios como el ácido araquidónico, prostaglandinas y leukotrenos (Bazan, 1971).

En el primer experimento de este estudio se observó que las crías de 5 días de edad del grupo SAPE mostraron una resistencia a la elevación de temperatura, mayor latencia para presentar un estado convulsivo, menor número de convulsiones y menor severidad de estas a comparación de las crías del grupo CTRL y el grupo SAPA. En el segundo experimento, las ratas macho adultas del grupo SAPE presentaron una actividad EEG amigdalina caracterizada por una menor potencia absoluta en las frecuencias rápidas (17-25 Hz), una mayor latencia para presentar la 1ª convulsión y un menor número de convulsiones inducidas por el ácido 3-mercaptopropiónico al compararse con el grupo SAPA y CTRL.

El APE es un aceite comestible de origen marino abundante en DHA y EPA. Los efectos benéficos del  $\omega$ -3 sobre la salud cerebral se sustentan no solo en los efectos a nivel de la estructura en las membranas neuronales, sino también en la expresión génica de enzimas involucradas en la transducción de señales (Jump, 2002). Los resultados de este estudio mostraron que el tratamiento crónico con APE atenuó el proceso convulsivo inducido tanto en edades tempranas (por hipertermia) como en la edad adulta de la rata (por 3-mercaptopropiónico), hechos que pudieran servir como base para apoyar la implementación de terapias alimenticias para la prevención y/o tratamiento de patologías con cuadros convulsivos. Acorde a esta sugerencia, Grenn y cols (2007) reportaron en ratones transgénicos (3xTg-AD), que una dieta con alto contenido de DHA y DPA (Ácido Docosapentanoico) administrada durante 12 meses, redujo la acumulación intraneuronal de placas  $\beta$  y tau amiloides como resultado del decremento de la presenilina -1 (proteína involucrada en degeneración neuronal), y no a un proceso de alteración en los precursores de proteínas amiloides. En el presente estudio, el tratamiento en el experimento 1 duró aproximadamente tres meses y en el segundo

experimento duró aproximadamente nueve meses, por lo tanto, es posible pensar que el organismo pudiera haber activado mecanismos neuroprotectores preventivos que requirieron de cierto tiempo y un mayor aporte de  $\theta$ -3 para su consolidación. Se ha reportado en ratas que la aplicación sistémica de DHA y EPA elevó el umbral para la convulsión provocada por sobrestimulación eléctrica, sin embargo este umbral permaneció elevado durante 24 hrs. post-infusión única de los  $\theta$ -3 y declinó a las 48 hrs (Voskuyl y cols., 1998). Estos hallazgos en conjunto pudieran sugerir la necesidad de que para que efectivamente se dé un efecto neuroprotector efectivo, se requiere de un suministro crónico, es decir, de un tratamiento a largo plazo.

Por otro lado es importante considerar que la administración crónica de APE en las ratas de este estudio, se administró como un suplemento alimenticio, es decir una proporción de DHA y EPA administrada diariamente como un complemento nutricional.

El presente trabajo incursionó en este campo y mostró en ratas que un producto natural como el APE dado como complemento nutricional en forma crónica se asoció a un estado de protección ante la sobreexcitabilidad producida por hipertermia experimental y por la acción del 3-MPA.

Es indispensable implementar entre otros estudios, investigaciones adicionales con el propósito de determinar si la administración crónica de APE como suplemento alimenticio, modifica a largo plazo el umbral para una convulsión, y si este producto natural pudiera mejorar el efecto de fármacos que son comúnmente utilizados en pacientes epilépticos.

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

En la rata macho de 5 días de edad, el aceite de pescado suministrado en forma crónica como complemento de la dieta (comercial) desde la gestación hasta la lactancia se asoció con:

- \* Resistencia a la elevación de la temperatura en un estado de hipertermia experimental.
- \* Baja frecuencia y menor duración de las crisis convulsivas asociadas a la hipertermia.
- \* Menor severidad en la magnitud de las convulsiones producidas por la hipertermia manifestada por menor número de mioclonías, menor número de movimientos de latigeo de la cola, menor número de pérdida de postura, y menor tiempo en un estado convulsivo caracterizado por pérdida intermitente de la postura asociada con mioclonias.

En la rata macho adulta, el aceite de pescado suministrado en forma crónica como complemento de la dieta (comercial) desde la gestación hasta la edad de 150 días se asoció con:

- \* Una mayor latencia para presentar la primera crisis convulsiva después de la aplicación i.p del agente convulsivo 3-MPA.
- \* Un menor número de convulsiones y una menor severidad de las mismas respecto al grupo SAPA y control.
- \* Una menor potencia absoluta de las frecuencias rápidas en el EEG amigdalino durante la convulsión respecto a los sujetos del grupo SAPA y CTRL.

El hecho de que las ratas tratadas con aceite de palma hayan mostrado desde antes de la administración del ácido 3-mercaptopropiónico, así como antes y después de la primera convulsión, una mayor potencia absoluta de frecuencias lentas y rápidas sobre todo en la

amígdala izquierda, coincide con otros reportes en los cuales se ha mostrado que antes de la convulsión ocurre una desincronización hemisférica característica, la cual en este estudio, volvió a presentarse después de la convulsión.

Esta desincronización hemisférica amigdalina fue observada en los sujetos del grupo SAPA desde antes de la aplicación del agente convulsivo, también después de su aplicación (pero antes de la ocurrencia de la convulsión) y posteriormente de la ocurrencia de la misma, así, es probable que ésta represente una posible alteración funcional generada por la administración crónica de un aceite rico en grasas saturadas y del cual se han reportado efectos adversos sobre la salud, como un elevado riesgo a padecer infarto del miocardio (Kabagambe y cols., 2005), y un efecto adverso sobre los perfiles de lipoproteínas en monos alimentados con dietas altas en grasas saturadas (Rudel y cols, 1990).

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adamec, R. E., & Morgan D. H., (1994) The Effect of Kindling of Different Nuclei in the Left and Right Amygdala on Anxiety in the rat. *Physiology & Behavior*, 55, 1-12.
2. Adler M. W., Geller E. B. (1993) Physiological functions of opioid temperature regulation. En *Opioid II*. Herz A. (eds.) pp 205-238, Springer-Verlag, Berlin.
3. Albala B. J. Moshe S. L., Okada R. Kainic-Acid-induced seizures a developmental study (1984). *Brain Research* 315: 139-148.
4. Amusquivar, E., Rupérez F. J., Barbas C., Herrera E. (2000) Low Arachidonic Acid Rather than  $\alpha$ -Tocopherol is Responsible for the Delayed Postnatal Development of Offspring of Rats Fed Fish Oil Instead of Olive Oil during pregnancy and Lactation, *Journal of Nutrition* 130(11) 2855-2865 .
5. Anderson, G.J., Neuringer M., Lin D. S., Connor W. E., (2003), Can prenatal N-3 fatty acid deficiency be completely reversed after birth? Effects on retinal and brain biochemistry and visual function in rhesus monkeys. *Pediatric Research*. 58(5). 865-872.
6. Arce, C. (1993) Cambios electroencefalográficos relacionados al sexo y la habilidad espacial. *Tesis de Maestría*. Universidad nacional autónoma de México.
7. Arias, C. Valerio, H. Tapia, R. Inhibition of Glutamate Decarboxylase Activity is related to Febrile Seizures in Rat Pups. *J. Neurochemistry* 45: 369-373 (1992).

8. Assisi A. et al (2006) Fish oil and mental health: the role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in cognitive development and neurological disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 21:319-336.
9. Atalies, S. Colman. John H. Miller. (2002)  $\mu$ -1 Opioid receptor stimulation decreases body temperature in conscious, unstrained neonatal rats. *Experimental Biology and Medicine*. 227(6) 3777-381
10. Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H. (1979). *The laboratory Rat*. Vol. 1 Ed. Academic Press, New York.
11. Bang, H.O., Dyeberg J., (1972). Plasma lipids and lipoproteins in greenland west coast Eskimos *Acta Medical Scandinavica* 192: 85-94.
12. Blundell, P., Hall, G., & Killcross, S.(2001). Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *The Journal of Neuroscience*, 21,(22), 9018-9026.
13. Bang, H.O., Dyeberg J.,& Nielsew A. B., (1971). Plasma lipids and lipoproteins pattern in Greenlandic west- coast Eskimos *Lancet*, 1: 1143-1146.
14. Bender, R. A., Dube, C., González-Vega, R. (2003). Mossy fiber plasticity and enhanced excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis; in animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13 : 357-370.
15. Baram, T. Z. Gorth, T. A., Schultz, L. (1997). Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Developmental Brain Research*. 98: 265-270
16. Baranm, T. Z. (2003) Long Term Neuroplasticity and Functional Consequences of Single versus Recurrent Early-life Seizures. *Annals of Neurology*, 54(6): 701-705 .
17. Bazan, G. N. Lipid Signaling in Neural Plasticity, Brain Repair, and Neuroprotection (2005) *Molecular Neurobiology*, 32, 89-103.
18. Benatti, P., Peluso G., Nicolai R., Calvani M., (2204), Polyunsaturated fatty acids: Biochemical, nutritional and epigenetic properties, *Journal of the American College of Nutrition; New York*. 23 (4): 281-302,
19. Berkovic, SF, Petrou S.(2006) Febrile seizures: traffic slows in the heat. *Epilepsy Research*. (70) 1: 190-1998.
20. Blondeau, N., Widmann C., Landusky M., Heurteaux C.(2002) Polyunsaturated Fatty Acids Induce Ischemic and Epileptic Tolerance. *Neuroscience*, 100 (2), 231-241.
21. Brailowsky, S., Silva-Barrat C. (1991) *Epilepsia Experimental*, series en Neurología, 2:295, México.
22. Brewster, A., Bender A. R., Chen Y., Dube C., Ahmadi E. M., Baram T. Z. (2002) Developmental Febrile Seizures Modulate Hippocampal Gene Expression of Hyperpolarization-Activated Channels in a Isoform- and Cell- Specific Manner. *Journal of Neuroscience*, 22(11: 4591-4599.
23. Brooks-Kayal, A. R.,(2005) Rearranging Receptors, *Epilepsia* 46(7), 29-38.
24. Burkhard, M. Mette M. Berger. Jean-Pierre Revely. Luc Tappy. Rene Chiolero, (2006) Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers. *Clinical Nutrition* 26, 70-77.
25. Burnham, W. M. Albright, P. S., Schneiderman, J., Chiu, P., Nichoji, T., (1981) Centreencephalic mechanisms in the kindling model. En *Kindling 2* Wada, J.A. Ed., Raven Press New Yor, pp.161-178.
26. Calviello, G., Palozza P., Piccioni E., Maggiano N., Frattuci A., Franceschelli P., Bartola G.M., (1998), Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A: effects on

- proliferation and apoptosis, en *International Journal of Cancer*; 75(2): 699-705, New York.
27. Calvo, J. M., Badillo S., Morales.Ramírez M., & Palacios Salas P. (1987) The role of the temporal lobe amygdala in ponto-geniculo-occipital activity and slepp organization in cats. *Brain Research*, 403, 22-30.
  28. Camp, V. N., Hooge R. D., Verhoye M., Peeters R. R., De Deyn P.P., Van der Liden A.(2003) Simultaneous electroencephalographic recording an functional magnetic resonance imaging during pentylenetetrazol-induced sizures in rat *Neuroimage* 19, 627-636.
  29. Carrie, I., Clement M., Javel D., Frances H., Bourre J. M. (2000). Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *Journal of Lipid Research* 41: 473-480.
  30. Cendes F., Febriles seizures and mesial temporal sclerosis (2004) *Current Opinion in Neurology* 17(2): 161-164.
  31. Chalon, S., Vancassel S., Zimmer L., Guilloteau D., Durand G. (2001), Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids* 36, 937-944.
  32. Chen, A. C., Dworkin S. F., & Drangsholt M. T. (1983), Cortical power spectral analysis of acute pathophysiological pain. *International Journal Neuroscience* 18 (3-4), 269-278.
  33. Chen, C., & Bazan N. G., (2005). Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 93: 929-941.
  34. Chen K., Baram T. Z., Soltesz I. (1999) Febrile seizures in developing brain results in peersistent modification of neuronal excitability in limbic circuits *Nature Medicine* 5(8). 888-894.
  35. Chulada, P.C., Thompson M.B., Mahler J.F., et al. (2000), Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Research*; 60: 4705-4708, Baltimore.
  36. Clifton, PM, Keogh, J. B., Noakes M., Transfatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction (2004). *Journal of Nutrition*, 134 ; 874-879.
  37. Coblijn, B. G., Hogyes E., Kitajka K., Puskas L.G., Zvara A., Hackler Jr.L., Nyakas C., Penke Z., Farkas T., (2003), Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids, en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100 (20): 11321-11326, Washington.
  38. Coleman-Meschke, K & McGaugh J. (1995) Differential involvement of the right and left amygdalae in expression of memory for aversively motivated training. *Brain Research*, 670, 75-81.
  39. Colman S. A., Miller H. J. (2002)  $\mu$ -1 Opioid receptor stimulation decreases body temperature in conscious, unrestrained neonatal rats. *Exp. Biol. Med.* 227(6) 3777-381.
  40. Connor, W.E. (2000) Importance of n-3 fatty acids in Health and disease, *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1715-1755.
  41. Corsi-Cabrera, M. (1983) *Psicofisiología del sueño*, México, D.F.; Trillas .

42. Constantin, L., Bozzi Y., Richichi C., Viegi A., Antonucci F., Funicello A., Gobbi M., Mennini T., Rossetto O., Montecucco C., Maffei L., Vezzani A., & Caleo M. Antiepileptic Effects of Botulinium Neurotoxin E (2005), *The Journal of Neuroscience*, 25(8), 1943-1951.
43. Covington, M.H., (2004), Omega-3 Fatty Acids, en *American Academy of Family Physicians*; 70: 133-140.
44. Crick, W. E. Osorio I., Bhavaraju C. N. linz H. T., Lunte E. C.(2007) An investigation into pharmacokinetics of 3-mercaptopropionic acid development of a steady-state chemical seizure model using *in vivo* microdialysis and electrophysiological monitoring. *Epilepsy Research* 74: 116-125.
45. Crawford H. J., Clarke S. W., kitner T. M. (1996) Self-generated happy and sad emotions in low and highly hypnotizable persons during waking and hypnosis laterality and regional EEG differences. *International journal of Psychophysiology* 24 (3): 239-266.
46. D'Antuono, N., Louvel, J., kohling R., Mattia, D., Bernasconi, A., Oliver, A., Turak, B., Devaux, A., Pumain, R., Avoil, M.(2004) Gaba-A receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *Brain* 127,1626-1640.
47. De Caterina, R. Madonna R, Massaro M.(2004) Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion molecules. *Nutrition and Biochemistry*.15(6),358-65
48. Delanue J., Matzinger O., Binnert C., Schneiter P., Chioléro R., Tappy L (2003). Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental strees in healthy men. *Diab. Metab.* 29: 289-295.
49. Demaison L., Blet J., Sergiel J. P., gregorie S., Argaud D. (2000) Effect of dietary polyunsaturated fatty acidson contractile function of hearts isolated from sedentary and trained rats. *Reproduction Nutrition and Development* 40(2): 113-115.
50. Dobbing, J., 6 Sands J. (1973) Quantitative Growth and development of human brain Archives of disabil. in Children 48:757-767.
51. Dube, C., Chen K., Ahmadi E. M., Brunson Ch., Soltesz I., Baram T. Z. (2000). Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long-term. *Annals in. Neurology* 47: 336-344.
52. Dube C., Richichi C., Bender R. A., Chung, G. L., Baram T. Z., (2006) Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures prospective analysis *Brain* 129(4): 911-922.
53. Dudek F. E.(2002) Selective Inhibitory Interneurons loss Produces Chronic Hippocampal Hyperexcitability *Epilepsy Currents* 2(1) 25-29.
54. Ebert, U., Runfeldt, C., Loscher W., (1995) Development and pharmacological suppression of secondary after.discharges in the hippocampus of amigdala kindled rats. *European Jornal of Neuroscience* 7(4), 732-741.
55. Elmer E., Kokaja M., Kokaja Z., Ferencz I., lindvall O. (1996) Delayed kindling developmentafter paidly recurring seizures: relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Research* 712 (1): 19-34.
56. Engler, M. B., (1994) Vascular effects of omega-3 fatty acids possible therapeutic mechanisms in cardiovascular disease *Journal of Cardiovascular Nursing* 8: 53-67
57. Eugéne I., Depienne CH., Baulac S., Baulac M., Fritschy J. M., LeGuern E., Miles R., Poncer C. J., (2007) GABA<sub>A</sub> Receptor  $\gamma$ 2 Subunit Mutations Linked to Human Epileptic Syndromes Differentially Affect Phasic a Tonic Inhibition. *J*

- Neuroscience* 27(51): 14108-14116.
58. Favero A., Parpinel M., Franceschi S., (1998), Diet and risk of breast cancer major findings from an Italian case-control study, en *Biomedicine and Pharmacotherapy*; 52: 109-115, Paris.
  59. Fejerman N. (2005) Nonepileptic disorders imitating generalized idiopathic epilepsies. *Epilepsia* 9: 80-83
  60. Fernández, R., Piechnik, J. Fabris, R., Malnic, G., Fernández, L. G., (2004). Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats. *Brazilian Journal of Medicine and . Biology Research.* 37: 1481-1489.
  61. Fletcher, D. J. , Raz, J. & Fei, G. (1997) Intrahemispheric alpha coherence decreases with increasing cognitive impairment in HIV patients. *Electroenceph Clin Neurophysiol.*
  62. Fisher F. 3-Mercaptopropionic Acid (3-MPA) (2002) *Synlett* 8 (1368). Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.
  63. Fontani, G., Corradeschi F., Felici A., Alfatti S., Migliorini & Lodi L.(2005) Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. *European Journal of Clinical Investigation* 35, 691-699.
  64. Fontani E. D., Mao J W., Mueller K. E., Eilersieck M. R., Will M. J., Roberts M. R., McDonald R., Rosenfeld C. S. (2007) Effects of diets Enriched in Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on Offspring Sex-Ratio and maternal behavior in Mice. *Biology of Reproduction* 10:
  65. Gadek, A. Mitchalska J., & Bugajsky (2003). Repeated handling, restraint, or crowding impairs the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(3), 449-459.
  66. Gawrisch, K, Eldho N, Holte L., (2003) The structure of DHA in phospholipid membranes *Lipids*; 38: 445-452.
  67. Garaiova I., Guschina A. I., Plummer S. F., Tang J., Eang D., & Plummer T. N., (2007) A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutrition Journal*, 6:4, 280-289.
  68. Gloor, P. (1991) Mesial temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective. En: *Epilepsy Surgery* (Saunders H. O. ed.) pp. 689-703, New York Raven.
  69. Green, P., Glozman S., Kamensky, B., Yavin B. (1999) Developmental changes in rat brain membranes lipids and fatty acids: the preferential prenatal accumulation of docosahexanoic acid. *Journal of Lipid Research*, 40: 960-966.
  70. Green N. K., Coria M. H., Khashwji H. Hall B. A., K. Mauro Y. A., Ellis L., LaFeria M. F., (2007) Dietary Docosahexanoic Acid and Docosapentanoic Acid Ameliorate Amyloid- $\beta$  and tau Pathology via a Mechanism Involving Presenilin 1 Levels. *The journal of Neuroscience* 27(16): 4385-4395.
  71. Greenwood, C. E. & Winocur G. (1990) Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet, *Behavior Neural Biology.* 53(1),74-8.
  72. Goddard, G., McIntyre D., & Leech C., A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology.* 245, 745-761.
  73. Goldbart A.D., Row B.W., Keirandish-Gozal L., Cheng ., Brittan J.R., & Gozal D., High (2006) fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia. *Brain Research*, 1090(1), 190-196.

74. Guevara, M.A. Ramos, J., & Corsi-cabrera, M. (1995). Aplicación del análisis de correlación a la actividad electroencefalográfica. *Tesis de doctorado*. Universidad Nacional Autónoma de México
75. Gloor, P. (1991) Mesial temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective. En: *Epilepsy Surgery* (Saunders H. O. ed.) pp. 689-703, New York Raven.
76. González T. E., Tapia E., López M. L., Navarrete A., Reyes R. A., Martínez A. (2006) anticonvulsant Effect of *Annona Diversifolia Saff.* And Palmitone on Penicillin – induced Convulsive Activity. A behavioral and EEG Study in Rats. *Epilepsia* 47(11): 1810-1817.
77. Gottlieb, A., Keydar I., Eipstein, H. T. (1997) Rodent Growth Sates, an Analytical Rewiew. *Bioogy o. Neonate* 32: 166-176.
78. Haag, M. (2003). Essential Fatty Acids and the Brain, *Canadian Journal of Psychiatry*, 48 (3): 195-203.
79. Harris, W. S., Gonzales M., Laney N., Sastre A., Borkon A. M., (2006) Effects of omega-3 fatty acids on heart rate transplant recipients, en *American Journal of Cardiology* 98(10):1393-1395.
80. Harmony, T., Marosi, E. Fernández T., Bernal, J., Silva, J., Rodríguez, M., Reyes, A. (1994) EEG coherences in patients with brain lesions. *International Journal of Neuroscience* 74: 203-226.
81. Hasegawa D., Orima H., Fujita M., Hashizume K., Tanaka T. (2002).Complex partial status epilepticus induced by a microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in dogs and its brain damage *Brain Research*. 955: 174-182.
82. Hasegawa J. I., Lo H. H., Lee M. N. (1987) Lipid Requeiment for  $\mu$  Opioid Receptor Binding. *Journal of Neurochemistry* 49(4): 1007- 1012.
83. Hauberk, L.Y., Stockard J.E., Saste M.D., Benford V.J., Phelps C.P., Chen L.T., Barness L., Wiener D., Carver J.D., (2002), Maternal dietary docosahexanoic acid content affects the rat pup auditory system, en *Brain Research Bulletin*; 58 (1): 1-5, New York
84. Hauser, W. A.,Hesdorffer, D. C. (1991). Epidemiology of Epilepsy, en *Neuroepidemiology: Atribute to Bruce Schoemberg*, Ed. *Dallas W Anderson SRC Press*, pp. 97-119
85. Heida G, J., Pittman Q., Causal Links between Brain Cytoquines and Experimental Febrile Convulsions in the rat (2003) *Epilepsia* 46(12):1906-1913.
86. Hijeresen, D. L. y Díaz, J. (1988) Ontogeny of susceptibility to experimental febrile seizures in rats. *Developmental Psychobiology*, 21: 261-275.
87. Heizer m. L., McKinney J. S., Ellis E. F. 81992) The effect od dietary fatty acids in vivo platelet agregation in the cerebral microcirculation *Thrombosis Research* 68 (4-5): 383-391.
88. Helland I.B., Saugstad O.D., Saarem K., Van Houwelingen A.C., Nylander G., Drevon C.A., (2006), Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants, en *Journal Matern Fetal Neonatal Medicine* 19 (7): 397-406, London.
89. Hewapathirane S. D. , & Burnham W. M. (2005) Propagation of amygdala-kindled seizures to the hippocampus in the rat: Electroencephalographic features an behavioral correlates. *Neuroscience Research*, 53, 359-375.

90. Hijeresen, D. L. y Díaz, J. (1988). Ontogeny of susceptibility to experimental febrile seizures in rats. *Developmental Psychobiology* 21: 261-275
91. Holmes, G. L. (1997). Epilepsy in the developing brain lessons from the laboratory and clinic *Epilepsia*, 38 (1): 12-30
92. Holstege, G. (1991) Descending motor pathways and the spinal motor system: limbic and non-limbic components. *Progress in Brain Research* 87, 307-421.
93. Ikemoto A., Ohishi M., Sato Y., Hata N., Misawa Y., Fujji Y., Okuyama H., (2001), Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of n-6 fatty acids as another critical factor. *Journal of Lipid Research* 42: 1655-1663.
94. Ikemoto A., Nitta A., Furukawa M., Ohishi M., Nakamura A., Fujji Y., Okuyama H., (2000) Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 285(2), 99-102.
95. Jansen, A. SP. Ter. H. G. J., Metenlaiser T. C., Loewy A.D. (1994), CNS cell groups projecting to the submandibular parasympathetic preganglion-neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Research* 572, 253-260
96. Jensen, F.E., Holmes, G. L., Lambroso, G. T. (1992) Age dependent changes in log term susceptibility in behavior after hypoxia in rats. *Epilepsy*, 53: 971-980.
97. Jiang, M., Lee, C. L., Smith K. L., Swann J. W. (2001), Spine Loss and others persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *Neuroscience*. 107:71-84
98. Jones T, Jacobsen S. J. (2007). Childhood Febrile Seizures: Overview and Implications. *Int, J. Med. Sci.* 4(2): 110-114.
99. Joshi C., Wawrykow T., Patrick, & J. Prasad A. (2005) Do clinical variables predict an abnormal EEG in patients with complex febrile seizures. *Seizure* 14(6):429-434.
100. Kabagambe, K, D., Baylin, A., Ascherio A., Campos H., The Type of Oil Used for Cooking Is Associated with the Risk of Nonfatal Acute Myocardial Infarction in Costa Rica, *Journal Nutrition*. 135 (11): 2674-2679.
101. Kandel, ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000) *Principals of Neural Science*. New York: 4<sup>th</sup> ed. Edit Mc Graw Hill.
102. Kalviainen, R., Salmenpera, T., Partanen, K., Vainio, P., Tiekkinen, SrP, Pitkanen A. (1997) MRI volumetry and T2 relaxometry of the amygdala in newly diagnosed an chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 28, 39-50.
103. Kang X. J., Leaf A. (1996) Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na<sup>+</sup> channels by directly binding to the channel protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3542-3546.
104. Kang J. X. (2005) Balance of omega-6/omega-3 essential fatty acids is important for health. The evidence from gene transfer studies. *World Review Nutrition Diet*. 2005; 95:93-102.
105. Karlsson A., Fonnun F., Malthe S., D., Storm M., J. (1974) Effects of the convulsive agent 3-mercaptopropionic acid, on levels of GABA, others aminoacids and glutamate decarboxylase in different region of the rat brain. *Biochemistry Pharmacology* 23: 3053-3061
106. Katan, M. B., Deslypere, J. P., Paterson V. B. A., Pendeers, M., Zegwaard, M., (1999). Kinetic of incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: An 18-month controlled study. *Journal of Lipid Research*, 38 (20): 12-22.

107. Kikugawa, K., Yasuhara, Y., Ando K., Koyama, K., Hiramoto, K., Susuki, M. (2003) Protective Effect of Supplementation of Fish oil with High n-3 Polynsaturated Fatty Acids against Oxidative Stress- Induced DNA Damage of Rat Liver in Vivo. *Journal Of Agricultural And Food Chemystry*. 57,6073-6079.
108. Kreindler A., Steriade M., (1964) EEG Patterns of arousal and sleep induced by stimulating various amigdaloid levels in the cat. *Archives Italiennes de Biologie* 10 (102): 576-586.
109. Kim N. Green et al. (2007) Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic ameliorate amyloid- $\beta$  and Tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *The journal of Neurosciense*. 27(16):4385-4395.
110. Knudsen, F. U. (1996). Febrile seizures- treatment and outcome, *Brain and Development* 18, 438-449.
111. Kosta ,K., Kostovà D., Boda K.,(1981) Electrical activity of the Amygdala and septum of rats on high fat or high protein diet. *Physiology Bohemolov*, 30 (3), 237-242.
112. Kreindler, A., & Steriade M.(1964) EEG patterns of arousal and sleep induced by stimulating various amygdaloid levels in the cat. *Archives Italienses de Biologie*, 103, 576-586.
113. Lambert, S. M., Avella A. M., Berhane Y., Shervill E., Botham M. K., (2001), The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their binding and internalization by isolated hepatocytes, en *European Journal of Biochemystry* 268, 3983-3992.
114. Lamar, C. (1970). Mercaptopropionic Acid: a convulsant that inhibits glutamate decarboxilase. *Journal of Neurochememical* 17, 165-170.
115. Lands W. E., Hamazaki T. Y., (1990) Changing dietary patterns en *American. Journal Clinical of Nutrition* 51, 991-993.
116. Larsson S.C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A., (2004), Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms, en *American Journal of Clinical Nutrition*; 79, 935-945.
117. Lau C. S., Collateral benefits of fish oil therapy for rheumatoid arthritis (2006), en *Journal of Rheumatology* 33 (10), 1931-1933.
118. Lauritzen, I., Blondeau n., Heurteaux C., Widmann C., Romey G., Lazdunski M. (2000) Polyunsaturated Fatty Acids are potent neuroprotectors en *Journal EMBO* 17(19(B)), 1784-1793.
119. Lee, C. L., Hanaay, J., Hrachovy, R. (2001). Spatial learning deficits without hippocampal loss in a model of early-onset epilepsy. *Neuroscience*, 107, 71-848.
120. Lehninger, A. L. Nelson, D. L., Cox, M. M., (2004) *Principles of Biochemistry*, 4<sup>Th</sup> ed, W.H. Freeman & Co.
121. Levan, B. Radel J. L., Carlson S. I. (2004) Decreased brain docohexanoic acid during devlopment alters dopamine related behavior in adult rats that are differentially affected by dietary remediation, *Behavioral. Brain Research* 152(1), 49-57.
122. Lewis, W: (2005).Losing neurons: selective vulnerability and mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 46 Suppl 7:39-44.
123. Loannidess, A. A., Corsi-Cabrera M., Fenwick P. B., Del Rio Portilla Y., Laskaris N. A., Khurshudyan A., Theofilou D., Shibata T. Uschida S., Nakabayashi T., & Kostopoulos G. K. (2004) MEG tomography of human cortex and brainstem

- activity in waking and REM sleep saccades. *Cerebral Cortex*, 14(1), 56-72.
124. Loscher W., Bohme G., Muller F., Pagliusi S., (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *Journal of Neurochemistry* 45: 879-889.
  125. López –Condes I., Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43: 1083-1087 (1993).
  126. López M. M., González T. M., Neri B. L., Hong E., Rocha LL. (2005) 5HT1 a receptor agonist modify epileptic seizures in three experimental models in rats *Neuropharmacology* 49(3):367-375.
  127. Lortet S., Verger P. (1995) *International Journal Sport medicine* 16(8):519-521.
  128. Lupica C. R., Bell, J. A., Hoffman A. F., Watson P. L. (2001) Contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>H</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology* 86, 261-268.
  129. Maher J., McLachlan R. S., (1995) Febrile convulsions. Is a seizure duration the most important predictor of temporal lobe epilepsy? *Brain* 118(6): 1521-1528.
  130. Mares, P., Kuvová, A., Zouhar, A., Folbergrova, J., Korynyova, H., Stanková, L. (1993) Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by 3-mercaptopropionic acid in immature rats. *Epilepsy Research* 16, 11-18.
  131. Morimoto, T., Nagao, H., Yoshimatsu, M., Yoshida, R., Matsuda H. (1993) Pathogenic role of glutamate in hypertermia induced seizures. *Epilepsia* 34: 447-432.
  132. Marrosu, F., Santoni F., Fà M., Puligheddu M., Barberini L., Genugu F., Frau R., Manunta M., and Mereu G. (2006) *Journal of Neuroscience Research*. 83(3), 385-91
  133. McNamara J. O., Byne M.C., Dasheiff R. M., Fitz, J. C. (1980). The Kindling model of epilepsy, *Progress in Neurobiology* 15,139-159.
  134. Matta, J. A., Miyares, R. L., Ahern, G. M. (2007), TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol*. 15 (578): 397-41.
  135. Meyer B., Mann J. N., Lewis J. L., Milligan G. C., Sinclair J. A., Howe R. C. P. (2003) Dietary Intakes of Food Sources of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty acids. *Lipids* 28(4): 391-397.
  136. Michaeli B., Berger, M. M., Revelly J. P., Tappy L., Chioléro R. (2007). Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to endotoxin challenge in healthy volunteers. *Clinical Nutrition* 26: 70-77.
  137. Miret S., Sáiz M. P., Mitjavila M. T. (2003) Effects of fish oil and olive oil-rich diets on iron metabolism and oxidative stress in rats. *B.J. Nutr.* 89 (1): 11-18.
  138. Mizota, A., Sato, E., Taniai, M., Adachi-Usami, E., Nishikawa, M., (2001), Protective effects of dietary docosahexaenoic acid against kainate-induced retinal degeneration in rats. En: *Ophthalmology and Visual Science*. 42 (1): 216-221.
  139. McDonald, A. J., (1998). Cortical Pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology* 55, 257-332.
  140. Megli, F. M. & Sabatini, K., (2003) EPR studies of phospholipid bilayer after lipoperoxidation. I. Inner molecular order and fluidity gradient. *Chemical Physical Lipids* 125(2), 161-172.
  141. Mohebbi, M. R., Navipour R., SevedKazemi M., Zamanian H., Khamseh F. (2004) Adult-onset epilepsy and history of childhood febrile seizures: a retrospective

- study. *Neurology India* 52(4), 463-465.
142. Mohebbi MR, Navipour R, Seyedkazemi M, Zamanian H, Khamseh F. Adult-onset epilepsy and history of childhood febrile seizures: a retrospective study. *Neurology India* 52(4):463-465 (2004)
  143. Molteni R., Barnard R.J., Ying Z., Roberts C. K., Gomez-Pinilla F.,(2002), A high-fat refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*,112 (4), 803-814.
  144. Morimoto, T., Nagao, H., Sano, N., Takahashi, M., Matsuda, H. (1990) Hyperthermia induced seizures with a servo system: Neurophysiological roles of age, temperatura elevation rate and regional GABA content in the rat. *Brain Development* 12, 279-287.
  145. Mormann F., Kreuz T., Andrzejak, David P., Lehnertz K., Elger E. Ch. (2003) Epileptic seizures are preceded by a decrease in synchronization *Epilepsy Research* 50, 173-185.
  146. Morris M.C., Evans D.A., Tangney C.C., Bienias J.L., Wilson R.S., (2005), Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study *Archives of Neurology*, 62(12), 1849-1853, Chicago.
  147. Murata M., Kaji H., Iida K., Okimura Y., Chihara K., (2001), Dual action of eicosapentaenoic acid in hepatoma cells; up-regulation of metabolic action of insulin and inhibition of cell proliferation, *en Journal of Biological Chemistry*; 276: 31422-31428, Baltimore
  148. Nelson, K. B., leMBERG, J. H (1976), Predictors of Epilepsy in Children. Who have experienced febrile seizures. *New England Journal of Medicine* 245. 1029-1033
  149. Netopilova, M., Drsata J., Kuvová, A., Mares, P. (1995) Differences between immature and adult rats in brain glutamate decarboxylase inhibition by 3-Mercaptopropionic acid. *Epilepsy Research* 20 179-184.
  150. Netopilova, M., Drsata J., Haugvicoba, R., Kuvová, H., Mares, P. (1997), Inhibition of glutamate decarboxylase activity by 3-mercaptopropionic acid difieren time course in the immature and adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 226: 68-70.
  151. Neuringer, M., Connor W. E., Lin D. S., Barstad L., Luck S (1986), Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal  $\alpha$ -3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys, *en Proceedings of National Academic Sciences* 83, 4021-4025.
  152. Nobmann, D. E., Poce R., Mattil C., Devereux R., Dyke B., Ebbesson S. O. E., Laston S., McCluer J., Robbins D., Romanesko T., Ruotolo G., Wenger Ch. R., Howard B., (2005), Dietary Intakes Vary with Age among Eskimo Adults of Northwest Alaska in the GOCADAN Study, 2000-2003, *Journal of Nutrition* 135(4), 856-862.
  153. Nolte J.(1999) *The Human Brain An Introduction to its Functional Anatomy.*: 4<sup>th</sup> edit Mosby New York.
  154. Nyikos, L., Lasztóczy B., Antal, K., Kovács R., & Kardos J. (2003) Desynchronisation of spontaneously recurrent experimental seizures proceeds with a single rhythm. *Neuroscience*, 121, 705-717.
  155. Otha, M.M. (1986) Supratrigeminal neurons mediate short.est disynaptic pathways from central amygdaloid nucleus to the contralateral trigeminal motoneurons in the rat. *Journal Comparative Biochemistry and Phisiology* 83A: 633-641.
  156. Parent, J. M., Ju T. W., Leibowitz, R. T. Dentate granule cell neurogenesis is

- increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus , *Journal. Neuroscience* 17, 3727-3737.
157. Patel, H.C., Ross F.M., Heenan L.E., Davies R.E., Rothwell N.J., Allan S.M. (2005) Neurodegenerative actions of interleukin-1 in the rat brain are mediated through increases in seizure activity. *Epilepsy Behavior* 6(3), 328-36.
  158. Paxinos G. Watson (1997) *The rat Brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press. New York
  159. Pepe, S., Peter, Mc. Lennan, P. (2002), Cardiac Membrane Fatty Acids Composition Modulates Myocardial Oxygen Consumption and Postischemic Recovery of Contractile Function, en *Circulation* 12, 2303-2308.
  160. Pitkanen, A., Kelly, J. L. Amaral, D.G.(2002) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of amygdala to the entorhinal cortex in the macaque monkey. *Hippocampus*, 12, 186-205.
  161. Pitkanen, A., Amaral, D. G.(1998) Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projection originating in lateral nucleus, *Journal of Comparative Neurology* 398, 431-458
  162. Pitkänen A., Savander V. y LeDoux J. (1997) Organization of intra-amygdaloid Circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neuroscience* 20 (11), 517- 523.
  163. Phelps, E. A. LeDoux, J. E.(2005)Contribution of the Amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior *Neuron* 48, 175-187.
  164. Pluess T. T., Hayoz D., Berger M. M., Tappy L., Revely P. Y., Michale B., Carpentier I., Chioléro R. (2007) Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects. *Intensive Care Med.* 33: 789-797.
  165. Poling, J.S., Karanian J.W., Salem N Jr, Vicini S., (1995) Time and voltage – dependent block of delayed rectifier potassium channels by docosahexanoic acid. *Molecular Pharmacology* 47, 381-390.
  166. Prince, J. L., Russchen F. T., & Amaral D. G.,(1987) The limbic region.II. The amygdalid complex. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 5 Integrated Systems of the CNS*, PT I, Björklund A. Hökfelt T., Swanson L. W., eds, pp. 279-388. New York: Elsevier.
  167. Racine, R.J., (1972) Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation. II Motor Seizure. *Electroencephalography Clinical Neurophysiology* 32, 281-294.
  168. Rashid K., Van der Zee C.E.E.M., Ross M.G., Champman A. C., Stanis J., Riopelle J. R., Racine J. L., Fahnstock M. (1995) A nerve growth peptide retards seizure development and inhibits neuronal sprouting in rat model of epilepsy. *Proceedings of National Academy Science*, 92, 9495-9499.
  169. Reinhart, G. A., (1996), Review of  $\omega$ -3 Fatty acids and dietary influences on tissue concentration, en *Recent Advances en Canine and Feline Nutritional Research*, Edit. Carey D. P., Norton A. S., Bolser S., Orange Fraser Press, Wilmington, Ohio, USA, pp. 235-242.
  170. Roberts C. K., Bernard r.J., Sindhu R. K., Jurczak M., Ehdaine A., Vaziri N. D. (2004) A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *Journal Applied Physiology* 98: 203-210.
  171. Rudel L. L., Haines J. L., Sawyer J. K. (1990) Effects on plasma lipoproteins of monosaturated, saturated and polyunsaturated fatty acids in the diet of african

- green monkeys. *Journal of Lipid research* 31: 1873-1882.
172. Rustan, A.C., Hustvedt B-E., Drevon C.A., (1993). Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat, *Journal of Lipid Research* 34, 1299-1309.
  173. Samson, R. D., Domont, E. C., Paré D.(2003) Feedback inhibition defines Transverse processing modules in the lateral amygdala. *Jornal of Neuroscience* 23, 1966-1973.
  174. Sarkisan, M- R. Tadon, P., Lin Z. (1997) Multiple kainic Acid Seizures in the Immature Rat and Adult Brain: Ictal Manifestation and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia* 38, 1157-1166 8
  175. Shao L. R. , Dudek F. E. (2004) Increased excitatory synaptic activity and local Connectivity of hippocampal CA1 pyramidal cells in rats with Kainate-induced epilepsy *Journal of Neurophysiology* 92(3): 1366-1373.
  176. Shaw, J.C. (1984). Correlation and Coherence analysis of the EEG a selective tutorial review. *International Journal of Psychophysiology* I, 255-266.
  177. Shaw, J. C., O'Connor K. P. y Ongley, C, (1977) The EEG as a measure of cerebral Functional organization. *British Journal of Psichiatry* 130, 260.264.
  178. Shi H. L., Luo F., Woodward J. D., Mcintre D. C., Chang Y. J. (2006) temporal secuence of ictal discharges propagation in the corticolimbic basal ganglia system during amygdale kindled seizures in freelymoving rats. *Epilepsy research* 73: 85-97.
  179. Shinar, S. (1990). Febrile seizures. En *Current Therapy in neurological disease* (Jonson, RT. Ed), pp. 29-32. Philadelphia: Decker.
  180. Silveira, D. C., Klein, P., Ransil, J. B., Liu, Z., Hori, A., Holmes, G. L., DeLaCalle, S., Elmquist, J. & Herzog, A. G. (2000) Lateral Asymetry in Activation of Hipotalamic Neurons with Unilateral Amygdaloid Seizures. *Epilepsia* 41(1), 34-40.
  181. Simopoulos, A.P., Leaf A., Salem N.,(1999), Workshop on the Essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids, en *Journal of The American College of Nutrition*; 18 (5): 487-489, New York.
  182. Schuchmann, S., Schmitz, D., Rivera, C., Vanhatalo, S., Salmen, B., Mackie, K., Sipila, T., Voipio, J., & Kaila, K. (2006). Experimental febrile seizures are precipitated by a hypertermia- induced respiratory alkalosis. *Nature Medicine* 12(7), 817-823.
  183. Schlanger, S. Shinitsky M., Yam D., (2002).Diet enriched with Omega-3 acids Alleviates convulsion syntoms in epilepsy patients, *Epilepsia*, 43(1): 103-104.
  184. Sokol, DK, Demyer WE, Edwards-Brown M, Sanders S, Garg B. From swelling to sclerosis: acute change in mesial hippocampus after prolonged febrile seizure.
  185. Song, J. H., & Miyazawa (2001) Enhanced levels of n-3 fatty acids in membrane phospolipids induce lipid peroxidation in rats fed dietary docosahecanoic acid oil. *Atherosclerosis*, 155(1), 9-18.
  186. Spencer R.L., Hrubby V. J., Burks T. F. (1988). Body temperature response profiles for selective  $\mu$  delta and kappa opioid agonist in restrained and unrestrained rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 92-101.
  187. Sperber, E. F., Veliskowa, J., Germano, I. M., Friedman, L. K., Moshe, S. L. (1992). Age-dependent vulnerability to seizures *Advances in Neurology* 79, 161-169.
  188. Spirer, Z. K., Finkelstein A., Jurgenson U., (1994), Prevention of febrile seizures by

- dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acids *Medical Hypotheses* 43(1), 43-45.
189. Sprince H., Parker C. M., Josephs J. A., Magazino, J.,(1969) Convulsant activity of homocysteine and other short-chain mercapto acids: Protection therefrom. *Annals New York Academy Sciences* 166: 323-325.
  190. Stafstrom, C. E., Chronopoulos, A., Thurber, S. (1993). *Age Dependent Cognitive and Behavioral Deficit After Kainic Acid Seizures. Epilepsia*, 34: 420-432.
  191. Stillwell, W., Shaikh R. S., Zerouga M., Siddiqui R., Wassall R. S.(2005) Docosahexanoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts, *Reproduction Nutrition and Development* , 45,559-579.
  192. Swanson L. W., Petrovich G. D., (1998) What is the Amygdala? *Trends in Neurosciences* 21: 323-331.
  193. Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E. (2002) Influence of dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat *Behavioral Brain Research* 131, 193-203.
  194. Takka R., Paako E., Pyhtinen J., Uhari M., Rantala H. (2003) Febrile seizures and mesial temporal sclerosis : no association in a long-term follow-up study. *Neurology* 60(2): 215-218.
  195. Tatcher, R. W., Krause, P.J. & Hrybyk, M. (1986). Cortico-cortical associations and EEG coherence: a two-compartmental model (Electroencephalography and Clinical Neurophysiology 64 (2), 123-143.
  196. Toth, Z., Yan, X., Haftoglou, S., Ribak E. Ch., Baram T. Z. (1998) Seizure-Induced Neuronal Injury: Vulnerability to Febrile Seizures in an Immature Rat Model. *Journal of Neuroscience* 18(11), 4285-4294.
  197. Turner N., Else P. L., Hulbert A. J. (2003) Docosahexanoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90(11): 521-530.
  198. Valenzuela, A., Nieto S., (2001), Acido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil, *en Revista Medica de Chile*, 129: 1203-1211, Santiago.
  199. Valenzuela A., Nieto S., Sanheunza J., Zañartu P. (2003) Supplementation of female rats with alpha linolenic acid (LNA) or Docosahexanoic acid (DHA) produces similar accretion of DHA in the brain of newborn pups, allowing a better discriminatory score at the Skinner test box for DHA supplemented animals. (Abstract) *25th World Congreso an Exhibition of Internacional Society for Fat Research*. Bordeaux, Francia, 12-15 octubre.
  200. Villegas P. R., Análisis comparativo post-mortem de la fluidéz de membrana y estrés oxidativo en corteza prefrontal, parietal e hipocampo de pacientes con diagnóstico de Alzheimer en la unidad médica de alta especialidad IMSS de agosto del 2004 a mayo del 2005, *en Universidad de Guadalajara*, Tesis de Licenciatura.
  201. Vespa P. M., Miller C., McArthur D., Eliseo M., Etchepare M., Hirt D., Gleen T. C., Martin N., Hovda D. (2007) Nonconvulsive electrographic seizures after traumatic brain injury results in a delayed, prolonged increase in intracerebral pressure and metabolic crisis. *Critical Care Medical* 35(12): 2830-2836.
  202. Viviani B., Bartesaghi S., Gardoni, F., Vezzani A., Behrens, M.M., Bartfai T., Binaglia M., Corsini E., DiLuca M., Galli C. L., Marinovich M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptors-mediated intracellular calcium

- increase through activation of SER family of kinases. *J. Neurosci.* 23 (25): 8692-8700.
203. Voskuyl, R. A., Vreugdenhil M., Kang J. X., Leaf A. (1998) Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using cortical stimulation model *European Journal of Pharmacology* 12, 341 (2-3), 145-152.
  204. Vega-López, S., Aussman, M. L., Jalbert, M. S., Erkkila, T. A., Licktenstein, H., A. (2005) palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 84, 54-62.
  205. Valentine C. R., Valentine D. L. (2004) Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Progress in Lipid research* 43: 383-402.
  206. Von Schacky C., Kiefl R., Broekman M. J., Kaminsky E. E.(1993) Dietary n-3 fatty acids accelerate catabolism of leukotriene B4 in human granulocytes, *Biochemical Biophysic Acta* 1166: 20-24.
  207. Waismann R., Fenwick P. B., Wilson G. D., Hewett T. D., Lumsden J. (2003) EEG response to visual erotic stimuli in men with normal and paraphilic interest. 32(2): 135-144.
  208. Wendling, F., Bartolomei F., Bellanger J.J., Bourien J., & Chauvel P. (2003) Epileptic fast intracerebral EEG activity: evidence for spatial decorrelation at seizure onset. *Brain*, 126, 1449-1459.
  209. White, P. D., (1995) Essential Fatty Acids in Medicine Veterinary (1985) Bayer AG.S.: *Business Group Animal Health, Supplement.*, 51368, Leverkusen, Germany
  210. Williams, A. J., Lu, M. X., Slusher, B., & Tortella, F. C.(2001) Electroencephalogram Analysis and Neuroprotective Profile of N-Acetylated- $\alpha$ Linked Acid Dipeptidase Inhibitor, GP15232, in Normal and Brain.Injured Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299(1), 48-56.
  211. Wu, A., Molteni R., Ying, Z. & Gomez –Pinilla F., (2003), A Saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor., *Neuroscience*, 19(2), 365-375.
  212. Wu, A. & Gomez Pinilla (2004) Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Neurotrauma*, 21(10), 1457-167.
  213. Xiao, Y., Li X. (1999) Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsivant stimulation. *Brain Research*. 30; 846(1), 112-121.
  214. Yehuda, S. , D.I. Mostofsky (1993) Cicardian effects of beta- endorfin, melatonin, DSIP and amphetamine on pentylenetetrazol induced seizures, *Peptides*. 14 2003.
  215. Yehuda, S. Rabinovitz e., Mostofsky D. L. (1999). Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive function. *Journal of Neuroscience Research*, 56, 565-570.
  216. Yehuda S., Carasso L. R., Motofsky I. D. (1994) Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. *European journal of Pharmacology* 254:193-198.
  217. Yilmazer-Hanke, DM, Faber-Zuschratter H, Blumcke I, Bickel M, Becker A, Mawrin C, Schramm J.(2006) Axo-somatic inhibition of projection neurons in the

- lateral nucleus of amygdala in human temporal lobe epilepsy: an ultrastructural study.** *Trends in Molecular Medicine.* 12(8), 343-4.
218. **Yilmaz I., Adiguzel E., Akdogan I., Kaya E., Hatip-Al-Khatib I. (2006) Effects of second generation tetracyclines on penicillin-epilepsy-induced hippocampal neuronal loss and motor incoordination in rats.** *Life Sciences* 79(8):784-790.
219. **Young, CH., Gean P. W., Chiou L. CH., & Shen Y.Z., (2000) Docosahexanoic Acid Inhibits Synaptic Transmission and Epileptiform Activity in the rat Hippocampus** *Synapse*, 37, 90-94.
220. **Zhang, D.X., Bertram, E. H. (2002) Midline Thalamic region: widespread excitatory inputs to the entorhinal cortex and amygdala.** *Journal of Neuroscience* 22, 3277-3284.

*En todas las fases del presente trabajo se utilizó como reactivo aceite de pescado (proporcionado por la Zona Diet, México; Omega Dr Sears®), por lo que por este medio, la Universidad de Guadalajara a través del Instituto de Neurociencias agradece a la empresa Zona Diet, México el proporcionarnos un total de 8 frascos de Omega RX ultra-refined fish oil.*

## VIII. APENDICE

### 1. Actividad eléctrica cerebral

A nivel del sistema nervioso central, las neuronas de la corteza cerebral emiten de forma continúa y espontánea una actividad eléctrica de cierto voltaje y amplitud, la cual se conoce como actividad eléctrica cerebral (AEC), cuando es posible realizar un registro de ésta, se utiliza un polígrafo que es un amplificador de señales eléctricas con filtros especiales con los cuales se seleccionan las frecuencias que se van a registrar y a graficar mediante un dispositivo especial, lo cual da como resultado el electroencefalograma (EEG).

El EEG como lo llamó Hans Berger en 1929 es el registro de la actividad eléctrica cerebral en forma de onda sinusoidal. Dicha onda es captada por los electrodos colocados ya sea en la superficie del cuero cabelludo en los seres humanos, o en el caso de utilizar animales de laboratorio se colocan electrodos directamente implantados en la superficie cortical y/o diversas estructuras dentro del sistema nervioso central (SNC), la onda puede ser graficada y cuantificada por medio de un sistema analógico- digital.

## ***2. Características del EEG***

Desde los primeros registros realizados, los investigadores se percataron de que el cerebro está continuamente en actividad, la actividad electroencefalográfica es dinámica y es el resultado de una multitud de factores como: el estado de conciencia, el nivel de activación, las estradas sensoriales, las aplicaciones de estímulos, la madurez del SNC, la salud y la patología cerebral, y la edad entre otros (Arce, 1993).

El EEG se ha dividido en cuatro bandas principales, de acuerdo a su morfología, frecuencia, reactividad y topografía, para así facilitar su estudio: delta, theta, alfa y beta.

El ritmo delta con frecuencias de 1.5 a 3.5 Hz (ciclos por segundo) y una amplitud entre 100 y 300  $\mu\text{V}$ , constituye la actividad dominante durante los dos primeros años de vida en el ser humano y es característico del sueño profundo en las fases III y IV, se manifiesta también, en casos de lesión o daño cerebral (Corsi, 1983; Arce, 1983; Fernandez y González, 2001).

Otra frecuencia que se ha descrito y cuyo rango se encuentra entre los 4 y los 7.5 Hz, con una amplitud entre los 50 y 75  $\mu\text{V}$  durante el sueño es la banda theta. Dicha banda se observa fundamentalmente en la infancia y decrece de manera progresiva con la edad. Este ritmo también se ha encontrado en casos de patología cerebral (Corsi, 1983; Arce, 1993; Fernández y González, 2001).

El ritmo beta es un ritmo que aparece preferentemente en zonas anteriores de la corteza cerebral. Este ritmo es característico de los adultos en estado de vigilia y se ha relacionado con el alertamiento y la reacción de orientación ante estímulos externos. Generalmente, el ritmo beta tiene una amplitud de 30  $\mu\text{V}$  y abarca un rango de frecuencias entre los 13 y 30 Hz, aunque en ocasiones puede alcanzar los 50 Hz, en cuyo caso reciben el nombre de actividad Gamma.

## ***3. Análisis del EEG***

El análisis del EEG se ha registrado a través de la inspección visual y de métodos cuantitativos digitales. Los análisis que se usan más comúnmente para estos métodos cuantitativos son la Transformada rápida de Fourier (TRF) y los análisis de Coherencia y Correlación.

#### ***4. Transformada de Fourier***

Es un método matemático de análisis de señal eléctrica de señal eléctrica, cuyo objetivo es dividir la señal para obtener el valor de amplitud y frecuencia del EEG, ya sea de forma aislada, o de las frecuencias agrupadas en bandas y así obtener los denominados parámetros espectrales; entre los que se encuentran la potencia absoluta (PA) y la potencia relativa (PR).

La PA indica la cantidad de energía de las señales eléctricas que existe en una zona del cerebro en un momento dado. Y la PR se refiere a la proporción de PA con que contribuyen las diferentes bandas o frecuencias a la potencia total del espectro (Corsi, 1983; Arce, 1993; Guevara, 1995; Fernández y González, 2001).

#### ***5. Análisis de Correlación***

Al igual que el análisis de coherencia, el análisis de correlación se ha empleado para establecer una posible relación funcional entre diferentes regiones del cerebro, sólo que en lugar de tomar en consideración la estabilidad de las señales en el tiempo, resalta la relación de fase entre las señales electroencefálicas de dos áreas (Shaw, 1984). Para el cálculo de la correlación entre la actividad eléctrica de áreas corticales se usa el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson, que se ubica entre los índices que tienen mayor potencia estadística para encontrar posibles relaciones de variables, y se aplica siempre que se tengan dos variables continuas cuya relación sea lineal y de las que se hayan obtenido puntuaciones pares independientes.

La ventaja de utilizar análisis de correlación sobre el análisis de coherencia es que, entre otras cosas, permite conocer el sentido de la relación entre las señales a través del signo, aspecto que se pierde en la coherencia, y no depende del valor de la potencia (Guevara, 1995).

#### ***6. Análisis espectral***

Actualmente se han desarrollado técnicas digitales para el análisis de señales bioeléctricas, con las cuales se obtienen los espectros de amplitudes, fases y frecuencias, una de las técnicas más utilizada es el análisis de la actividad eléctrica cerebral empleando la Transformada Rápida de Fourier (TRF), que permite separar una señal de EEG o ECoG en sus componentes de frecuencia.

Es importante destacar que la TRF toma en consideración que la actividad eléctrica cerebral es un patrón irregular de señales eléctricas que varían en una escala continua, sin separar el comportamiento en estados discretos, lo cual supone importantes ventajas durante los registros continuos de la actividad eléctrica cerebral (Grazing y Szeto, 1992).

### ***7. Correlación y coherencia electroencefalográficas***

La similitud entre dos señales de actividad eléctrica espontánea (EEG, ECoG) así como las relaciones funcionales entre dos regiones cerebrales pueden ser estudiadas por medio de análisis de coherencia (Coh) o correlación ( $r$ ) entre las señales generadas en dos estructuras o regiones cerebrales diferentes, ya que estos análisis consideran la relación de fase existente entre las señales eléctricas de las regiones que se comparan (Shaw y cols., 1977; Shaw, 1984).

Es muy común que se utilicen los términos de correlación y coherencia como sinónimos, sin embargo, existen diferencias importantes en los procedimientos que se siguen para su cálculo y en los resultados que se obtienen de ambos. La Coh se calcula a partir del espectro cruzado de potencia y considera tanto las diferencias como las similitudes entre las frecuencias y la amplitud (o voltaje), relacionadas con la estabilidad de la señal entre dos canales o fuentes, así que si éstas se modifican al mismo tiempo, pero siguen siendo iguales entre sí, entonces no hay cambio en la Coh, si por otro lado, al modificarse las señales se produce un cambio en relación de fase o de amplitud entre ambas, el índice de Coh indica un cambio en el comportamiento de las señales estudiadas. La Coh no proporciona información directa de la verdadera relación con respecto a la potencia asimétrica y la relación de fase.

En tanto, la correlación considera tanto la relación de fase como la polaridad entre las dos señales que se están analizando, sin tomar en cuenta la amplitud o voltaje de la señal (basta con que ésta no sea cero) y permite determinar el grado de semejanza entre dos señales eléctricas durante un periodo de tiempo (semejanza morfológica) (Guevara, 1995).

Los resultados que se obtienen al aplicar ambos análisis son muy similares, es decir el grado de comparación es muy alto, al menos, así se ha observado bajo condiciones fisiológicas normales. Son considerados como equivalentes ya que ambos evalúan el grado de similitud entre dos señales (Guevara y Corsi- Cabrera, 1996).

### ***8. Aplicación de los análisis de coherencia y correlación***

La mayoría de los autores emplean los análisis de la Coh del EEG como una medida del grado en el cual las señales (en una banda de frecuencias dada) medidas en dos distintas localizaciones del cráneo están linealmente relacionadas unas con otras, donde una señal puede estar retrasada con respecto a la otra. Una Coh alta (cercana a 1), indica que las dos regiones están linealmente asociadas a través de conexiones anatómicas ya sean directas o indirectas, mientras una baja Coh (cercana a 0) indica que las dos regiones no están linealmente relacionadas (Fletcher y cols., 1997). Este análisis se ha empleado para explicar las diferencias en conectividad entre los hemisferios derecho e izquierdo y las cortezas frontal y occipital, así se ha demostrado, en el humano, una Coh del EEG relativamente más alta entre las derivaciones inter e intrahemisféricas (Thatcher, 1995). Esta información se ha considerado como una evidencia de las conexiones funcionales y estructurales de la red neuronal subyacente tanto en la corteza como en estructuras subcorticales, involucrando tanto conexiones axonales cortas como a la larga distancia (Thatcher y cols., 1986). Por otro lado, se ha empleado para determinar el grado de deterioro que sufre la actividad eléctrica cerebral debido a traumatismos o lesiones (Thatcher y cols., 1989; Harmony, y cols., 1996), alteraciones en los índices cognoscitivos producidas por diversas enfermedades, como la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH, causante del SIDA) (Fletcher y cols., 1997).

Los análisis de  $r$ , por su parte, se han empleado para estudiar los mecanismos de generación de actividad eléctrica cerebral, analizando las relaciones entre las unidades de descarga y la propia actividad eléctrica cerebral, analizando las relaciones entre las unidades de descarga y la propia actividad eléctrica, así como entender las relaciones existentes entre la corteza y estructuras subcorticales. El análisis de  $r$  ha sido de gran utilidad cuando se requiere conocer el grado de diferenciación funcional al comparar la actividad eléctrica de dos regiones, una  $r$  alta permite inferir una organización funcional más homogénea entre las dos regiones, una  $r$  alta permite

inferir una organización funcional más homogénea entre las dos regiones, mientras que una  $r$  menor indicaría una mayor diferenciación funcional entre ambas regiones (Shaw y cols., 1977; Shaw, 1984). Así, este análisis ha permitido demostrar que existe dimorfismo sexual en la organización cortical, en el macho se ha observado una mayor especialización hemisférica, en tanto en la hembra es evidente una representación bilateral, lo que indica una menor diferenciación funcional interhemisférica en este género (Corsi. Cabrera y cols., 1989; Juárez y Corsi-Cabrera, 1995). Asimismo, se ha observado que la  $r$  inter e intrahemisférica varían de acuerdo al estado de vigilancia durante el ciclo de sueño vigilia, mostrando una diferenciación cortical funcional (Guevara y cols., 1995; Corsi-Cabrera y cols., 1996).

### **9. Escala de Racine**

ESCALA DE RACINI (1972)

Los cambios conductuales asociados al desarrollo del kindling eléctrico o químico en la rata consisten en las siguientes fases

Fases	Cambios motores
I	Guiño del ojo ipsilateral al sitio de estimulación
II	Fase I, más movimientos de cabeza y masticación
III	Fase II, más mioclonias de miembros anteriores
IV	Fase III, más postura de canguro
V	Fase IV más pérdida del tono postural y crisis convulsiva generalizada