Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: BIOFARMACÉUTICA

T E S I S

EFECTO DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO CON 4-AMINOPIRIDINA EN CEREBRO DE RATA ADULTA.

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PR E S E NT A

L E Ó N I R Á N R A Z O J U Á R E Z

MATRÍCULA: 208386012

COMITÉ TUTORIAL:

TUTOR: DR. MISAEL GONZÁLEZ RAMÍREZ

ASESORA EXTERNA: DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ

ASESORA INTERNA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS

MÉXICO, D.F. FEBRERO DE 2013

EFECTO DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO CON 4-AMINOPIRIDINA EN CEREBRO DE RATA ADULTA.

Vo.Bo. DEL COMITÉ TUTORAL:

TUTOR: DR. MISAEL GONZÁLEZ RAMÍREZ

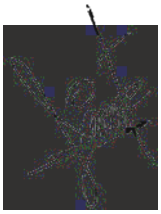
ASESORA EXTERNA: DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ

ASESORA INTERNA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS

LEÓN IRÁN RAZO JUÁREZ
MATRÍCULA: 208386012

EFECTO DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO CON 4-AMINOPIRIDINA EN CEREBRO DE RATA ADULTA.

MIEMBROS DEL JURADO:



PRESIDENTA: DRA. IRIS ANGÉLICA FERIA ROMERO.

VOCAL: DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE.

SECRETARIA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS.

RESUMEN.

No existen informes en la literatura que muestren el efecto de los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia (CEM-EBF) sobre la actividad enzimática antioxidante, por lo que este estudio propone a este tratamiento como una terapia alternativa que potencialmente puede reducir el estrés oxidativo generado en padecimientos como la epilepsia. En este trabajo el tratamiento con los CEM-EBF a 120 Hz se indujeron en una bobina solenoide y se aplicó a ratas Wistar machos de 220 a 250 g de peso corporal por 2h diarias durante 7 días bajo condiciones de laboratorio controladas, después se administró el fármaco 4AP (4 mg/kg) para inducir convulsiones epilépticas a 1, 24 y 72h respectivamente. Los animales se sacrificaron por decapitación de acuerdo a la norma de regulación para animales de experimentación de la NOM-062-ZOO-1999, con el fin de evitar el sufrimiento innecesario a los animales; se disecaron las regiones cerebrales: amígdala, hipocampo y corteza cerebral para cuantificar la actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión s-transferasa (GST); así como el nivel de lipoperoxidación por medio de la concentración de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) presente en las muestras, estos últimos son hidroperóxidos que se generan durante el estrés oxidativo, y se relacionan con el daño celular y de tejidos. Nuestros resultados muestran que la amígdala presentó un incremento significativo ($p<0.05$; $p<0.01$) en la actividad enzimática de SOD y GST ($p<0.05$; $p<0.01$) en los diferentes tratamientos, mientras que la actividad de CAT disminuyó significativamente ($p<0.01$) a 1h y 72h ($p<0.05$); en el hipocampo la actividad de la GST disminuyó significativamente ($p<0.05$) a las 24 y 72h, pero CAT solo a 1h ($p<0.05$); en la corteza cerebral la actividad de SOD disminuyó significativamente ($p<0.05$; $p<0.01$) a las 24 y 72h, la GST disminuyó significativamente ($p<0.05$) solo a 72h y con respecto a la CAT los CEM-EBF parecen no tener influencia ya que no modifican su actividad a los diferentes tiempos. En la amígdala la concentración de hidroperóxidos disminuyó significativamente ($p<0.01$) en el tratamiento de 72h indicando menor daño neuronal; en el hipocampo disminuyó significativamente ($p<0.05$) a las 72h; mientras que en la corteza incrementó significativamente ($p<0.05$) lo que indica que fue la región con mayor daño celular. Nuestros datos sugieren que la aplicación de los CEM-EBF inducen un efecto protector en la región cerebral amígdala.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo de investigación fue un proyecto financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social por medio de la Coordinación de Investigación en Salud, realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas (UIMEN) del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento durante la realización de mis estudios de posgrado. Número de becario: 220243.

Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada durante mi estancia de estudios de posgrado en el hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (Número de matrícula 99094898 con folio: 2010126).

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Sistemas Biológicos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis PADRES, Marisela Juárez y Ramiro Razo: Para ustedes mis viejos con todo mi amor y respeto. Muchas gracias por su ejemplo de trabajo y lucha ante la vida, por ayudarme a ser cada día mejor persona, por ese amor, cariño y apoyo incondicional que sin duda han dejado huella en mi al sentirme muy orgulloso de ustedes mis queridos padres.

A mis HERMANOS: Muchas gracias por su cariño y apoyo, que aunque siempre lejos de ustedes cada día los llevo en mi corazón.

Isabel: Muchas gracias por el amor y cariño incondicional, por compartir conmigo bellos momentos, así como el gusto por la ciencia.

Dr. Misael González: Por su tiempo, paciencia y dedicación brindados, por compartir conmigo su vasta experiencia y conocimiento, contribuyendo con ello en gran medida a mi formación profesional. Es usted una excelente persona.

Dra. Sandra Orozco: Por el tiempo dedicado y compartir conmigo su vasta experiencia y conocimientos.

Dra. Marisa Cabeza: Le agradezco incondicionalmente su paciencia, apoyo y experiencia brindada hacia mi formación profesional, como en la realización del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio (Angélica, David, Karina, Miguel, Rafa, Rosaurora y Vini). Gracias a todos por su apoyo y consejos, fue muy grato para mí el convivir y compartir con todos ustedes momentos muy agradables tanto profesionales como personales.

ÍNDICE **PÁG.**

1. INTRODUCCIÓN 8

2. ANTECEDENTES 9

3. MARCO TEÓRICO 9

3.1. Epilepsia 9

3.2. Modelos animales de Epilepsia 11

3.3. Campos Electromagnéticos de Extrema Baja Frecuencia (CEM-EBF) 13

3.4. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) 16

3.5. Sistema Antioxidante Endógeno 20

3.6. Lipoperoxidación celular 27

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 30

5. HIPÓTESIS 31

6. OBJETIVO GENERAL 31

7. OBJETIVOS PARTICULARES 31

8. MATERIALES Y MÉTODOS 32

9. RESULTADOS 35

9.1.1. Actividad enzimática de SOD (U/mL) 35

9.2.1. Actividad enzimática de CAT (nmol/min/mL) 38

9.3.1. Actividad enzimática de GST (nmol/min/mL) 39

9.4.1. Concentración de hidroperóxidos (μM) 42

10. DISCUSIÓN 46

11. CONCLUSIÓN 50

12. REFERENCIAS 51

13. ANEXOS 63

1. INTRODUCCIÓN.

Los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia (CEM-EBF) son radiaciones no ionizantes de frecuencias muy bajas y longitudes de onda relativamente largas, que van desde los 0 a 300 Hz del espectro electromagnético, estas fueron generadas en una bobina solenoide que al pasar corriente eléctrica se genera un campo magnético uniforme. Estudios realizados por Anninos y Sandyk han reportado que los CEM-EBF atenúan las crisis epilépticas en pacientes con epilepsia; así como en animales a los que se les induce crisis con el fármaco pentilentetrazol (PTZ) o crisis parciales crónicas por estímulos eléctricos subepilépticos (Ossenkopp y Cain, 1991). La epilepsia es un problema de salud pública ya que afecta aproximadamente a 50 millones de personas a nivel mundial, en México existen aproximadamente 2 millones de personas con este padecimiento. La epilepsia se define como un síndrome recurrente y paroxístico de la función cerebral de origen multifactorial que se caracteriza por presentar crisis, que es un cambio en la conducta a consecuencia de las descargas sincrónicas y rítmicas de la población de neuronas hiperexcitadas del sistema nervioso central (SNC) (McNamara, 1994), región conocida como foco epiléptico o zona epileptogénica (Engel, 1989). Se ha descrito que las crisis epilépticas producen estrés oxidativo en las neuronas (Won-Hee y cols., 2008).Para el tratamiento de la epilepsia se ha recurrido al uso de la medicina alópata; sin embargo existen pacientes fármaco-resistentes aproximadamente un 30-35% (Kwan y cols., 2010), donde la única opción de tratamiento es la resección quirúrgica, muchas veces con efectos secundarios por ser un método invasivo; así como la estimulación del nervio vago. Existen diversos estudios que relacionan al estrés oxidativo, un sistema antioxidante endógeno poco eficaz y la disfunción mitocondrial como factores para el desarrollo de la epilepsia (Rodríguez y cols., 2001; Dorado y cols., 2003). Por tal motivo, la regulación del estrés oxidativo mediante el uso de los CEM-EBF como método de terapia alternativa, podría ser un método muy simple y eficaz como tratamiento y/o prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como en la epilepsia, a través de la regulación de la actividad del sistema antioxidante endógeno que se lleva a cabo por enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión s-transferasa (GST); responsables de la metabolización de los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO), evitando con ello el daño celular por el proceso de lipoperoxidación.

2. ANTECEDENTES.

Existe controversia acerca del efecto que producen los CEM-EBF, tanto en humanos como en animales de experimentación. Por una parte se ha descrito que la exposición a los CEM-EBF es inocua para la salud humana, debido a que estos niveles bajos de energía no afectan la tasa metabólica del cuerpo humano (Brocklehurst y McLauchlan, 1996; Habash y cols., 2003). Sin embargo, otros estudios demostraron que la exposición a los CEM-EBF provocan estrés oxidativo tanto en los individuos como en cultivos *in vitro* (Won-Hee y cols., 2008; Juutilainen, 2003).Con respecto al uso de CEM-EBF como tratamiento antiepiléptico, se ha reportado una atenuación de las crisis epilépticas en pacientes con este padecimiento (Anninos y cols., 1991; Sandyk y Anninos, 1992) y en modelos animales, a los que se les inducen crisis con el fármaco pentilentetrazol (PTZ) o crisis parciales crónicas por estímulos eléctricos subepilépticos (kindled) (Ossenkopp y Cain, 1991; Baudry y Bi, 2001). Además, se ha reportado que el uso de los CEM-EBF inducen neurogénesis en la zona subventricular, posterior a la lesión nigroestriatal (Arias y cols., 2004), y producen una diferenciación neuronal de las células cromafines, que son células neuroendocrinas que se encuentran en la médula adrenal in vitro (Feria y cols., 1998). Así mismo existe evidencia que muestra un efecto protector contra las crisis inducidas por diferentes fármacos (Anninos y cols., 1991; Ossenkopp y Cain, 1991; Sandyk y Anninos, 1992). Datos previos a este trabajo realizados en nuestro laboratorio demostraron que las CEM-EBF disminuyen la latencia y el número de crisis en un modelo con actividad convulsiva inducida por el fármaco 4AP. Es por ello que los CEM-EBF emergen como una terapia alternativa potencial que puede ser utilizada como tratamiento coadyuvante y/o preventivo de la epilepsia, a la que se ha relacionada directamente con el estrés oxidativo, específicamente de las especies reactivas de oxigeno (ERO) (Won-Hee y cols., 2008); además de ser un método no invasivo, eficiente y simple para el paciente.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Epilepsia.

La epilepsia se define como un síndrome de origen multifactorial que involucra a diferentes sistemas de neurotransmisión. Se caracteriza por la presencia de una alteración

del sistema nervioso central (SNC) que se asocia a un desequilibrio entre las sinapsis excitatoria, en las que el neurotransmisor predominante es el glutamato, e inhibitoria, llevada a cabo por el neurotransmisor ácido gamma amino butírico (GABA), a favor de las excitatorias lo que provoca descargas hipersincrónicas y por lo tanto crisis epilépticas (Rubio, 1997).

La epilepsia afecta aproximadamente de 40 a 50 millones de personas a nivel mundial por lo que se le considera un problema de salud pública con una prevalencia del 0.5% al 1%,es decir 7/1000 habitantes (Bell y Sander, 2001; Löscher y Potschka, 2002). En México, la prevalencia en los centros del Programa Prioritario de Epilepsia (PPE) es de11 a 20 por cada 1000 habitantes (PPE, 2004).Un 6% de la población ha sufrido un episodio de convulsión aislada durante su vida; más del 90% de los epilépticos sufren crisis generalizadas, tónico-clónicas, y muchos sufren de múltiples formas de la enfermedad (Eun y cols., 2011).Por otro lado la trascendencia de este problema de salud es notoria, ya que afecta a toda la sociedad considerando que la epilepsia es un padecimiento crónico, con alta morbilidad y baja mortalidad. La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) representa el 40% de todos los casos de epilepsia y se genera predominantemente en estructuras límbicos mesiales, puede presentarse a cualquier edad. Las regiones del cerebro principalmente involucradas en este tipo de epilepsia son la amígdala cerebral, el hipocampo y la neocorteza temporal (Engel, 1989; 1996).

En la epilepsia se producen desorden recurrente y paroxístico de la función cerebral, caracterizada por cambios conductuales y electrofisiológicos, causados por una descarga neuronal anormal, excesiva, hipersincrónica y autolimitada (Commission on Classification, 1989; Avanzini, 2003). La epilepsia se caracteriza por presentar crisis, que es un cambio breve en la conducta causada por una descarga sincrónica y rítmica de una población de neuronas hiperexcitables del SNC (McNamara, 1994).Estudios en epilepsia originada en la porción mesial del lóbulo temporal, apoya el hecho de que la plasticidad relacionada a la epilepsia y los cambios estructurales moleculares en canales iónicos y receptores son los posibles responsables de la progresión de la actividad epileptogénica.

Al área cerebral que electrofisiológicamente aparece como la principal fuente de descarga neuronal epiléptica se conoce como foco epiléptico. Las descargas epilépticas son de diferentes tipos: focales, cuando se originan en un sólo foco epiléptico; bilaterales e independientes, cuando se presentan en cada hemisferio cerebral; multifocales, cuando

señalan tres o más focos epilépticos y generalizada, cuando no hay un foco epiléptico definido (Engel, 1989). Las fases de una crisis epiléptica son: fase Ictal o ictus, que se refiere a la crisis epiléptica per se y se identifica por cambios conductuales y electrográficos que dependen del tipo de crisis; fase Post-ictal, que es periodo que se presenta inmediatamente después de la fase ictal y cuya duración varía desde segundos hasta días. En esta fase se presenta una depresión conductual, confusión, amnesia, analgesia y paresias (parálisis ligera o incompleta); por último la fase Interictal, es el periodo entre crisis y crisis y se caracteriza por alteraciones electroencefalográficas (EEG) tales como espigas difusas así como en la conducta (depresión y agresividad) (Engel, 1989).

3.2. Modelos animales de epilepsia.

Aún hace falta recorrer mucho camino para comprender a la epilepsia, el conocimiento hasta hoy adquirido se debe a los modelos experimentales que son capaces de reproducir el fenómeno epiléptico clínico y eléctrico. Estos modelos son esenciales en la investigación de los procesos fisiopatológicos de las crisis epilépticas y las diferentes epilepsias; éstos, generalmente, son utilizados para investigar fisiología neuronal, evaluar nuevos fármacos con potencial antiepiléptico e investigar los mecanismos básicos de la epilepsia (Fisher, 1989; Löscher y Schmidt, 1988).

Los modelos animales en epilepsia pueden dividirse en dos grandes grupos: agudos y crónicos. Para inducir la epilepsia, tanto en los modelos agudos como en los crónicos, pueden utilizarse los mismos fármacos pero en diferentes concentraciones, ya que de éstas depende el desarrollo de las crisis. En el caso de los modelos agudos, las crisis se inducen artificialmente en animales sanos mediante agentes físicos (electricidad, temperatura, sonido, luz) como por ejemplo el modelo Kindling (encendido), se utiliza para inducir modelos experimentales de crisis parciales crónicas, este modelo es particularmente útil para desencadenar crisis límbicas en ratones y gatos; kindling es el fenómeno de descargas cortas provocadas por estímulos eléctricos subepilépticos periódicos que provocan crisis motoras de severidad progresiva, una vez que se ha establecido la labilidad para los estímulos eléctricos, dura de por vida (Baudry y Bi, 2001; Tapia y Massieu, 1997) o químicos (pentilentetrazol, ácido kaínico, bicucullina, pilocarpina, picrotoxina, 4-aminopiridina, etc.); a continuación menciono algunos de ellos: Pentilentetrazol (PTZ) que es un fármaco

antagonista de los receptores GABA del SNC (Rocha y cols., 1996; Huang y cols., 2001) y como tal, disminuye el control sobre la excitabilidad neuronal bloqueando el flujo del ión Cl^- lo que induce crisis epilépticas (Löscher y cols., 1991); el ácido kaínico que es un análogo del glutamato, que cuando se aplica de forma sistemática o local induce un efecto neurotóxico a nivel del hipocampo, el cual se atribuye a una activación de receptores glutamaérgicos (Jefferys y Whilttington, 1996). Este es un modelo de epilepsia del lóbulo temporal (ELT) ya que presenta cambios semejantes a la esclerosis mesial, específica de la ELT en humanos; pilocarpina es un agonista colinérgico que al aplicarse sistémicamente en ratones o ratas induce un estado epiléptico caracterizado por crisis generalizadas, se utiliza en estudios de los efectos a largo plazo de la epileptogénesis crónica (Cavalheiro y cols., 1995; Gadelha y cols., 2010); bicucullina esta fármaco sirve como modelo en epilepsia focal aguda, es un convulsivante alcaloide, actúa bloqueando los receptores GABA-$_A$ postsinápticos induciendo crisis tónico-clónicas severas y de larga duración (Baudry y Bi, 2001).

El modelo del fármaco 4-aminopiridina (4AP) se utiliza para inducir un cuadro agudo de epilepsia, produce alteraciones estructurales en el cerebro de rata *in vivo*, estos cambios se deben a actividad ictal (convulsiones generalizadas) (Peña y Tapia, 2000; Chen y Lee, 2002; Fabene y cols., 2006). El mecanismo de acción de la 4AP no está del todo claro, sin embargo, se conoce que este fármaco ejerce su acción a través de los canales iónicos de potasio dependientes de voltaje (Kv), sobre todo cuando se encuentran abiertos por un estímulo eléctrico; al tener contacto la 4AP con las subunidades α hélice internas que constituyen al canal provoca un cambio conformacional promoviendo con ello el cierre del mismo (Fig. 1) (Armstrong y Loboda, 2001; Löscher, 2002; Xu y cols., 2008), y de esta forma facilitar el movimiento del Ca^+ al interior de la célula para con ello provoca hiperactividad neuronal(Mihály y cols., 1990) presumiblemente por el aumento en la liberación de neurotransmisores excitatorios (Rogawski y Barker, 1983; Morales y cols., 1999; Dichter y Wilcox, 1999).

Al bloquearse los canales de K^+, estos dejan de funcionar como reguladores de la excitabilidad neuronal y por ende se pierde la modulación del potencial de reposo de la membrana celular. Este bloqueo se traduce en la prolongación de los potenciales de acción durante la despolarización (Armstrong y Loboda, 2001; Solís y cols., 2008) en la cual las neuronas se sincronizan, lo que desencadena una crisis epiléptica donde ocurre una liberación de neurotransmisores como el glutamato, lo que media la respuesta sináptica

excitatoria en el SNC (Tapia y cols., 1999). Esta modificación puede conducir a una activación de los receptores de glutamato como el N-metil-D-aspartato(NMDA) y de esta forma causar una hiperexcitabilidad debido a la alta concentración de glutamato (Peña y Tapia, 2000; Arias y cols., 2002).

Por otro lado, la 4AP cuando se aplica en la neocorteza, causan crisis que pueden detectarse a través de electroencefalografía, es decir, sin presentarse los signos musculares de actividad convulsiva (Szente y Baranui, 1987; Xu y cols., 2008). Sin embargo, cuando este fármaco se administra por la vía sistémica, induce crisis tónico-clónicas (Mihály y cols., 1990), ya que la 4AP cruza la barrera hematoencefálica para ejercer su acción y se elimina del encéfalo vía riñón (Lemeignan y cols., 1984). Su acción es rápida por lo que la latencia de las crisis es relativamente corta y probablemente la actividad convulsiva se extienda a todo el cerebro anterior (Mihály y cols., 1990). Las propiedades excitatorias de este compuesto y sus derivados han sido examinados en humanos (Jones y cols., 1983; Andreani y cols., 2000). Se ha demostrado que la 4AP produce alteraciones estructurales en el cerebro de rata ya que las imágenes por resonancia magnética combinados con análisis estructurales de las regiones involucradas en la actividad convulsiva, proveyeron información acerca de que los cambios en el cerebro se deben a la actividad ictal (Szente y Baranui, 1987; Fabene y cols., 2006). La aplicación de la 4AP en animales de experimentación, específicamente en ratones produce un incremento en el flujo sanguíneo cerebral en la fascia dentada, en la neocorteza y en el diencéfalo (Mihály y cols., 2000). Además, el modelo inducido en la rata, utilizando el fármaco 4AP (4 mg/kg) como agente convulsivante es muy similar a las crisis generalizadas de epilepsia que se presentan en los humanos. Este dato indica que algunos mecanismos electrofisiológicos y bioquímicos podrían ser comunes para ambas especies (Medina y cols., 2000).

3.3. Campos Electromagnéticos de Extrema Baja Frecuencia (CEM-EBF).

Los seres vivos son estructuras bioeléctricas, es decir que toda célula viva se comporta como un dipolo debido a la diferencia de potencial a través de la membrana celular, entre -10 y -100 mV. Por otro lado la tierra se encuentra rodeada de un campo magnético estático y con manifestaciones naturales esporádicas de tormentas magnéticas de origen solar. Durante miles de años los seres vivos han estado sometidos a influencias magnéticas naturales, que probablemente tuvieron y siguen teniendo influencia sobre diversas funciones biológicas. Los

campos magnéticos (CEM) se originan por el movimiento de una carga eléctrica positiva o negativa (Miller y Schroeer, 1987). La intensidad de los CEM se mide en amperes por metro (A/m), aunque en investigación sobre campos electromagnéticos se utiliza más frecuentemente el término densidad de flujo (microteslas, μT o militeslas, mT). Al contrario de los campos eléctricos, los campos magnéticos sólo aparecen cuando se pone en marcha un aparato eléctrico y fluye la corriente; el efecto de los CEM en los sistemas biológicos está determinado en parte por la intensidad del campo y en parte por la cantidad de energía contenida en cada fotón. Según sea su energía, los CEM pueden clasificarse en radiaciones ionizantes (RI) o radiaciones no ionizantes (RNI). Para este estudio se utilizó una bobina solenoide de forma cilíndrica con alambre de cobre enrollado sobre sí que actúo como material conductor que con el paso de la corriente eléctrica a través de la bobina genero un CEM-EBF uniforme de 120 Hz. Se ha visto que cuanto más larga sea la bobina el CEM será mayormente uniforme, también que a mayor intensidad de la corriente el CEM incrementa. (Miller y Schroeer, 1987).

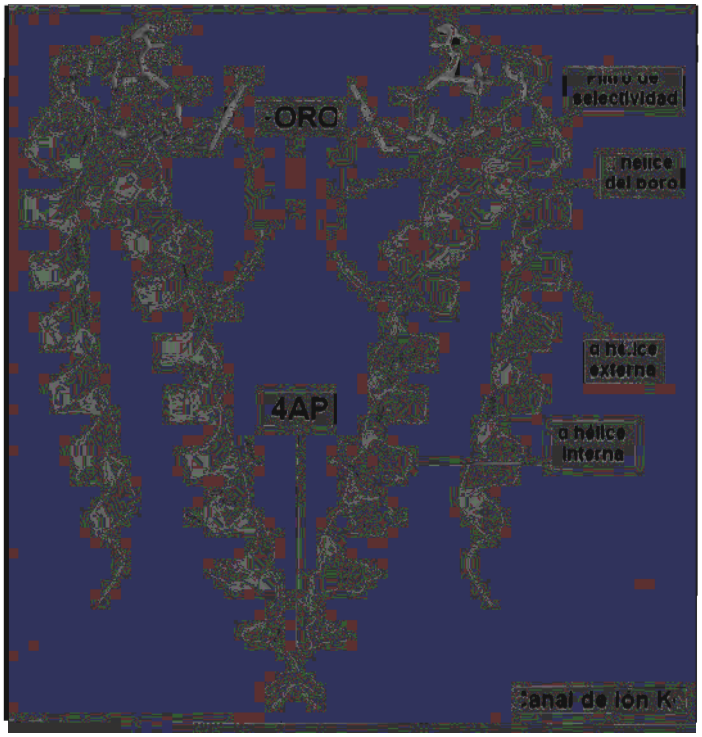


Figura 1. Canal de ión potasio dependiente de voltaje indicando el sitio de unión del fármaco 4AP a las subunidades α hélices con lo cual se da el bloqueo al canal al iónico. Tomado y modificado de Jenkinson (2006).

Los CEM-EBF son radiaciones no ionizantes de frecuencias muy bajas y longitudes de onda relativamente largas, que van desde los 0 a 300 Hz del espectro electromagnético (Fig. 2) (Prato y cols., 1995). Cualquier efecto biológico de los mismos se debe a la interacción de fuerzas sobre los elementos o moléculas que responden eléctricamente. Debido a la composición electrolítica, los seres vivos son buenos conductores de la electricidad a través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares (Adey, 1981). Existen corrientes iónicas en fluidos como la sangre, en células nerviosas y musculares que podrían ser modificadas por la aplicación de un campo magnético, además en los sistemas biológicos también existen otras moléculas magnéticamente influenciables como proteínas cargadas, neurotransmisores y moléculas magnéticas como los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Prato y cols., 1995).

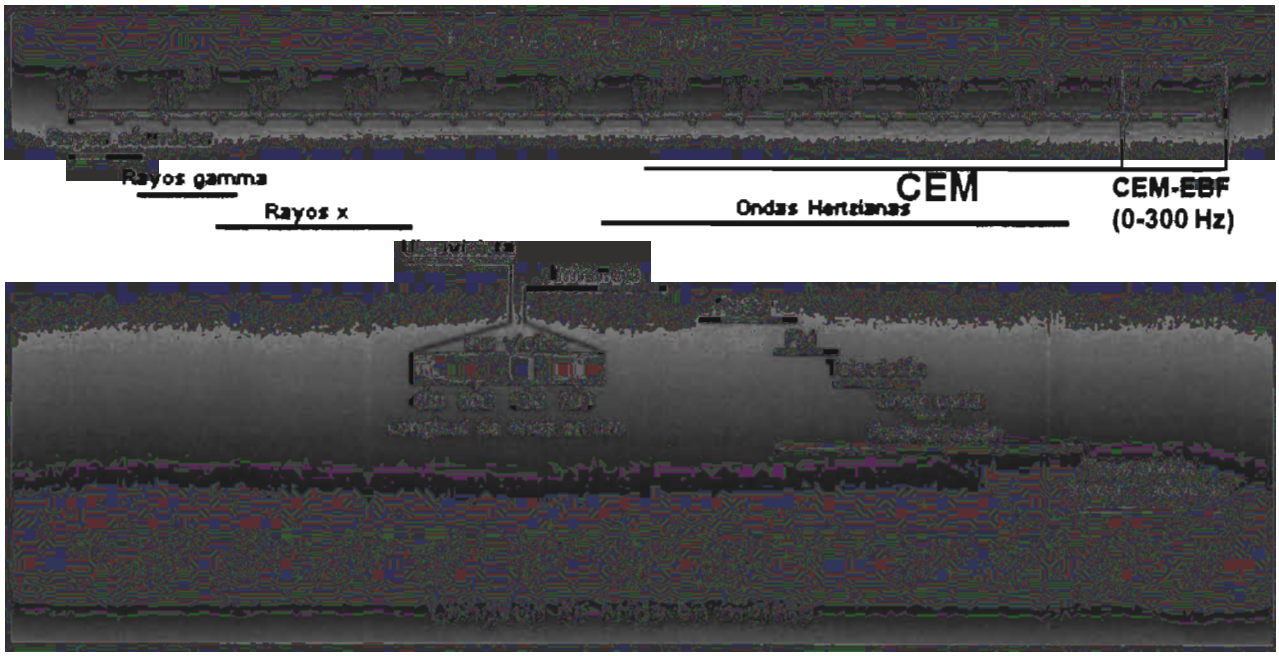


Figura 2. Espectro electromagnético en la que se observa la ubicación de los CEM-EBF. Tomado y modificado de College Physics. 6ª edición. Miller y Schroeer D (1987).

Existe evidencia que afirma que los procesos celulares pueden ser influenciados por la debilidad de los CEM-EBF; sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales actúan los CEM-EBF. Desde el punto de vista físico estudios e hipótesis sugieren que la membrana representa el principal lugar de interacción, específicamente sobre canales iónicos, siendo los de calcio los que participan más activamente; así como en

la expresión de genes específicos y vías de transducción de señales (Cleary, 1993; Adey, 1981; Goodman y cols., 1995).

Con la finalidad de poder brindar una opción más a pacientes resistentes a los fármacos, recientemente ha crecido el interés por evaluar los efectos terapéuticos de los CEM-EBFen aplicaciones médicas y clínicas (Hernández y cols., 2009); sobre todo en la epilepsia, ya que durante años solo se ha sido utilizada la medicina alópata como tratamiento para dicho padecimiento (Tabla 1), así como la estimulación eléctrica del nervio vago, estimulación transcraneal y/o cirugía (Armijo y Herranz, 2007 a y b), en algunos de los casos son métodos invasivos y con efectos secundarios para los pacientes.

3.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO).

El cerebro es rico en mitocondrias la mayor parte del oxígeno consumido por éstas es reducido a agua y oxígeno molecular (O_2), sin embargo las especies reactivas de oxígeno (ERO), se forman por la reducción secuencial del oxígeno molecular, que primero produce el radical superóxido (O_2•-), posteriormente genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y finalmente el radical hidroxilo (OH•) (Fig. 3), estas moléculas a pesar de tener una vida media biológica de microsegundos, tienen la capacidad de reaccionar con una diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular como: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Fig. 4) (Halliwell, 2006; Rodríguez y cols., 2001; Dorado y cols., 2003). A nivel de organelos, se ha observado que las mitocondrias son la fuente endógena más importante de formación de ERO sobre todo en la cadena respiratoria durante el transporte de electrones, donde se generan 4 moléculas de superóxido por cada molécula de oxígeno que entra al sistema (0.5 al 2 %) (Fig. 5), además las mitocondrias son sumamente sensibles al estrés oxidativo, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, así como en mutaciones del ADN mitocondrial (Lenaz, 1998). Otro radical libre (RL) que se forma de la reacción del radical superóxido con el óxido nítrico es el peroxinitrito (ONOO-). Algunas de estas reacciones son dependientes de la presencia de metales de transición como fierro y cobre (Vilar-Rojas y cols., 1996). Un RL es un átomo o grupo de átomos que en su estructura atómica poseen un electrón no apareado en su orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad electrónica por lo que los hace compuestos altamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas reactivas; esto ocurre al romperse un

enlace covalente en forma simétrica, ambos fragmentos retienen un electrón, y por consiguiente se convierten en un RL, una molécula puede convertirse en RL tanto por ganancia como por pérdida de electrones (Halliwell, 1989). Los RL son muy electrofílicos por lo que el daño de estos a las biomoléculas es en lugares con una alta densidad electrónica (Bellissimo y cols., 2001; Dorado y cols., 2003; Waldbaum y Patel, 2010).

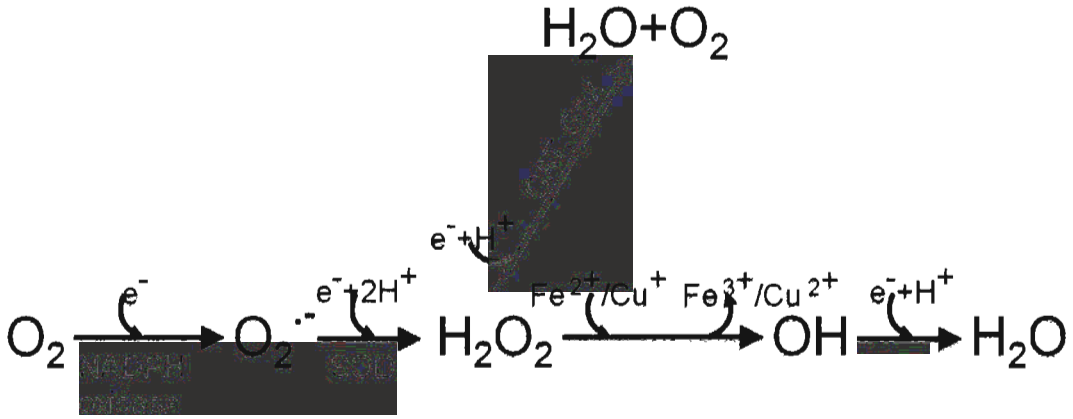


Figura 3. Excitación y reducción parial del oxígeno molecular; así como la formación deespecies reactivas de oxígeno (ERO). Anión superóxido (O_2•-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH•), así como las enzimas que metabolizan a cada molécula; así como la formación de agua (H_2O). Tomada y modificada de Mathew y Grisham (1992).

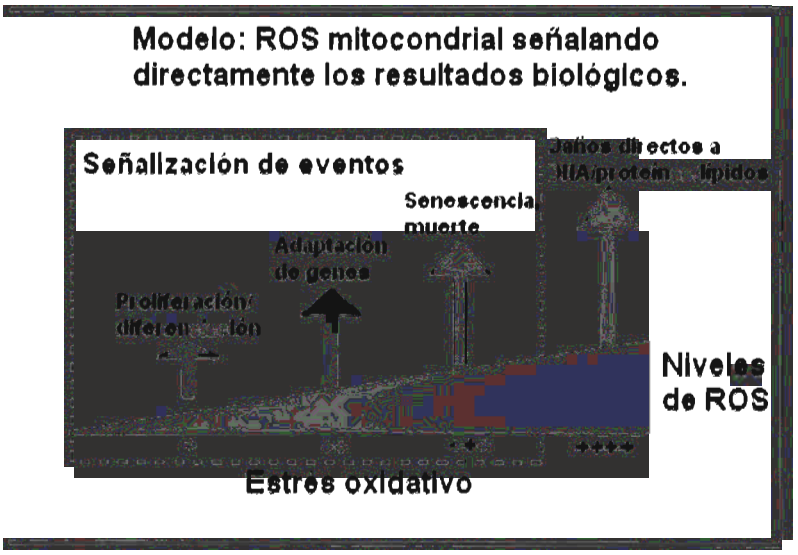


Figura 4. Importancia de los niveles basales de ERO en varios de los procesos biológicos; así como el daño a biomoléculas a causa de niveles muy altos de los mismos. Tomado de Hamanaka y Chandel (2010).

Figura 5. Cadena de transporte electrones mitocondrial como fuente principal de ERO. Los complejos mitocondriales I y II utilizan electrones donados por NADH y $FADH_2$ para ser reducidos por la coenzima Q. La coenzima Q pasa a los e^- al complejo III, de donde se transfieren al citocromo C; el complejo IV utiliza los e^- provenientes del citocromo C para reducir el oxígeno molecular en agua. La función de los complejos I, II y IV es producir un gradiente electroquímico de potencial de protones, esta energía libre es la que se utiliza para fosforilar ADP en ATP sintasa. En los complejos I, II y III es donde se produce el superóxido a través de la reducción parcial del oxígeno. El complejo I y II producen superóxido solo en la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III lo produce tanto en la matriz como en espacio intermembranal. Tomado de Hamanaka y Chandel (2010).

En condiciones fisiológicas normales, la producción basal de ERO y RL están implicadas en diferentes procesos como la inmunidad innata, proliferación y diferenciación celular, vías de señalización en la angiogénesis, reacciones bioquímicas, homeostasis de fluidos, apoptosis, pero el proceso debe ser controlado por una adecuada protección antioxidante (Fig. 5) (Nistala y cols., 2008; Hamanaka y Chandel; 2010).

La pérdida de la homeostasis en el mecanismo óxido-reducción de la célula desempeña un papel muy importante en la génesis de diferentes enfermedades como en la epilepsia, caracteriza por presentar crisis recurrentes generando estrés oxidativo celular (Reilly y Bulkley 1990; Witztum, 1993; Gadelha y cols., 2010), tanto en las neuronas como en células de la glía (Dorado y cols., 2003; Pérez y Pérez, 2000; Nistala y cols., 2008). Se ha asociado al estrés oxidativo, a la disfunción mitocondrial, así como la baja de las defensas antioxidantes como factores contribuyentes a este padecimiento (Rodríguez y cols., 2001; Dorado y cols., 2003). El estrés oxidativo ocurre entonces por un desbalance entre la producción excesiva de RL y ERO como consecuencia del metabolismo oxidativo celular y la

Fármaco antiepiléptico	Mecanismo de acción	Tipo de crisis epiléptica
Carbamazepina. (Fármaco de primera elección, tratamiento de ELT).	Bloqueo de canales de Na^+.	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas.
Fenitoína.	Bloqueo de canales de Na^+.	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas
Primidona.	Actúa sobre el sitio de unión a barbitúricos (receptor $GABA_A$).	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas.
Ácido Valproico. (Fármaco de primera elección, tratamiento ELT).	Bloqueo de canales de Na^+. Aumento de la transmisión GABAérgica.	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas, Crisis de ausencia, Crisis Mioclónicas.
Gabapentina.	Bloqueo de canales de Na^+. Aumento de la transmisión GABAérgica y otros posibles mecanismos.	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas.
Lamotrigina. (Fármaco de segunda elección, tratamiento ELT).	Bloqueo de canales de Na^+.	Crisis Parciales; Crisis de ausencia.
Fenobarbital.	Actúa sobre el sitio de unión a barbitúricos en el receptor $GABA_A$.	Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas.
Felbamato.	Bloqueo de canales de Na^+. Aumento de la transmisión GABAérgica. Antagonista de receptores NMDA.	Crisis Parciales.
Topiramato. (Fármaco de segunda elección, tratamiento ELT).	Bloqueo de canales de Na^+. Aumento de la transmisión GABAérgica.	Crisis Parciales.
Clonazepam.	Actúa sobre el sitio de unión a benzodiacepinas (receptor $GABA_A$).	Crisis ausencia; Crisis mioclónicas.
Etosuximida.	Bloqueo de canales de Ca^{2+}.	Crisis de ausencia.

Tabla 1. Principales fármacos antiepilépticos y su mecanismo de acción.

capacidad de las células para neutralizar dichas moléculas a través de su defensa antioxidante endógena rompiéndose de esta manera la homeostasis celular (Halliwell, 2007; 2006; Uttara y cols., 2009; Gadelha y cols., 2010). Las neuronas son particularmente susceptibles a los altos niveles de estrés oxidativo, además de mantener bajos niveles de algunas enzimas antioxidantes endógenas (Halliwell, 1989; Zorrilla, 2002).

El estudio del estrés oxidativo ha sido de gran interés en los últimos años, ya que la interacción de estos compuestos con moléculas orgánicas, se ha relacionado con el daño tisular y la génesis de diversas patologías, como cáncer, Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Lou Gering, cataratas, diabetes mellitus, arterosclerosis, y la epilepsia, debido a la disminución de la eficiencia del sistema antioxidante endógeno, también los antioxidantes los hay de otra naturaleza, los cuales de manera coordinada protegen al organismo de la amenaza que conlleva la presencia de estrés oxidativo que puede provocar muerte celular (Zorrilla, 2002; Torres y cols., 2004; Flora, 2007).

Un antioxidante es una sustancia que en concentraciones normales posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con los RL y neutralizar su acción oxidante. Los antioxidante como la vitamina C, betacarotenos y flavonoides, al colisionar con un ERO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un ERO débil no tóxico, la célula también cuenta con otro sistema antioxidante endógeno llevado a cabo por enzimas.

3.5. Sistema antioxidante endógeno.

La defensa de las células en contra de los RL y ERO comprende no solo la captura de los intermediarios derivados del oxígeno, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y reparación del daño; de la misma forma en condiciones normales, la concentración de ERO intracelular en la célula se encuentra por debajo de los niveles tóxicos, debido a que la célula posee un mecanismo enzimático endógeno que trabaja en secuencia y de esta forma se encarga de mantener niveles no tóxicos de ERO para la célula, este sistema antioxidante endógeno se encuentra formado principalmente por las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión s-transferasa (GST), y la glutatión peroxidasa (GPx) (Halliwell, 1997; 1999, Gadelha y cols., 2010).

Estas enzimas antioxidantes pueden formar complejos estables impidiendo de esta forma la acción catabólica de las ERO. Estos antioxidantes pueden actuar libremente en la interfase celular comportándose como potentes protectores de las células y lipoproteínas o estabilizando oxidantes lipofílicos que previenen la lipoperoxidación (Gadelha y cols., 2010). Estas enzimas actúan coordinadamente en una serie de diferentes pasos metabólicos para neutralizar a las especies reactivas del oxígeno. La reducción de un electrón de O_2 forma el anión superóxido (O_2•-) por dismutación; el O_2•- es poco reactivo pero puede provocar la liberación de Fe^{2+} de la ferritina y de proteínas ferrosulfuradas. El O_2•- por dismutación o por oxidación, es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) una reacción catalizada por la SOD. En esta reacción el H_2O_2 formado se solubiliza en los lípidos de la membrana y es capaz de difundirse a través de las mismas. El H_2O_2 a su vez se descompone por medio de una reacción catalizada por las enzimas CAT; el balance entre estas enzimas antioxidantes (SOD y CAT) es relevante para las funciones celulares y neuronales; mientras que la GPx lo es para dar paso a la formación del H_2O y O_2•y en esta forma se cierra el ciclo (Fig. 5) (Nistala y cols., 2008; Dorado y cols., 2003). Se ha observado que cuando existen altos niveles de RL también hay mayor actividad enzimática antioxidante (SOD,CAT y GPx), lo que sugiere que las células cerebrales tratan de contrarrestar la sobreproducción de ERO inducido por un episodio epiléptico. Por el contrario, la disminución en la actividad de SOD y CAT puede contribuir a la vulnerabilidad del cerebro a convulsiones inducidas por pilocarpina (Eun y cols., 2011).

Por otro lado el H_2O_2 es inestable ya que se descompone lentamente en oxígeno molecular y agua con liberación de calor. Su velocidad de descomposición puede aumentar mucho en presencia de catalizadores. Este compuesto no es una ERO, pero tiene una alta capacidad oxidante ya que al ser catalizado por el hierro o cobre (Fe^{2+}/Cu^{+} -Fe^{3+}/Cu^{2+}) mediante la reacción de Fentón (se produce al catalizar el H_2O_2 con metales de transición) generando como ya se menciono $OH^{\bullet}$ (Rai y cols., 2001). Este radical $OH^{\bullet}$ es altamente oxidante, por lo cual se ha estudiado su participación en mecanismos biológicos de degradación ya que ataca a la mayoría de los componentes celulares. Aunque el H_2O_2 es menos reactivo que O_2•- y $OH^{\bullet}$, y debido a su alta capacidad de difusión, reacciona con gran cantidad de biomoléculas e inactiva su función, por tanto es varias miles de veces más reactivo que el O_2•- y deriva fácilmente en la formación de nuevos RL al reaccionar de manera indiscriminada con los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. El O_2•- potencia la

producción de OH• ya que puede actuar como fuente de electrones para la reducción de los iones metálicos (Chance y cols., 1979).

3.5.1. Superóxido Dismutasa (SOD).

La superoxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que cataliza la reacción de dismutación de dos moléculas de O_2•- a H_2O_2 y O_2, por lo tanto forma parte del mecanismo de defensa antioxidante celular (Malstrom y cols., 1975; Imlay y Fridovich, 1991). Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato, presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. Las reacciones catalizadas por SOD son extraordinariamente rápidas, esta depende de la difusión de O_2 y la cinética de colisión con los H^+, pero se ha encontrado que el campo eléctrico de SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión (García y cols., 1997; Halliwell, 1999).

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow[\textbf{SOD}]{} H_2O_2 + O_2$$

Reacción catalítica de SOD

Es importante la presencia de SOD en el entorno extracelular ya que es crucial para la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo; SOD también parece ser importante en la prevención de las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y de Huntington (Maier y Chan, 2002). Se han identificado cinco clases de SOD que difieren una de la otra de los iones metálicos que contienen en su centro activo: unas de ellas contienen un cofactor con dos átomos metálicos (Cu/ZnSOD, Fe/MnSOD) (Halliwell, 1999). Las demás presentan cofactores mononucleares (FeSOD, MnSODo NiSOD). La reacción catalizada por estas enzimas se realiza en dos pasos, cada uno de los cuales supone la entrada en el centro activo de una molécula de O_2•-. A pesar de la carga negativa que presenta el O_2•-, la entrada está potenciada porque el propio ión metálico del centro activo genera una carga neta positiva que atrae electrostáticamente a su sustrato (Miller, 2004). SOD se encuentra en altas concentraciones en el cerebro, hígado, corazón, eritrocitos y el riñón. En las células eucariotas existen dos isoformas de la enzima: MnSOD y Cu/ZnSOD; en los seres humanos, hay tres formas de SOD: MnSOD es una enzima

tetramérica y se localiza en la mitocondria y en el espacio extracelular, contienen un ión de Mn^{3+} por subunidad. Por otra parte, la Cu/ZnSOD es una enzima dimérica de localización citoplasmática que contiene en su centro activo un ión Zn^{2+} cuyo papel es esencialmente estructural y el otro de Cu^{2+} cuya oxido/reducción es importante para la actividad catalítica de la enzima. Ambos iones metálicos se encuentran ligados a un imidazolato que es importante para la conducción de protones (Sandstrom y cols., 1994).

3.5.2. Catalasa (CAT).

La enzima CAT tiene una actividad peroxidativa es decir protegen a la célula de los efectos tóxicos del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al catalizar su descomposición a H_2O y O_2, al igual que la glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima homotetramérica en la que cada monómero contiene un grupo Fe^{3+} en su centro catalítico y NADPH o un dominio de tipo flavodoxina, cuya función es la de evitar la acumulación de una forma inactiva de Fe^{4+} de la enzima (Kirkman y cols., 1987).

$$2H_2O_2 \xrightarrow[\text{CAT}]{} 2H_2O + O_2$$

Reacción catalítica de CAT

Esta enzima presenta una baja afinidad por su sustrato pero presenta una eficiencia catalítica muy elevada, es por ello que es una excelente reductora de H_2O_2 en lugares en los que la concentración de este oxidante es elevada como los peroxisomas de células eucariotas. En los humanos, los niveles más altos de catalasa se encuentran en el hígado, los riñones y los eritrocitos, donde se cree que representan la mayor parte de la descomposición del peróxido de hidrógeno.

En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehido. Esta función se puede realizar como mono, di y tetrámeros. La actividad de CAT puede ser inhibida por el cianuro, la azida, el sulfuro, la hidroxilamina, paracetamol, bleomicina, adriamicina, bencidina y el paraquat. En la función catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2, función que solo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (Céspedes y col., 1997).

A pesar de que la CAT no es esencial para algunos tipos de células, se le puede localizar en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. En algunas especies como el humano y en la res, la CAT contiene moléculas de nicotinamida adenín dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH), una en cada subunidad y se ha visto que no existe interacción directa entre el grupo hemo y el NADPH. El NADPH puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de CAT por su propio sustrato tóxico y estabiliza a la enzima por tener un efecto sobre su conformación alostérica. Además CAT constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un papel importante evitando el estrés oxidativo (García y cols., 1997). Nivel de GSH y la actividad de la CAT en el hipocampo están involucrados en los mecanismos responsables de la eliminación de ERO durante el establecimiento de un estado epiléptico (Eun y cols., 2011).

3.5.3. Glutatión Peroxidasa (GPx).

La glutatión peroxidasa es una enzima que utiliza un residuo de cisteína con el que reducen al H_2O_2, esta enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Las glutatión peroxidasas (GPxs) son consideradas las peroxidasas más importantes ya que tienen una amplia especificidad por H_2O_2 que la enzima CAT, implica al glutatión (un tripeptido que contiene tiol, que es un cofactor de la GPx) (Brigelius, 1999; Bellissimo y cols., 2001). La GPx cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa (Bellissimo y cols., 2001).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow[\textbf{GPx}]{} GSSG + 2H_2O$$

Reacción catalítica de GPx

3.5.4. Sistema glutatión (GSH/GSSG).

El glutatión es un tripéptido, Glu-Gli-Cis que se puede encontrar ya sea en estado reducido (GSH) u oxidado (GSSG). Cuando se encuentra en su estado reducido, el grupo tiol

de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción ($H^+ + e^-$) a otras moléculas inestables, tales como las especies reactivas de oxígeno y peróxidos (Pompella, 2003). En la donación de un electrón, el glutatión mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro glutatión reactivo para formar GSSG. Esta reacción se realiza por las altas concentraciones de glutatión en las células (hasta 5 µM en el hígado). El glutatión puede ser regenerado a partir de GSSG mediante la enzima glutatión reductasa. En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG). Un aumento de la proporción GSSG/GSH se considera una señal de estrés oxidativo (Pastore y cols., 2003).

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2\,H_2O$$

Reacción de oxidación de la glutatión.

El sistema glutatión es la principal actividad no enzimática implicada en la defensa antioxidante celular; además de captar el H_2O_2 como sustrato de la GPx, también capta al $^1O_2$ y al $OH^{\bullet}$. La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de ERO (Zorrilla, 2002; Torres y cols., 2004; Halliwell, 2006).

El glutatión es una molécula que funciona como sustrato tanto en reacciones de conjugación como de reducción catalizada por la enzima glutatión s-transferasa en el citosol, los microsomas y las mitocondrias. Sin embargo, también es capaz de participar en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos, cambiando un compuesto polar por uno muy hidrosoluble dando como producto una sustancia con carácter hidrofílico generalmente inactivo con mayor facilidad de excreción, es así como elimina xenobióticos o sustancias nocivas para las células (Wilce y Parker, 1994).

3.5.5. Glutatión S-Transferasa (GST).

Las glutatión s-transferasa (GST) pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia y se agrupan en dos clases: las GST citosólicas y las GST microsomales,

asociadas a la membrana del retículo endoplasmático de células de muy diversos tejidos. Estas enzimas son muy importantes ya que participan en mecanismos de desintoxicación celular; las GST microsomales son enzimas triméricas que parecen haber evolucionado de forma independiente a las GST citosólicas (Rowe y cols., 1998).

Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. En mamíferos estás isoenzimas (GST) existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. Pueden ser clasificadas además, de acuerdo con su estructura y especificidad de sustrato en siete familias (alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta y zeta) que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico (Balcells, 2001).

Además de la función de estas enzimas, varios estudios han correlacionado niveles altos de GST con resistencia aumentada a estrés oxidativo. En células de mamíferos se ha descrito el papel de las GST en la defensa del estrés oxidativo de forma independiente a su actividad catalítica; estas enzimas pueden actuar como inhibidores de la proteína quinasa c-Jun N-terminal, manteniéndola en su forma inactiva en ausencia de estrés (Adler y cols., 1999).

Una de las teorías es que las GST pueden detoxificar algunos de los compuestos secundarios producidos por las ERO cuando éstas reaccionan con los componentes celulares por ejemplo de ello es que las GST pueden conjugar glutatión reducido GSH a compuestos reactivos como los hidroperíxidos: malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi nonenal (4-HNE), generados ambos durante la oxidación de los lípidos de las membranas celulares (Esterbauer y cols., 1991) de esta forma neutraliza sus sitios eletrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles en agua, fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos(Boyland y Chasseaud, 1969; Danielson y cols., 1987; Hubatsch y cols., 1998). Otras de las cosas que se ha observado es que las GST presentan una actividad de peroxidasa, lo que indica que pueden tener importancia para la eliminación de peróxidos (Sherratt y cols., 1997).

La glutationización consiste en la adición de glutatión (tripéptido, Glu-Gli-Cis), a través de su grupo sulfidrilo (nucleofílico), con un carbón electrofílico del xenobiótico. La reacción es catalizada por la glutatión s-transferasa y el glutatión mismo es el cofactor de alta energía. El compuesto que se forma se rompe en el riñón produciendo el derivado Cis, que se acetila

para producir un conjugado del ácido mercaptúrico que se libera a la circulación y que posteriormente el hígado actúa como el principal sitio de la conjugación del glutatión y se entrega a los riñones para su excreción en la orina (Hinchman y Ballatori, 1994). Esta reacción es importante en la destoxificación de epóxidos y peróxidos. Si esta reacción disminuye significativamente el nivel celular de glutatión, el organismo puede sufrir daños considerables debido a la lipoperoxidación o por otros tipos de agregación química (Boyland y Chasseaud, 1969; Reilly y Bulkley, 1990; Negre y cols., 2008).

3.6. Lipoperoxidación celular.

Los fosfolípidos son componentes de todas las células de mamíferos y tienen una variedad de funciones biológicas: forma la bicapa lipídica de las membranas celulares y por ende guardan la homeostasis de las células (Janero, 1990; Gluck, 2000; Negre y cols., 2008), proporcionan la integridad estructural necesaria para la función de proteínas, funciona como un deposito de energía (por ejemplo los triglicéridos) y sirven como precursores para segundos mensajeros, tales como el ácido araquidónico (AcAr), ácido docosahexaenoico (DHA), la ceramida, 1,3-diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico, y el ácido liso-fosfatídico. Los lípidos comprenden un gran número de moléculas; el metabolismo de estos lípidos puede ser de gran importancia para el sistema nervioso central ya que este sistema tiene una alta concentración de ellos. Estos lípidos son susceptibles al ataque de las ERO, la inestabilidad de las ERO y la incapacidad de penetrar las membranas de lípidos suelen proporcionar una protección eficaz contra la propagación de los daños. Sin embargo lo hacen a través de reacciones con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la bicapa lipídica, que generan hidroperóxidos lipídicos y aldehídos α, β-insaturados, por ejemplo, 4-hidroxi-2-nonenal, que son altamente electrofílicos de fácil propagación entre los compartimentos celulares y capaces de reaccionar con las proteínas, canales, enzimas, mitocondrias y ácidos nucleicos (Sano y Fukuda, 2008). Éstas reacciones en cadena son mediadas por RL que generan el proceso de oxidación de lípidos denominado lipoperoxidación; la presencia de hidroperóxidos como productos de la lipoperoxidación por estrés oxidativo, es un indicativo de daño celular como es el caso de la epilepsia (Muralikrishna y Hatcher, 2007), esta lipoperoxidación ha tratado de ser explicada como consecuencia del daño a la membrana celular a través de la oxidación de los residuos de ácidos grasos de la bicapa lipídica. Dicho proceso ocasiona cambios en la composición química, y deterioro en la organización ultraestructural causado

por el radical OH$^{\bullet}$ sobre los PUFA de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas conducen a la pérdida de la permeabilidad celular. Estos radicales atacan a un ácido graso constituyente de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles; dicha interacción se produce en el carbono adyacente al doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un átomo de hidrógeno (H) formando un radical carbonado (R$^{\bullet}$), este a su vez reacciona con el oxígeno para formar peróxido cíclico y radicales hidroperóxidos (R-OO$^{\bullet}$); este ácido graso al buscar estabilizar su estructura química toma un electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena al reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido (R-OO$^{\bullet}$). Este R-OO$^{\bullet}$ en presencia de complejos metálicos puede descomponerse en más radicales incluyendo al OH$^{\bullet}$ provocando un fenómeno de expansión del daño en una serie de reacciones en cadena, en el que se considera que la lipoperoxidación se ha propagado (Fig.6) generando aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes (Young y McEneny, 2001).

La lipoperoxidación disminuye la fluidez de la membrana celular, alterando su permeabilidad e inactivando a enzimas, receptores y canales embebidos en ella, y que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y otros agentes reguladores del medio extracelular (Rodríguez y col., 2001; Negre y cols., 2008).

Los ácidos grasos poliinsaturados al ser de gran importancia para la célula y formar parte de los fosfolípidos de diferentes membranas como en retículo endoplásmico, mitocondrias y la bicapa lipídica de la membrana celular, son muy susceptibles al estrés oxidativo (Lenaz, 1998).Los fosfolípidos son los responsables del buen funcionamiento de la membrana y por ende guardan la homeostasis de la célula (Janero, 1990; Gluck, 2000; Negre y cols., 2008).

El cerebro es particularmente susceptible al estrés oxidativo debido a que utiliza la mayor cantidad de oxígeno en comparación con otros órganos, también contiene gran cantidad de ácidos grasos piliinsaturados, es rico en hierro, que puede catalizar la formación de radical hidroxilo, y es bajo en la actividad de la enzima CAT (10% menos que en el hígado) (Eun y cols., 2011).

Los compuestos reactivos de carbonilo (RCCs), como los aldehídos (hidroperóxidos) y dicarbonilos, que se generan como productos de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados incluyendo hidroxialquenales, malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxinonenal

(4-HNE), estos compuestos muestran una gran diversidad de propiedades biológicas: como el de reaccionar con las proteínas, carbohidratos y otras moléculas biológicas como los lípidos de las membranas y ADN (Negre y cols., 2008; Esterbauer y cols., 1991); por lo que su determinación es esencial como indicador del estrés oxidativo, así como para evaluar el daño celular causado por los RL en tejidos (Gluck, 2000; Negre y cols., 2008).

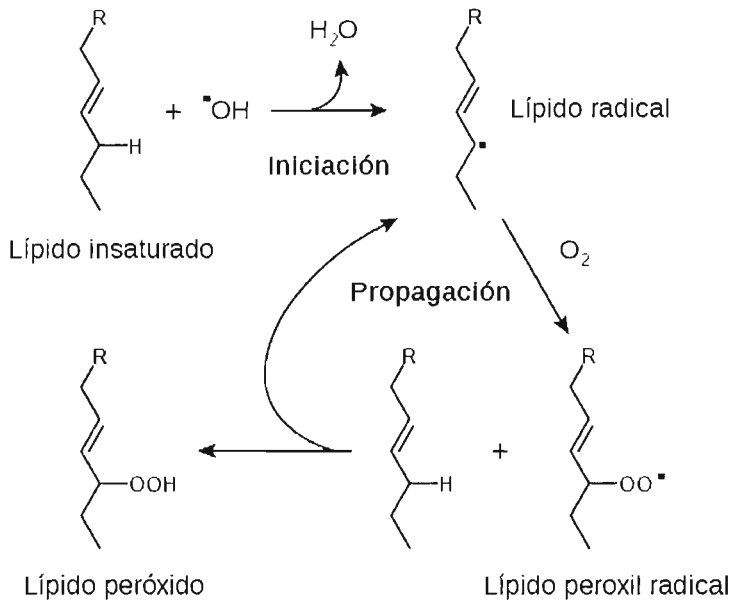


Figura 6.- Cadena de mecanismo de reacción de la lipoperoxidación. Tomado de Young IS y McEneny (2001).

El ADN contiene desoxirribosa que es una molécula susceptible de reaccionar con los RL; cuando la desoxirribosa es oxidada por el radical hidroxilo se rompen enlaces entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido. Este proceso no tiene mayor importancia cuando las cadenas de ADN son sencillas, pero cuando el rompimiento es en cadenas dobles, el ADN sufre un daño permanente y desencadena en una mutación. El ataque del radical hidroxilo al ADN ocurre en los átomos de hidrógeno de los carbono 4 y 5 de la desoxirribosa, que es la molécula más expuesta del ADN (Balasubramanian, 1998).

La tasa de oxidación celular y la formación de aldehídos son bajas en condiciones fisiológicas normales, pero aumenta con la edad y la disminución de las defensas antioxidantes, así como del daño a las mitocondrias (Negre y cols., 2008).

Dada la relación directa entre la producción de estos aldehídos reactivos y la lipoperoxidación, la evaluación de la concentración de estos subproductos puede proporcionar la información necesaria para valorar el daño producido por el estrés oxidativo en la muestra estudiada.

En este sentido, se puede medir el nivel de lipoperoxidación a través de la estimación cuantitativa y espectrofotométrica del MDA y el 4-HNE que son subproductos de tal proceso y que es de preferencia para dicho fin (Ohkama y Ohishi, 1979; Gluck, 2000). La determinación de los hidroperóxidos se basa en la reacción del tiobarbitúrico con estas moléculas. El producto de esta reacción es el desdoblamiento de los hidroperóxidos; estos productos forman un complejo colorido que puede ser cuantificado por espectrofotometría (Visioli y cols., 1998). La estimación del nivel de hidroperóxidos en tejido se encuentra en el rango de 0.3-30 μM dependiendo del método utilizado. Para ello los más comunes y adecuados son los métodos directos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las crisis convulsivas y el estado epiléptico producen un incremento del estrés oxidativo, además de daño celular, lo cual altera los circuitos neuronales producido pérdida neuronal, por lo que se considera importante, reducir los efectos adversos de las crisis y controlarlas por medio de un método alternativo que no involucre métodos invasivos que a la larga generan otro tipo de daños. Los CEM-EBF producen un desacople de las neuronas en estado excitable lo que probablemente reduce la actividad convulsiva y por ende el estrés oxidativo que lo genera, es por ello que el presente trabajo pretende conocer si los CEM-EBF incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas y reducen de esta forma las crisis convulsivas producidas por el modelo epiléptico del fármaco 4AP. Dado que existe un 30% de pacientes epilépticos refractarios a tratamientos farmacológicos, los CEM-EBF emergen como una terapia alternativa potencial que ayudan a reducir el estrés oxidativo y de esta forma puedan ser utilizados como tratamiento y/o preventivo de enfermedades tales como la epilepsia, que esta directa o indirectamente relacionada con el estrés oxidativo.

5. HIPÓTESIS.

El tratamiento con los CEM-EBF en un modelo de epilepsia en ratas, producirá un incremento en la actividad enzimática antioxidante endógena, disminuyendo con ellos los efectos perjudiciales de estrés oxidativo ocasionados por la 4AP.

6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los efectos de la aplicación de los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en el cerebro de ratas adultas tratadas con 4AP.

7. OBJETIVOS PARTICULARES.

a).- Medir y analizar la actividad de la enzima superóxido dismutasa en el cerebro de ratas tratadas con 4AP,previamente expuestas a los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia y compararlas con su respectivo grupo control.

b).- Determinar y analizar la actividad de la enzima glutatión s-transferasa en el cerebro de ratas tratadas con 4AP,previamente expuestas a los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia y compararla con su respectivo grupo control.

c).- Medir y analizar la actividad de la enzima catalasa en el cerebro de ratas tratadas con 4AP, previamente expuestas a los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia y compararla con su respectivo grupo control.

d).- Cuantificar y analizar la concentración de hidroperóxidos en el cerebro de ratas adultas tratadas con 4AP, previamente expuestas a los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia y compararlos con su respectivo grupo control.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (220 a 250 g de peso),las cuales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con temperatura de 22ºC ± 2ºC, periodo luz-oscuridad de 12 h y con acceso libre a agua y alimento. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y a reglas internacionales como la guía de los Institutos Nacionales de Salud en los Estados Unidos (Publicación N° 85-23, revisada en 1996) sobre el uso de animales de laboratorio.

8.2. Reactivos y Soluciones.

Solución amortiguadora de HEPES (C8H17N2O4SNa) 0.1M ajustada a pH 7.4,agua desionizada grado HPLC, solución salina, fármaco 4AP ($C_5H_6N_2$) (dosis: 4 mg/Kg de peso corporal), Kits de ensayo para lipoperoxidación (LPO) con número de catálogo 705003, kits de ensayo para la actividad de la enzima glutatión s-transferasa (GST) con número de catálogo 703302; así como para determinar la actividad de la enzima catalasa (CAT) con número de catálogo 707002; por último para la enzima superóxido dismutasa (SOD) con número de catálogo 706002. Todos ellos en placas Elisa de 96 pozos; adquiridos en el laboratorio Cayman Chemical.

8.3. Grupos Experimentales.

1. Grupo control solución salina; subgrupos: CSS1, CSS24 y CSS72h (n=5) para cada uno. Los animales fueron administrados únicamente con vehículo (NaCl 0.9%). Un grupo control fue tomado en paralelo para cada grupo experimental. Los animales se observaron individualmente en cajas de plástico transparente durante una hora después de la administración.

2. Grupo control 4AP; 3 subgrupos: 4AP1, 24 y 72h (n=5) para cada uno. A los animales se les indujo las crisis convulsivas con la administración única del fármaco 4AP vía intraperitoneal (v.i.p.). Los animales se observaron individualmente en cajas de plástico transparente durante una hora después de la administración.

3. Grupo control CEM-EBF; 3 subgrupos: CCEM1, 24 y 72h (n=5) para cada uno. Los animales de cada subgrupo fueron únicamente tratados con los CEM-EBF por dos horas diarias durante 7 días; para evitar variaciones circadianas, esto se realizó a la misma hora. Los CEM-EBF fueron uniformes en todo el cuerpo del animal y se indujeron con una bobinas solenoide, la cual fue calibrada con un Gaussmanómetro a una densidad de flujo de 6.6 Gauss y una frecuencia de 120 Hz, se trabajó con 82 voltios en la bobina y 72% de voltaje en línea. Las bobinas tenían un diámetro interno de 30 cm, con un espacio entre bobinas de 15 cm, donde se pusieron las ratas en tratamiento. Los animales se observaron individualmente en cajas de plástico transparente durante una hora después del último tratamiento con los CEM-EBF.

4. Grupo experimental CEM-EBF+4AP; 3 subgrupos: CEM+4AP1, 24 y 72h (n=5) para cada uno. Los animales al igual que en el grupo anterior, se sometieron al tratamiento con los CEM-EBF, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Posterior al último tratamiento con los CEM-EBF, la convulsión epiléptica fue inducida por la administración v.i.p. de la 4AP (4 mg/kg) de acuerdo a lo descrito por Mihály (1990; 2001), el fármaco se disolvió en solución salina (20 mg/mL). Los animales se observaron individualmente en cajas de plástico transparente durante una hora después de la administración de la 4AP.

8.4. Obtención de las muestras biológicas.

Los animales tanto de los grupos control como de los experimentales se sacrificaron por decapitación al término del tratamiento correspondiente, posteriormente se disectaron las siguientes regiones cerebrales: Amígdala, Hipocampo y Corteza cerebral. Cada tejido cerebral se pesó y se colocó en tubos Ependorff, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70ºC.

8.5. Homogenizados tisulares.

Los tejidos se pusieron en hielo hasta descongelarse, posteriormente se les agregó unasolución amortiguadora de HEPES 0.1M a pH 7.4a 4°C, en una proporción de 1:3 P/V. El tejido se homogeneizó utilizando un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón en frio y el homogenizado se centrifugó a 10000 g por 15min a 4 °C. El sobrenadante se separó y se utilizó para la determinación bioquímica de la actividad de las enzimas antioxidantes según las especificaciones del inserto del kit de placa de Elisa.

8.6. Determinación bioquímica de la actividad enzimática por espectrofotometría.

Se empleo el sobrenadante para la determinación de las enzimas antioxidantes y la interfase para el caso del kit de lipoperoxidación, en todos los casos siguiendo las especificaciones para cada kit. La lectura de las placas Elisa se realizó por el método espectrofotométrico UV visible.

El sistema de detección para determinar la actividad de la SOD (450nm) utiliza una sal de tetrazolio para la detección de los radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina. El ensayo de SOD sirve para detectar los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y Fe). El ensayo es una herramienta sencilla, reproducible, rápida de ver la actividad de la SOD en el plasma, suero, eritrocitos lisados, homogenizados de tejidos y lisados celulares. Para este estudio se utilizó una proporción de tejido 1:3 P/V respectivamente.

El sistema de detección para determinar la actividad de la enzima catalasa (CAT), utilizó la función peroxidativa de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2. El formaldehido producido por la reacción anterior formó un complejo colorido con el 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazol (Purpald) el cual es específico para la forma heterocíclica y bicíclica de aldehídos. La concentración del complejo formado se midió por espectrofotometría, utilizando una longitud de onda de 540nm, en una placa de 96 pozos. Este ensayo puede ser usado para medir la actividad de la CAT en el plasma, suero, eritrocitos lisados, homogeneizados de tejido, y lisados celulares (Johansson y Borg, 1988; Wheeler y cols., 1990).

El sistema de detección para determinar la actividad de la GST mide la actividad de la GST total (citosólica y microsomal) midiendo la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

(CDNB) con el glutatión reducido. La conjugación se acompaña de un aumento en la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. La tasa de aumento es directamente proporcional a la actividad de la GST en la muestra.

La determinación de la lipoperoxidación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit de ensayo comercial para hidroperóxidos lipídicos el cual es un método directo de cuantificación de hidroperóxidos que utiliza la interfase del homogenizado. El sistema de detección se basa en la medición directa de hidroperóxidos utilizando reacciones redox con iones ferrosos. Los hidroperóxidos son muy inestables y reaccionan fácilmente con los iones ferrosos para producir cloruro férrico es por ello que para evitar este fenómeno las muestras se extraen con cloroformo, y el extracto se utiliza directamente en el ensayo, el complejo formado entre los iones de hierro y los iones de tiocianato se midió a una longitud de onda de 530 nm; es un método sensible y confiable para cuantificar el daño causado por el estrés oxidativo (Mihaljevic y cols., 1996).

8.7. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la actividad de las enzimas, así como el de la concentración de hidroperóxido en las muestras de tejido cerebral fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA)de una vía, utilizando la prueba deTukey para comparar los promedios obtenidos en cada prueba y poder indicar su significancia con respecto a cada una de las pruebas realizadas con los animales control. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 4. El valor de $p< 0.05$ fue considerado significativo.

9. RESULTADOS

9.1.1.Actividad enzimática SOD (U/mL) 1h.

El grupo CSS1h mostró una actividad de SOD en la amígdala de 11638 U/mL, el hipocampo de 50800 U/mL y la corteza cerebral de 415.4 U/mL.

El grupo 4AP1h comparado con su grupo control (CSS1h), presentó un disminución no significativa en la amígdala de 10875 U/mL, el hipocampo disminuyó a 49795 U/mL, y en la corteza cerebral aumento a 454.0 U/mL (Figura 1).

El grupo CCEM1h en la amígdala presentó una actividad de la SOD de 12455 U/mL, el hipocampo de 54052 U/mL; y la corteza de 394.0 U/mL.

El grupo CEM+4AP1h comparado con su grupo control (CCEM1h), en la amígdala mostró un incremento significativo en la actividad con 15478 U/mL (*p<0.05), el hipocampo presentó un aumento no significativo con 63096 U/mL, mientras que en la corteza cerebral mostró un aumento significativo a 523.5 U/mL (*p<0.05) (Figura 1).

9.1.2. Actividad enzimática SOD (U/mL) 24h.

El grupo CSS24h una actividad de SOD en la amígdala de 13032 U/mL, el hipocampo fue de 57727 U/mL y en la corteza cerebral de 456.0 U/mL.

El grupo 4AP24h comparado con su grupo control (CSS24h), en la amígdala mostró un aumentó en la actividad enzimática a14973 U/mL, en el hipocampo la actividad disminuyó a 54645 U/mL,en la corteza cerebral presentó un incremento en la actividad enzimática a 520.4 U/mL. En ninguno de los casos la diferencia encontrada en la actividad de la enzima fue significativa (Figura 1).

El grupo CCEM24h en la amígdala mostró una actividad de la SOD de 14636 U/mL, el hipocampo de 60311 U/mL, y en la corteza la actividad fue de 496.0 U/mL.

El grupo CEM+4AP24h comparado con su grupo control (CCEM24h), mostró en la amígdala un incremento significativo con 17326 U/mL (*p<0.05); el hipocampo mostró un aumento no significativo con 58654 U/mL; del mismo modo en la corteza cerebral que presentó un aumento significativo con 329.0 U/mL (*p<0.05). Al compararlos con su grupo control (Figura 1).

9.1.3.Actividad enzimática SOD (U/mL) 72h.

El grupo CSS72h mostró una actividad de SOD en amígdala de 11615 U/mL, mientras que en el hipocampo fue de 46179 U/mL y en la corteza cerebral de 368.0 U/mL.

El grupo 4AP72h comparado con su grupo control (CSS72h), mostró una disminución en la actividad de la enzima en la amígdala a 10440 U/mL; de igual forma en el hipocampo con 42820 U/mL, mientras que en la corteza cerebral la actividad enzimática se incrementó significativamente a 461.3 U/mL (Figura 1).

El grupo CCEM72h en la amígdala mostró una actividad de la SOD de 98658 U/mL, el hipocampo de 46212 U/mL; y la corteza de 439.0 U/mL.

El grupo CEM+4AP72h comparado con su grupo control (CCEM72h), en la amígdala mostró un incremento significativo con 13538 U/mL (*p<0.05); el hipocampo mostró un

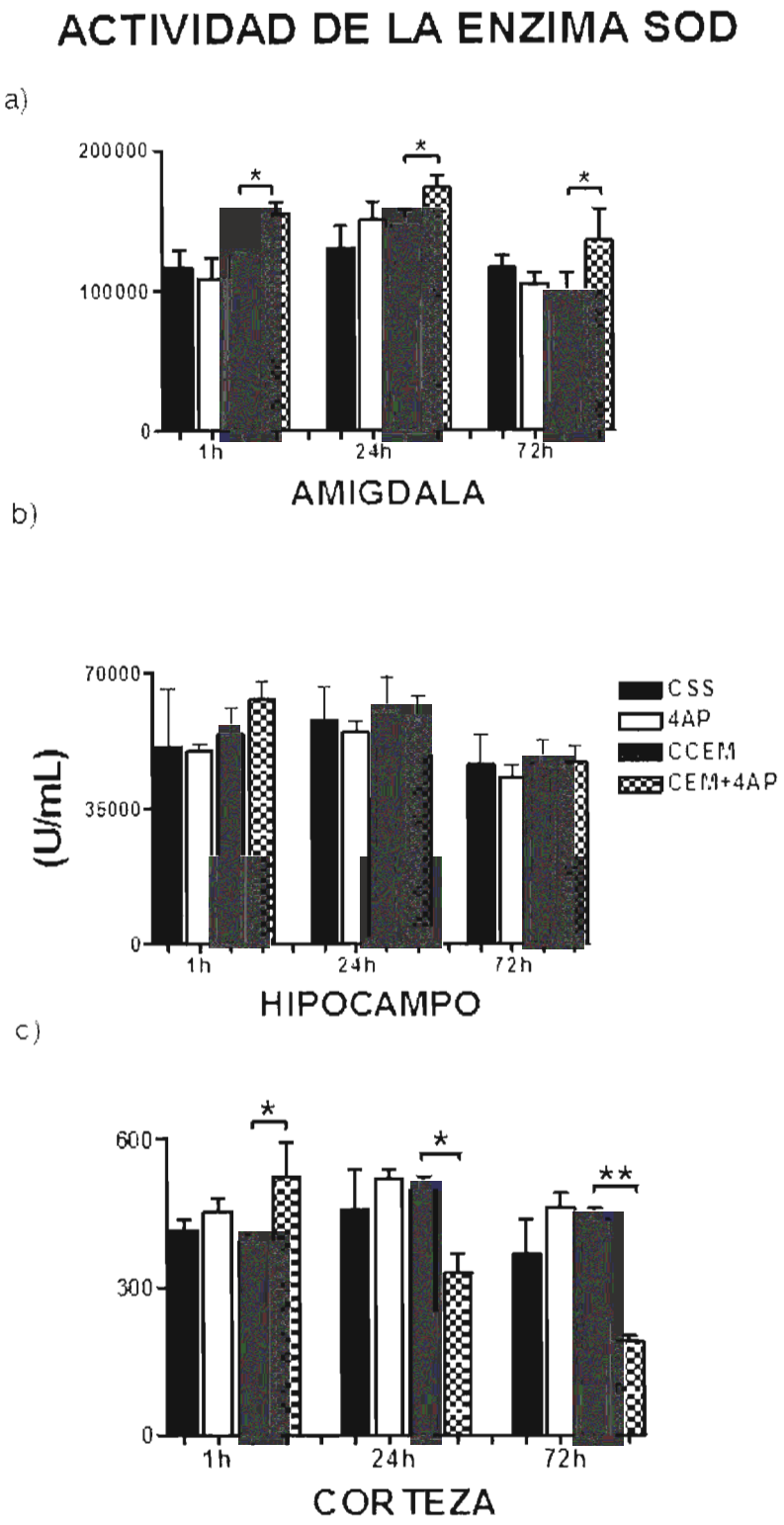


Figura 1. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa expresada en U/ml en las diferentes regiones cerebrales: a) Amígdala, b) Hipocampo. c) Corteza. Los valores fueron expresados como media ± E.E., se realizó una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Valores significativos: $^{*}p< 0.05$; $^{**}p< 0.01$.

aumento no significativo con 46785 U/mL; la corteza presentó una disminución significativa con 192.2 U/mL (**$p<0.01$) (Figura 1).

9.2.1. Actividad enzimática CAT (nmol/min/mL) 1h.

El grupo CSS1h mostró una actividad de CAT en la amígdala de 103.3 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 103.5 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 132.0 nmol/min/mL.

El grupo 4AP1h comparado con su grupo control (CSS1h), mostró en la amígdala una diferencia significativa en la actividad de la CAT, la cual disminuyó a 5412 nmol/min/mL (*$p<0.05$); mientras que en el hipocampo la actividad aumentó a 109.0 nmol/min/mL; en tanto que en la corteza cerebral hubo una disminución en la actividad de la enzima a 119 nmol/min/mL, los dos últimos valores fueron estadísticamenteno significativos (Figura 2).

El grupo CCEM1h en la amígdala mostró una actividad de la CAT de 12168 nmol/min/mL, el hipocampo de 106.0 nmol/min/mL, y la corteza de 116.0 nmol/min/mL.

El grupo CEM+4AP1h comparado con su grupo control (CCEM1h), en la región amígdala mostró una disminución significativa con 5926 nmol/min/mL (**$p<0.01$); el hipocampo mostró una disminución significativa con 68.0 nmol/min/mL (*$p<0.05$); en tanto que en la corteza la disminución fue no significativa con 104.1 nmol/min/mL (Figura 2).

9.2.2. Actividad enzimática CAT (nmol/min/mL) 24h.

El grupo CSS24h mostró una actividad de CAT en la amígdala de 7994 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 134.1 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 99.0 nmol/min/mL.

El grupo 4AP24h comparado con su grupo control (CSS24h), mostró en la amígdala una disminución en la actividad enzimática a 7756 nmol/min/mL; de igual forma en el hipocampo la actividad disminuyó a 100.0 nmol/min/mL; mientras que en la corteza se incrementó significativamente la actividad enzimática a 121.0 nmol/min/mL (*$p<0.05$) (Figura 2).

El grupo CCEM24h en la amígdala mostró una actividad de la CAT de 8661 nmol/min/mL, el hipocampo de 105 nmol/min/mL, y la corteza de 111.0 nmol/min/mL.

El grupo CEM+4AP24h comparado con su grupo control (CCEM24h), mostró en la amígdala un incremento no significativo con 8711 nmol/min/mL; el hipocampo mostró una

disminución no significativa con 86.1 nmol/min/mL; en tanto que la corteza cerebral presentó un aumento no significativo con 125.0 nmol/min/mL (Figura 2).

9.2.3. Actividad enzimática CAT (nmol/min/mL) 72h.

El grupo CSS72h mostró una actividad de CAT en la amígdala de 7050 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 104.4 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 117.3 nmol/min/mL.

El grupo 4AP72h comparado con su grupo control (CSS72h), mostró un incremento en la actividad de la enzima CAT en la amígdala a 8609 nmol/min/mL; en el hipocampo también aumento la actividad enzimática a 130.2 nmol/min/mL (*$p<0.05$); y en la corteza cerebral disminuyó a109.1 nmol/min/mL (Figura 2).

El grupo CCEM72h en la amígdala mostró una actividad de la CAT 14927 nmol/min/mL, el hipocampo de 127.0 nmol/min/mL, y la corteza de 140.0 nmol/min/mL.

El grupo CEM+4AP72h comparado con su grupo control (CCEM72h), en la amígdala mostró una disminución significativa de CAT con 9500 nmol/min/mL (*$p<0.05$); el hipocampo mostró un aumento no significativo con 132.2 nmol/min/mL; mientras que la corteza presentó una disminución no significativa con 135.3 nmol/min/mL (Figura 2).

9.3.1. Actividad enzimática GST (nmol/min/mL) 1h.

El grupo CSS1h mostró una actividad de GST en la amígdala de 5997 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 3206 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 39.1 nmol/min/mL.

El grupo 4AP1h comparado con su grupo control(CSS1h), en la amígdala mostró una disminución significativa a 3740 nmol/min/mL (*$p<0.05$); en el hipocampo hubo un aumento significativo a 4135 nmol/min/mL (*$p<0.05$); y en la corteza cerebral aumentó no significativo a 43.4 nmol/min/mL (Figura 3).

El grupo CCEM1h en la amígdala mostró una actividad de la GST de 4076 nmol/min/mL, mientras que en el hipocampo de 3136 nmol/min/mL, la corteza de 33.2 nmol/min/mL.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA

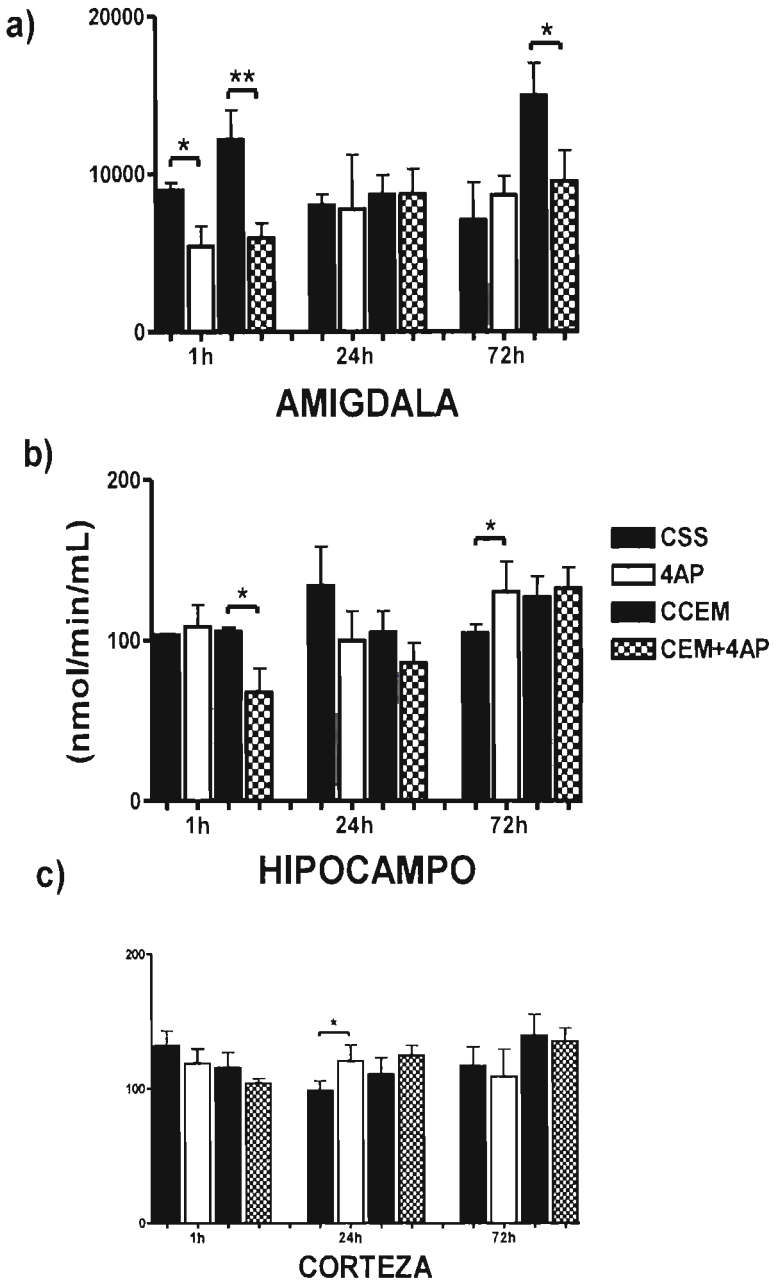


Figura 2. Actividad de la enzima Catalasa expresada en nmol/min/ml en las diferentes regiones cerebrales; a) Amígdala, b) Hipocampo, c) Corteza. Los valores fueron expresados como media ± E.E. ANOVA de una vía, seguida de una pos-prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Valores significativos: *p< 0.05; **p< 0.01.

El grupo CEM+4AP1h comparado con su grupo control (CCEM1h), en la amígdala mostró un incremento no significativo con 4858 nmol/min/mL; al igual que el hipocampo con 3608 nmol/min/mL; la corteza presentó un incremento significativo con 41.00 nmol/min/mL (Figura 3).

9.3.2. Actividad enzimática GST (nmol/min/mL) 24h.

El grupo CSS24h mostró una actividad de GST en la amígdala de 5820 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 3247 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 39.26 nmol/min/mL.

El grupo 4AP24h comparado con su grupo control (CSS24h), en la amígdala mostró una disminución significativa en la actividad de GST a 3466 nmol/min/mL (*p<0.05); en el hipocampo hubo un incrementó no significativo con 3603 nmol/min/mL; y en la corteza cerebral bajo no significativamente a 37.00 nmol/min/mL (Figura 3).

El grupo CCEM24h en la amígdala mostró una actividad de la GST de 4810 nmol/min/mL, el hipocampo mostró una actividad de 3847 nmol/min/mL, la corteza de 37.00 nmol/min/mL.

El grupo CEM+4AP24h comparado con su grupo control (CCEM24h), mostró en la región amígdala un aumento significativo con 5877 nmol/min/mL; mientras que en el hipocampo la actividad disminuyó significativamente a 2545 nmol/min/mL (*p<0.05); en la corteza cerebral presentó un aumento sin ser significativo con 42.00 nmol/min/mL (Figura 3).

9.3.3. Actividad enzimática GST (nmol/min/mL) 72h.

El grupo CSS72h mostró una actividad de GST en la amígdala de 5463 mmol/min/mL, mientras que en el hipocampo fue de 3014 nmol/min/mL y en la corteza cerebral se observó una actividad de 40.4 nmol/min/mL.

El grupo 4AP72h comparado con su grupo control (CSS72h), mostró un incremento no significativa en la actividad de la GST en la amígdala a 5281nmol/min/mL; en el hipocampo aumentó significativamente a 4195 nmol/min/mL (*p<0.05); en tanto que en la corteza disminuyó no significativamente a 47.3 nmol/min/mL (Figura 3).

El grupo CCEM72h en la amígdala mostró una actividad de la GST de 3002 nmol/min/mL el hipocampo mostró una actividad de 4155 nmol/min/mL, la corteza de 34.54 nmol/min/mL.

El grupo CEM+4AP72h comparado con su grupo control (CCEM72h), en la amígdala mostró una disminución no significativa con 3369 nmol/min/mL; el hipocampo con una disminución significativa con 2340 nmol/min/mL (*p<0.05); en la corteza también disminuyó significativamente con 23.36 nmol/min/mL (*p<0.05) (Figura 3).

9.4.1. Concentración de hidroperóxidos (µM) 1h.

El grupo CSS1h en la región amígdala mostró una concentración de hidroperóxido de 0.338 µM, el hipocampo de 0.127 µM; y en corteza de 0.403 µM.

En el grupo 4AP1h comparado con su grupo control (CSS1h), en la amígdala mostró un aumento significativo en la concentración de hidroperóxidos 0.443 µM (*p<0.05); al igual que en el hipocampo que incrementó significativamente 0.208 µM (*p<0.05); en la corteza el incremento no fue significativo 0.423 µM (Figura 4).

El grupo CCEM1h mostró una concentración de hidroperóxidos de 0.414 µM en región amígdala; en el hipocampo de 0.394 µM; y en la corteza de 0.452 µM.

El grupo experimental CEM+4AP1h comparado con su grupo control (CCEM1h), en la amígdala mostró una baja no significativa en la concentración de hidroperóxidos con 0.375 µM, al igual que en el hipocampo con 0.355 µM; en tanto que en corteza la concentración de hidroperóxidos incrementó significativamente a 0.599 µM (*p<0.05) (Figura 4).

9.4.2.Concentración de hidroperóxidos (µM) 24h.

En el grupo CSS24h mostró una concentración de hidroperóxidos de 2.2 µM en la amígdala, el hipocampo de 2.0 µM, en tanto que en la corteza fue de 2.11 µM.

El grupo 4AP24h comparado con su grupo control (CSS24h), en la amígdala mostró una disminución no significativa de 2.1µM, en el hipocampo incremento no significativamente 2.1 µM, en tanto que en la corteza hubo un incremento significativo 2.7µM (*p<0.05) (Figura 4).

El grupo CCEM24h mostró en la amígdala una concentración de 1.9 µM, en el hipocampo de 2.5 µM, mientras que en la corteza de 3.145 µM.

El grupo CEM+4AP24h comparado con su grupo control (CCEM24h), en la amígdala mostró un incremento siendo este valor no significativo con 1.9 µM, de igual forme en el hipocampo con 2.4µM; en tanto que en la corteza exhibió un incremento significativo en la concentración de hidroperóxidos a 2.1 µM (*p<0.05) (Figura 4).

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GST

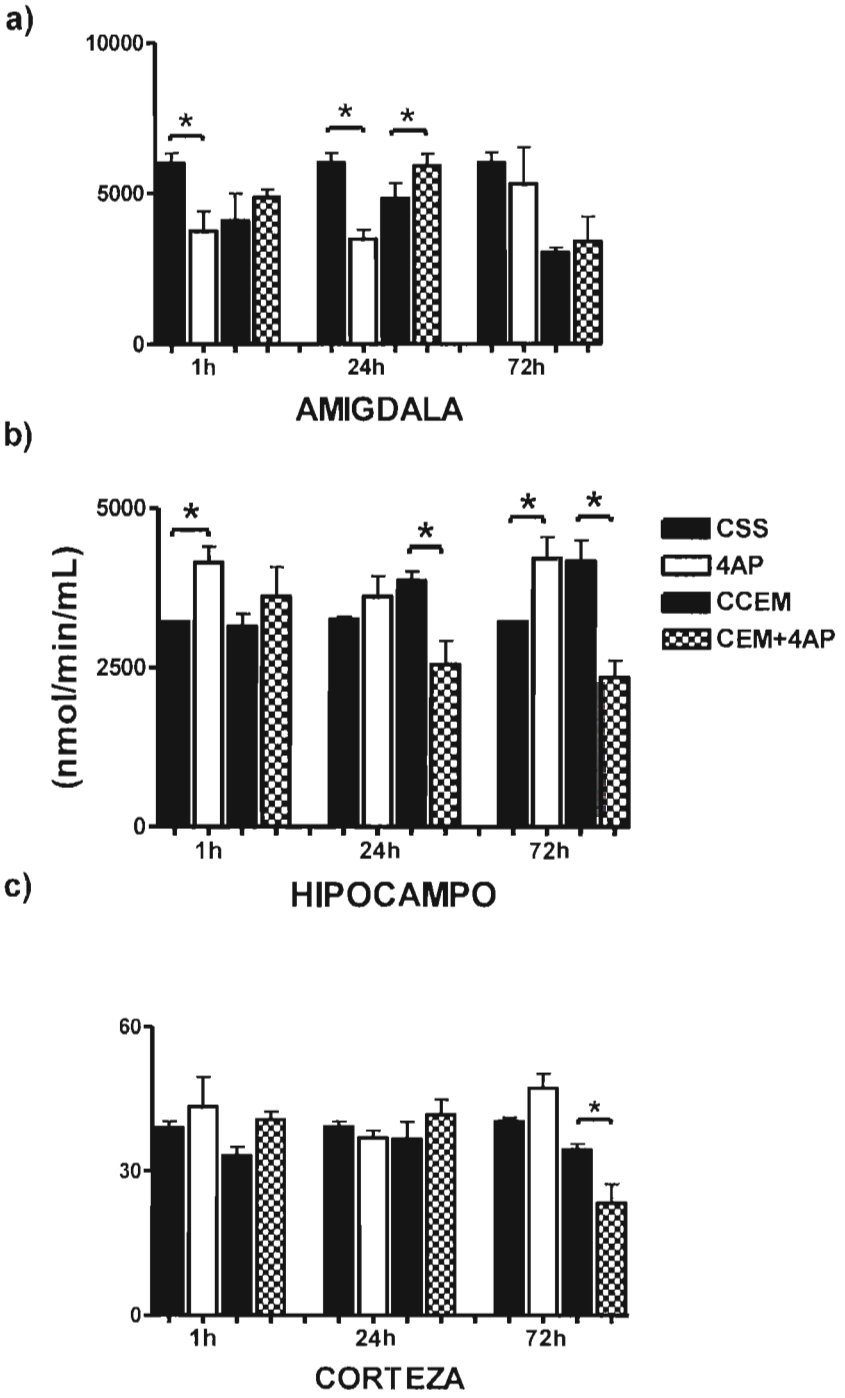


Figura 3. Actividad de la Glutatión S-Transferasa expresada en nmol/min/ml en las diferentes regiones cerebrales; a) Amígdala, b) Hipocampo, c) Corteza. Los valores fueron expresados como media ± E.E. ANOVA de una vía, seguida de una pos-prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Valores significativos: *p< 0.05; **p< 0.01.

9.4.3. Concentración de hidroperóxidos (µM) 72h.

El grupo CSS72h en la región amígdala mostró una concentración de hidroperóxidos de 1.2 µM, en tanto que en el hipocampo fue de 1.7 µM y en la corteza se observó una actividad de 1.307 µM.

El grupo 4AP72h comparado con su grupo control (CSS72h), en la amígdala mostró una disminución significativa de 0.370 µM (**$p<0.01$), el hipocampo disminuyó significativamente 0.245 µM (**$p<0.01$); de igual forma en la corteza cerebral disminuyó no significativamente 0.616 µM (**$p<0.01$) (Figura 4).

El grupo CCEM72h en la amígdala mostró una concentración de hidroperóxidos de 0.634 µM, el hipocampo de 0.741 µM, la corteza de 0.394 µM.

El grupo CEM+4AP72h comparado con su grupo control (CCEM72h), en la amígdala mostró una disminución significativa a0.05 µM (**$p<0.01$), de igual forma el hipocampo a0.535 µM (*$p<0.05$); mientras que en la corteza cerebral se incrementó significativamente la concentración de los mismos con0.882 µM (*$p<0.05$) (Figura 4).

HIDROPERÓXIDOS

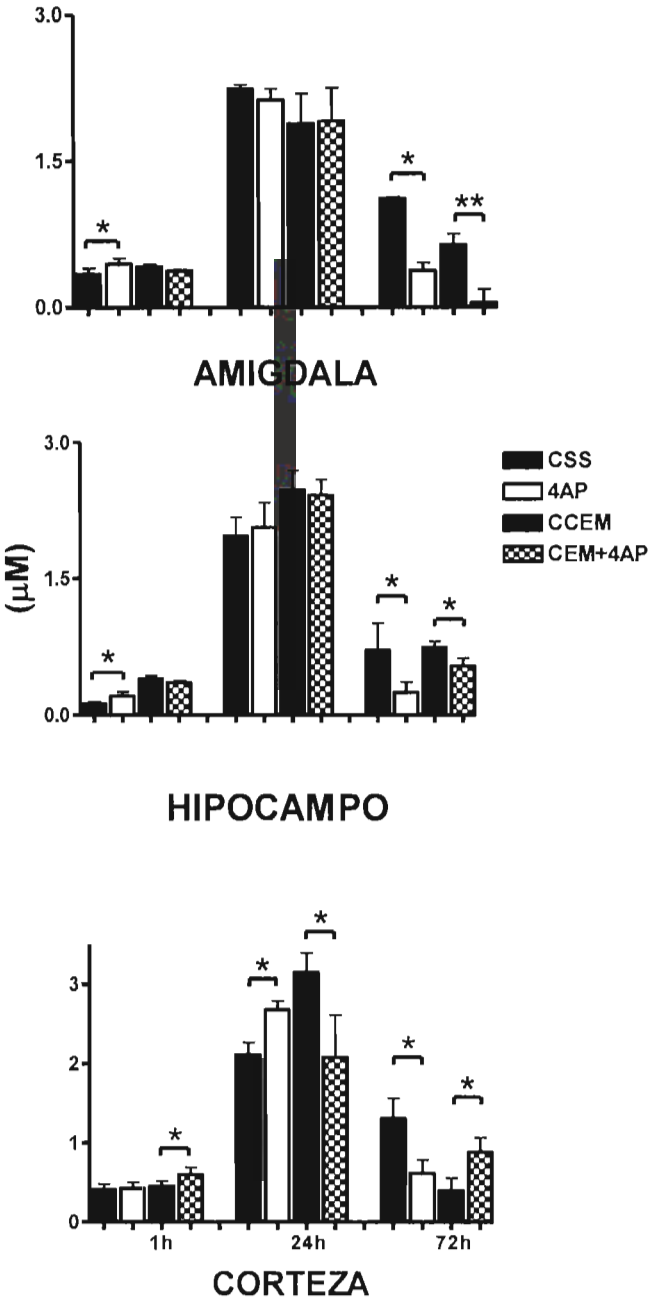


Figura 4. Muestra la concentración de hidroperóxido (µM) en las diferentes muestras cerebrales; a) Amígdala, b) Hipocampo, c) Corteza. Los valores fueron expresados como media ± E.E. ANOVA de una vía, seguida de una pos-prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Valores significativos: *p < 0.05; **p< 0.01.

10. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio se refieren a la actividad de la SOD, CAT y GST todas ellas enzimas antioxidantes endógenas en la amígdala cerebral, hipocampo y corteza cerebral, regiones cerebrales importantes en el inicio y propagación de un episodio epiléptico (Bear y Lothman, 1993; Veliskova y cols., 1996; Bram y cols., 1997), por tanto son regiones con mayor actividad neuronal y por ende de estrés oxidativo, el efecto de los CEM-EBF pudo ser diferente tanto para la amígdala e hipocampo, así como para la corteza debido a sus diferencias estructurales y funcionales; esto probablemente explica porque existe una mayor actividad enzimática en la región cerebral amígdala, seguida del hipocampo y por último la corteza cerebral (Westphalen y cols., 2011); esta última se considera un área de propagación de una crisis epiléptica parcial, esto ocurre cuando hay una activación suficiente para reclutar neuronas cercanas propagando así la actividad epiléptica a través de conexiones corticales locales, y a áreas más lejanas por medio de vías de asociación largas como las de las células piramidales y las conexiones del cuerpo calloso. Esto sugiere que durante el proceso de la actividad neuronal en un episodio epiléptico hay una actividad regional cerebral, es decir que la sensibilidad a alguna sustancia farmacológica es diferente entre las regiones del SNC.

La exposición a los CEM-EBF en ratas adultas, modifican la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la administración de la 4AP. Los resultados indicaron que en la amígdala se produjo un aumento en la actividad enzimática de SOD en los diferentes grupos experimentales CEM+4AP1h, 24h y 72h;en el hipocampo no se produjo ningún cambio enzimático, en tanto que en la corteza cerebral en el grupo CEM+4AP1h se observó un incremento en la actividad de SOD, mientras que a 24 y 72h la actividad de la enzima disminuyó significativamente; esto indica que el efecto de los CEM-EBF entre las regiones cerebrales estudiadas es diferente, ya que la actividad enzimática de SOD varía entre las mismas. Sin embargo, es importante señalar que la actividad de SOD presentó un incremento y se mantiene en el tiempo mediante la aplicación de los CEM-EBF.

El tratamiento con CEM+4AP aumentó significativamente el estrés oxidativo en la corteza cerebral pero no en la amígdala ni en el hipocampo. Estos datos fueron confirmados al analizar la concentración de hidroperóxidos en la corteza cerebral, donde observamos mayor daño neuronal a causa del estrés oxidativo probablemente generado en los animales durante el experimento. La exposición a los CEM-EBF incrementa la actividad de SOD con lo cual se

produce una acción protectora de las células neuronales al protegerlas del estrés oxidativo por el tratamiento con 4AP. La SOD al igual que la CAT son parte importante del mecanismo de defensa antioxidante celular al catalizan tanto la reacción de dismutación de dos moléculas de O_2•- a H_2O_2 y O_2, así como la descomposición del H_2O_2 a H_2O y O_2 (Malstrom y cols., 1975; Imlay y Fridovich, 1991; García y cols., 1997; Halliwell, 1999). Los datos obtenidos en este trabajo, también mostraron que los campos electromagnéticos en los grupos experimentales en la región amígdala e hipocampo disminuyen la actividad de la enzima CAT, mientras que en la corteza cerebral parecen no tener efecto ya que no logran modificar la actividad de la enzima; esto concuerda con reportes anteriores donde han señalado que la actividad de la enzima CAT en el cerebro es baja (Eun y cols., 2011).

Las glutatión s-transferasas (GST) son otras enzimas protectoras que pueden destoxificar algunos de los compuestos secundarios producidos por las ERO cuando éstas reaccionan con los componentes celulares (Esterbauer y cols., 1991). En la amígdala el estrés oxidativo producido por el manejo de los animales y por los campos electromagnéticos, aumentó la actividad de la GST en el tratamiento CEM+4AP24h en comparación con los datos obtenidos en el grupo CEM+4AP1h; mientras que en el hipocampo la actividad de la GST disminuyó en los grupos CEM+4AP24 y 72h. En la corteza cerebral la actividad de la GST incrementa de manera transitoria en los grupos CEM+4AP1 y 24h, ya que a las 72h la actividad disminuye, esto se debe probablemente a que esta región en la actividad convulsiva es una región de propagación, por tal motivo el estrés oxidativo es menor que en la zona con actividad epileptiforme como es el caso de la amígdala e hipocampo (Oroquieta y cols., 2002).

Por otro lado, los mecanismos que pueden explicar el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes por el tratamiento con los CEM-EBF no están completamente definidos; sin embargo, se ha reportado que el efecto anticonvulsivante probablemente se deba a la modulación de los CEM-EBF sobre el sistema serotoninérgico, es decir de la glándula pineal (Chance y cols., 1995; Baker-Price y Persinger, 2003; Kahkonen y Ilmonieme, 2004; Kanno y cols., 2003). El proceso por el cual la glándula pineal lleva a cabo la síntesis de melatonina durante la noche, tanto en los seres humanos (Sandyk y cols., 1991), como en los animales de experimentación (Portier y Wolfe, 1998), involucra un aumento de la enzima N-acetil transferasa, enzima limitante en la producción de melatonina, la enzima N-acetil transferasa actúa sobre la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) para convertirla en N-acetil-serotonina, está es subsecuentemente convertida a melatonina en

presencia de la enzima hidroxi-indol-O-metiltransferasa (Reiter, 1991). Los niveles elevados de melatonina producidos por la noche en la glándula pineal son liberados en la sangre (Reiter, 1986), lo que va a ocasionar que la melatonina cumpla con diferentes funciones como por ejemplo, la estimulación de las enzimas antioxidantes como: la SOD, CAT, GPx, GST, etc., son probablemente mediada por su receptor, mientras que otras son mediadas independientemente del receptor como la de limpiar directamente los RL, la melatonina perece ser un protector extraordinariamente eficiente de moléculas, tejidos, células, así como de muerte por apoptosis o necrosis; esto incrementa la capacidad del sistema antioxidante endógeno para reducir la toxicidad de los radicales libres y sus reactivos asociados (Reiter y cols., 2010; Reiter y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2004). En un proceso conocido como evasión de radicales (Hardeland, 2005), la melatonina también ha demostrado la capacidad para reducir la fuga de electrones a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial evitando así la generación de radicales libres (León y cols., 2004). Estas acciones combinadas de la melatonina, junto con su baja toxicidad y su capacidad de penetrar todas las membranas morfológicas, la convierten en un antioxidante que actúa en diferentes órganos y es altamente beneficiosa, no sólo en el cerebro sino en todo el organismo (Jou y cols., 2004; Topal y cols., 2005; Lee y cols., 2005; Fischer y cols., 2004). Por otra parte la melatonina protege a las células del daño por radicales libres; estás acciones no requieren de un receptor o de la formación de un complejo con otra molécula, sino solamente la presencia de la hormona en el sitio donde se están produciendo las ERO o ERN; por este mecanismo la presencia de melatonina induce el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno a moléculas inocuas para el organismo (Reiter y cols., 1995; Tan y cols., 2002; Hardeland y cols., 2003).

Por otro lado, se sabe que el líquido del espacio extracelular no es una simple solución salina, si no que están presentes una gran cantidad de electrolitos (Sykova, 2004); además de contener glucosamina, glicanos, glucoproteínas, y proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular (Antonova y cols., 2001). También se encuentran presentes moléculas de adhesión, así como fibronectina, tenascina y laminina (Thomas y Steindler, 1991; Celio y cols., 1998), estas moléculas se han sugerido que rodean distintas unidades funcionales en el sistema nerviosos central como; grupo de neuronas y grupos nucleares, estas grandes moléculas pueden disminuir el movimiento de varias sustancias neuroactivas (Antonova y cols., 2001; Sykova y cols., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la membrana celular

es un sitio de interacción de los CEM-EBF al incrementar el flujo y la corriente, especialmente del ión Ca^{++} (Bauréus y cols., 2003), Lo que permite el aumento de la liberación de neurotransmisores (Brown y Sawage, 1981; Rogawski y Barker, 1983; Harsing Jr., 2006). Al igual, se señaló en un estudio teórico en la vecindad de las membranas que los CEM-EBF incrementan el flujo y la corriente del mismo ión (Barnes y Kwon, 2005). También, se ha demostrado que la aplicación de los CEM-EBF pueden modificar la energía de movimiento de un ion localizado en cualquier macromolécula, lo que trae como consecuencia el incremento de las oscilaciones de dicho ion, lo que probablemente es suficiente para disparar el cambio en el estado cuántico de la macromolécula (Zhadin, 1998). Esto podría explicar los resultados del incremento de la actividad de las enzimas SOD y GST en el presente estudio.

Nuestros resultados sugieren que los CEM-EBF modifican la actividad enzimática antioxidante al tener un efecto sobre el ritmo circadiano de la melatonina, importante fenómeno para la sincronización interna de muchos ritmos endocrinos y no endocrinos en el organismo humano. Sin embargo se requieren de más pruebas y estudios en otros tejidos y regiones cerebrales que nos indique que no haya un riesgo para la salud asociado a la utilización de los CEM-EBF.

Los resultados del presente trabajo en relación a la concentración de los hidroperóxidos encontrados en las diferentes regiones cerebrales del estudio no mostraron diferencias significativas en los grupos experimentales en regiones como la amígdala e hipocampo en los tratamientos (1 y 24h) en relación a su grupo control; a las 72h los hidroperóxidos disminuyeron significativamente en el grupo experimental, fenómeno debido probablemente a que ha este periodo de tiempo el efecto de los CEM-EBF se reflejo en el incremento en la actividad de la diferentes enzimas antioxidantes. En contraste a las regiones cerebrales antes mencionadas, la corteza mostró un incremento en la concentración de hidroperóxidos. Se sabe que a mayor presencia de hidroperóxidos en la muestra es indicativo de que se sufrió mayor daño membranal axonal y celular (Negre y cols., 2008; Esterbauer y cols., 1991); por lo tanto las regiones cerebrales amígdala e hipocampo fueron las regiones que resultaron mayormente protegidas de la lipoperoxidación, en contraste con las regiones cerebrales anteriormente mencionadas, la corteza cerebral mostró un incremento en la concentración de hidroperóxidos, lo que nos dice que en esta región si hubo actividad de radicales libre y de ERO, lo suficiente como para incrementar la concentración de hidroperóxidos que es indicativo de daño celular en dicha región cerebral. Con respecto al

grupo 4AP se observó en algunos casos que la concentración de hidroperóxidos fue más baja que los del grupo control, este fenómeno probablemente se deba a que el fármaco administrado no fue en una dosis tóxica sino en una dosis necesaria para producir un estado de epilepsia, es por ello que no produjo el suficiente daño a las membranas celulares donde se vieran incrementados los niveles de hidroperóxidos en las muestras biológicas estudiadas (Mihály y cols., 1990).

Finalmente, nuestros resultados indican que la exposición a CEM-EBF en ratas induce estrés oxidativo en la corteza cerebral, no así en el hipocampo y amígdala, donde muy probablemente el incremento en la actividad enzimática por acción de la melatonina protegió al tejido cerebral del daño oxidativo, por lo que efectivamente los CEM-EBF podrían funcionar como una posible terapia alternativa en la lucha contra la epilepsia en pacientes farmaco-resistentes. Considero importante resaltar que los avances en cuanto al tratamiento de la epilepsia demuestran grandes progresos hasta el momento, sin embargo la cura de este mal sagrado como se le conocía en la antigüedad, vendrá sin duda alguna por el estudio serio y sentido común aplicado a la clínica, por el razonamiento riguroso y lógico aplicado con mentalidad científico-experimental como lo es este estudio.

CONCLUSIONES.

1. Los CEM-EBF incrementan la actividad enzimática tanto de la superóxido dismutasa como de la glutatión s-transferasa en la región cerebral amígdala, no así en el hipocampo y la corteza cerebral donde la actividad de dichas enzimas disminuyó, el incremento en la actividad enzimática antioxidante quizá tenga que ver con el efecto de los CEM-EBF sobre el sistema serotoninergico.

2. Los CEM-EBF parecen no tener efecto sobre la actividad de la enzima catalasa, ya que no presentó ninguna diferencia significativa alguna en esta región.

3. Los CEM-EBF disminuyen la concentración de hidroperóxidos lipídicos en la amígdala por lo que estos campos tienen un mayor efecto protector del daño celular en esta región, en comparación con las otras estudiadas.

4. Nuestros resultados sugieren que los CEM-EBF no tienen influencia alguna sobre la actividad enzimática antioxidante en la corteza cerebral, sin embargo si parecen incrementar el estrés oxidativo, por lo que el daño celular en esta región fue mayor; mientras que en la amígdala e hipocampo, el tratamiento con los CEM-EBF parece disminuir la concentración de los hidroperóxidos.

5. La exposición a CEM-EBF induce estrés oxidativo en las células de la corteza cerebral, mientras que en la amígdala y el hipocampo provoca una disminución de la producción de hidroperóxidos lipídicos en las ratas tratadas bajo diferentes esquemas, por lo que los campos electromagnéticos de baja frecuencia protegen a las neuronas del estrés oxidativo producido por el 4AP.

12. REFERENCIAS.

- ✓ Adey WR (1981) Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. Physiol Rev 61(2):435-514.
- ✓ Adler, V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew K D, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, et al. (1999) Regulation of JNK signaling by GST. Embo J 18:1321-1334.
- ✓ Andreani A, Leoni A, Locatelli R, Morigi M, Rambaldi C, Pietra G, and Villetti X(2000) 4-aminopyridine derivates with antiamnesic activity. Eur J Med Chem 35:77–82.
- ✓ Anninos PA, Tsgas N, Sandyk R, and Derpapas A(1991) Magnetic stimulation in the treatment of partial seizures. Int J Neurosci 60:141-171.
- ✓ Antonova T, Mazel T, Syková E, and Vargova L (2001) Extracellular space volumen and diffusion barriers in the CNS: the role of extracellular matrix, cell swelling and astrogliosis. In: Proceedings of the 34th International Congress of Physiological Societies (abstracts of papers). Christchurch.

- ✓ Arias C, Montiel T, Peña F, Ferrera P, and Tapia R(2002) Okadaic acid induces epileptic seizures and hyperphosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in rat hippocampus in vivo. Exp Neurol177(1):284-91.
- ✓ Arias CO, Verdugo DL, Feria VA, Millán AD, Gutierrez AA, Hernández CA, and Drucker CR (2004) Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions. J Neurosci Res 78:16-28.
- ✓ Armijo JA, and Herranz JL(2007) Politerapia racional en epilepsia I. Aspectos clínicos y farmacológicos. Rev Neurol(a); 45: 95-109 y (b); 45:163-173.
- ✓ Armstrong CM and Lobada A (2001) Amodel 4-aminopyridine action on K channels: Similarities to Tetraethylammonium ion action. Biophysical Journal81:895-904.
- ✓ Avanzini G and Frenceschettis S(2003) Cellular biology of epileptogéneis. Lancet 2, pp 33-42.
- ✓ Baker-Price L, and Persinger MA (2003) intermittent burst-firing weak (1μTesla) magnetic fields reduce psychometric depression in patients who sustained closed head injuries: A replication and electroencephalographic validation. Percept Mot Skills. 96: 965-974.
- ✓ Balasubramanian B, Pogozelski WR, Tullius TD (1998) DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. Proc Natl Acad Sci USA 95:9738-9743.
- ✓ Balcells(2001) La clínica y el laboratorio, 18a Edición, Editorial Masson, México.
- ✓ Baram TZ, Gerth A, Schult ZL (1997) Febrile Suizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. Dev. Brain R. 98:265-270.
- ✓ Barnes F, and Kwon Y (2005) A theoretical study of the effects of RF fields in the vicinity of membranes. Bioelectromagnetics. 26:118-124.
- ✓ Baudry M, and Bi X (2001) Neurotransmitters and Receptors; Mechanisms of Epileptogenesis and experimental Model of Seizures. The Treatment of Epilepsy Principles and Practice. Lippincott Williams & Wilkins 3er ed. pp 25-44.
- ✓ Bauréus KCLM, Sommarin M, Persson BRR, Salford LG, and Eberhardt JL (2003) Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. Bioelectromagnetic 24:395-402.
- ✓ Bear J, Lothman EW(1993) An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices.Epilepsy Res. 14(3):183-93.

- ✓ Bell GS, and Sander JW(2001) Epidemiology of epilepsy: the size of the problem. Seizure 10:306-314.
- ✓ Bellissimo MI, Armando D, Abdalla DSP, Ferreira EC, Cavalheiro EA, and Naffah Mazzacoratti MG(2001) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. Epilepsy Res46:121-128.
- ✓ Boyland F,and Chasseaud LF(1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Enzymol 32:173-219.
- ✓ Brigelius-Flohe R (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic Biol Med 27:951-965.
- ✓ Brocklehurst B, and McLauchlan KA(1996) Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. Int J Radiat Biol 69:3-24.
- ✓ Brown WC, Sawage AC (1981) Pharmacological actions of aminopyridines and related compounds. Pure Appl Pharmacol Sci. 2: 317-371.
- ✓ Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. Ital J Neurol Sci16:33-37.
- ✓ Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, and Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and Present. Trends Neurosci. 21:510-515.
- ✓ Céspedes ME, Hernández LI y Llopíz JN (1997) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev. Cub. Invest. Biomed15(2):10-16.
- ✓ Chance B, Schoener B, Oshino, R, Itshak F, and Nakase Y(1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. J Biol Chem254:4764-4771.
- ✓ Chance WT, Grossman CJ, Newrock R, Bovin G, Yerian S, Schmitt G, and Mendenhall C (1995) Effects of electromagnetic fields and gender on neurotransmitters and amino acids in rats. Physiol Behav 58:743-748.
- ✓ Chen HH, and Lee YF (2002) Neonatal toluene exposure selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drugs in juvenile rats. Pharmacol Biochem Behav 73:921-927.
- ✓ Cleary SF (1993) A review of in vitro studies: low-frequency electromagnetic fields.Am Ind Hyg Assoc 54(4):178-85.

- ✓ Commission on classification and terminology of the International League against epilepsy(1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 30(4):389-399.
- ✓ Danielson UH, Esterbauer H, and Mannervik B(1987) Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. Biochem J 247:707-713.
- ✓ Dichter M, and Wilcox K(1999) Excitatory Synaptic Transmission, Inhibitory Synapstic Transmission. EPILEPSY: The Comprehensive CD-ROM. Lippincott Williams & Wilkins.
- ✓ Dorado MC, Rugerio VC y Rivas AS(2003) Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM 46:229-235.
- ✓ Engel J (1996)Introduction to temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 26: 141-150.
- ✓ Engel J Jr (1989) Terminology and classifications. Seizures and epilepsy. (En Engel J. Philadelphia: FA Davis Company) 3-21.
- ✓ Esterbauer H, Schaur RJ, and Zoliner H(1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol Med 11:81-128.
- ✓ Eun JS, Ji HJ, Yoon HC, Won KK, Kwang HK, Jae HB, Jau SH, Yukio Y and Hyoung CK (2011) Role of oxidative stress in epileptic seizures. Neurchemistry Intern. 59:122-137.
- ✓ Fabene PF, Weiczner R, Marzola P, Nicolato E, Calderan L, Andrioli A, Farkas E, Süle Z, Mikaly A, and Sbarbati A(2006) Structural and functional MRI following 4-aminopyridine-induced seizures: A comparative imaging and anatomical study. Neurobiol Dis 21: 80-89.
- ✓ Feria VA, Castillo MS, Verdugo DL, Castellanos E, Orozco SS, Sánchez GC, and Drucker CR(1998) Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultraestructural comparative study. J Neurosci Res 53: 569-582.
- ✓ Fischer TW, Scholz G, Knoll B, Hipler UC, and Elsner P (2004) Melatonin suppresses reactive oxygen species induced by UV irradiation in leukocytes. J Pineal Res 37:107-112.
- ✓ Fisher RS(1989) Animal models of the epilepsies. Brain Res Rev14:245-278.
- ✓ Flora SJ(2007) Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol. Biol53(1):1-2.
- ✓ Gadelha Militão GC, Pinheiro Ferreira PM, and Mendes de Freitas R(2010) Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. Neurochemistry International56:16-20.

- ✓ Garcia TB, García MO, Clapes HS, Rodes FL y García PJC (1997) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. Rev. Cub. Invest. Biomed.14:10-14.
- ✓ Gluck MR, Jayatilleke E, Shaw S, Rowan AJ, and Haroutunian V(2000) CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. Epilepsy Research 39:63-71.
- ✓ Goodman EM, Greenebaum B, and Marron MT (1995) Effects of electromagnetic fields on molecules and cells.In Rev Cytol. 158:279-338.
- ✓ Habash RW, Bradsky LM, Leiss W, Krewski D, and Repacholi M (2003) Health risks of electromagnetic fields. Part I: Evaluation and assessment of electric and magnetic fields.Crit Rev Biomed Eng.31(3):141-195.
- ✓ Halliwell B(1997) Antioxidants and human disease. Nutr. Rev. 55:S44-S52.
- ✓ Halliwell B(1999) Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radic. Res. 31:261-272.
- ✓ Halliwell, B (2007) Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Trans., 35(PT5), 1147-1150.
- ✓ Halliwell B (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? Acta Neurol Scand Suppl. 126:23-33.
- ✓ Halliwell B(2006) Reactive Species and Antioxidants. Redex Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant physiology. 141:312-322.
- ✓ Hamanaka RB and Chandel NS(2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and díctate biological outcomes. Trends in Biochemical Sciences. Trends in Biochemical Sciences.35:505–513.
- ✓ Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. Endocrine 27:119–130.
- ✓ Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B(2003) Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms.Chronobiol Int. (6):921-62.
- ✓ Harsing Jr LG (2006) The Pharmacology of the Neurochemical Transmission in the Midbrain Raphe Nuclei of the Rat. Current Neuropharmacol. 4:313-339.

- ✓ Hernández HH, Cruces SH, Elías VD, and Verdugo DL (2009) Outgrowth on Chromaffin Cells Applying Extremely Low Frequency Magnetic Fields by Permanent Magnets. Arch Med Res.40(7):545-550.
- ✓ Hinchman CA, and Ballatori N (1994) Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. J Toxicol Environ Health 41(4):387-409.
- ✓ Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, and Dillon GH (2001) Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action. J Pharmacol Exp Ther. 298:986-995.
- ✓ Hubatsch I, Ridderstrom M, and Mannervik B(1998) Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. Biochem J. 330 (1):175-179.
- ✓ Imlay JA, and Fridovich I(1991) Isolation and genetic analysis of a mutation that suppresses the auxotrophies of superoxide dismutasedeficient Escherichia coli K12. Mol Gen Genet. 228:410-416.
- ✓ Janero DR(1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lípido peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic. Biol. Med. 9:515-540.
- ✓ Jefferys JG, and Whilttington MA(1996) Review of the role of inhibitory neurons in chronic epileptic foci induced by intracerebral tatenus toxin. Epilepsy Res. 26:59-66.
- ✓ Johansson LH, and Borg LAH(1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Anal. Biochem. 174:331-336.
- ✓ Jones RE, Heron JR, Foster DH, Snelgar RS, and Mason RJ, (1983) Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis. J. Neur. Sci. 60: 353-362.
- ✓ Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wy HY, and Wen ST (2004) Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. J Pineal Res 37:55–70.
- ✓ Juutilainen J(2003) Developmental effects of extremely low frequency electric and magnetic fields.Radiat Prot Dosimetry.106(4):385-390.
- ✓ Kähkönen S, and Ilmoniemi RJ (2004) Transcranial magnetic stimulation: Applications for neuropsychopharmacology. J. Psychopharmacol. 18(2):257-261.

- ✓ Kanno M, Matsumoto M, Togashi H, Yoshioka M, and Mano Y (2003) Effects of acute repetitive transcranial magnetic stimulation on extracellular serotonin concentration in the rat prefrontal cortex. J. Pharmcol. Sci. 93(4): 451-457.
- ✓ Kirkman HN, Galiano S, and Gaetani GF(1987) The function of catalase-bound NADPH. J Biol Chem. 262:660-666.
- ✓ Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J (2010)Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.Epilepsia.51(6):1069-1077.
- ✓ Lee EJ, Lee MY, Chen HY, et al. (2005) Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. J Pineal Res 38:42-52.
- ✓ Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, and Reiter RJ (2004) Melatonin and mitochondrial function. Life Sci 75:765–790.
- ✓ Lenaz G(1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. Biochem Biophys Acta 1366: 53-67.
- ✓ Lemeignan M, Millart H, Lamiable D, Molgo J, and Lechat P (1984) Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats.Brain Res. 304(1):166-169.
- ✓ Lineamientos para el tratamiento quirúrgico de la epilepsia, publicado por el Programa Prioritario de Epilepsia, 2004.
- ✓ Löscher W, Honack D, Fassbender CP, and Nolting B(1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models. Epilepsy Res. 8:171-189.
- ✓ Löscher W(2002) Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 50:105-123.
- ✓ Löscher W and Potschka H(2002) Role of Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. The J of Pharmac. And Experm. Therapeutics. 301:7-14.
- ✓ Löscher W, and Schmidt D (1988) Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. Epilepsy Res. 2(3):145-181.

- ✓ MacNamara JO(1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. J Neurosci. 14(6): 3413-3425.
- ✓ Maier CM and Chan PH(2002) Role of superoxide disputases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. The Neuroscientis. 8(4):323-334.
- ✓ Malstrom B, Andreasson L and Reinhammer B(1975) The Enzymes. Boyer P, editor. XIIB, Academic Press, New York,pp 533.
- ✓ Mathew B. and Grisham Ph. D. (1992) Reactive Metabolites of oxigen and nitrogen in biology and medicine. Medical Intelligence Unit. CRC Press. 79:135-136.
- ✓ Medina CL, MoralesVA, and Tapia R(2000) Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysisi and electroencephalographic study in a wake rats. Brain Res Bull. 53(3): 255-262.
- ✓ Mihaljevic B, Katusin RB, and Razem D. (1996) The reevalution of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanism aspects of the response. Free Radic. Biol. Med. 21;53-63.
- ✓ Mihály A, Bencsik K, and Solymosi T (1990)Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in the rat.J Neural Transm Gen Sect. 79(1-2):59-67.
- ✓ Mihály A, Shihab EA, Owunwanne A, Gopinath S, Ayesha A, and Mathew M(2000) Acute 4-aminopyridine seizures increase the regional cerebral blood flow in the thalamus and neocortex, but not in the entire allocortex of the mouse brain. Acta Physiol. Hung. 87:43-52.
- ✓ Mihály A, Szakács R, Bohata C, Dobó E, and Krisztin PB(2001) Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures. Epilepsy Res. 44:97–108.
- ✓ Miller AF (2004) Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. Curr Opin Chem Biol. (8):162-168.
- ✓ Miller FJ, and Schroeer D(1987) College Physics. Harcourt Brace Jananovich, San Diego, CA. 6th ed. 96-99.
- ✓ Morales VA, López PS, Medina CL, and Tapia R (1999) Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique.Neurosci Lett. 275(2):133-136.
- ✓ Muralikrishna RA and Hatcher JF. (2007) Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. Future Lipidol. 2(4): 403–422.

- ✓ Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, and Salvayre R(2008) Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. British Journal of Pharmacology. 153:6-20.
- ✓ Nistala R, Whaley CA, and Sowers JR(2008) Comprehensive Invited Review. Redox Control of Renal Function and Hypertension. 10(12):2047-2089.
- ✓ Ohkama H, and Ohishi N(1979) Assay for lipid peroxide, in animal tissues by the barbituric Acid Reaction. Analytical Biochemistry.95:351-358.
- ✓ Oroquieta JD, Arellana JI, Alonso L y Munoz A (2002) Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales y epileptogenicidad. Rev Neurol. 34: 401-408.
- ✓ Ossenkopp KP and Cain DP(1991) Inhibitory effects of powerline-frequency (60-HZ) magnetic fields on pentilenetetrazol –induced seizures and mortality in rats. Behav Brain Res. 44:211-216.
- ✓ Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, and Federici G(2003) Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pedriatric subjects.Clin. Chem. 47 (8):1467-1469.
- ✓ Peña F and Tapia R(2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels.Neuroscience. 101(3):547-561.
- ✓ Pérez GP y Pérez de Alejo JL (2000) MÉTODOS PARA MEDIR EL DAÑO OXIDATIVO. Rev Cubana Med Milit 29(3):192-198
- ✓ Portier C, and Wolfe MS (1998) NIEHS Working Group: Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and magnetic fields: NIEHS Working Group report. Research Triangle Park, NC (P.O. Box I Research Triangle Park 27709): National Institute of Environmental Health Sciences U.S. National Institute of Health U.S. Dept. of Health and Human Services Public.
- ✓ Prato FS, Carson JJL, Ossenkopp KP, and KavalierS M. (1995) Possible mechanisms by which extremely lowfrequency magnetic fields affect opioid function. The FASEB Journal. 9:807-814.
- ✓ Reilly PM and Bulkley GB(1990) Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen meyabolites. Br J Surg.77:1324-1325.

- ✓ Reiter RJ (1986) Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. J Neural Transm. (SuppL) 21:35-54.
- ✓ Reiter RJ (1991) Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev. 12:151-180.
- ✓ Reiter RJ, Machester LC and Tan DX (2010) Neurotoxins: Free radical mechanisms and melatonin protection. Current Neuropharmacology. 8:194-210.
- ✓ Reiter RJ, Sewerynek E, Melchiorri, Ortiz GG and Lewinski A (1995) Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. Eur J Pharmacol. 7;293(4):327-34.
- ✓ Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, and Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. J Biomed Res. 7:444-458.
- ✓ Rocha L, Briones M, Ackermann RF, Anton B, Maidment NT, Evans CJ, and Engel, JJr(1996) Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. Epilepsy Research. 26:105-113.
- ✓ Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM et al. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res 36:1-9.
- ✓ Rodríguez PJM, Menéndez LJR, and Trujillo LY, (2001) Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Días Soto. Rev. Cub. Med. Milit.30(1):36-44.
- ✓ Rogawski MA, and Barker JL(1983) Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium currente Ander voltaje clamp in spinal neuron. Brain Res. 280(1): 180-185.
- ✓ Rowe JD, Tchaikovskaya T, Shintani N, and Listowsky I(1998) Selective expression of a glutathione S-transferase subclass during spermatogenesis. J Androl. 19:558-567.
- ✓ Rubio Donnadieu F(1997) Aspectos generales y clasificación de la epilepsia, in Epilepsia (Feria Velasco A, Martínez de Muñoz D, and Rubio Donnadieu F, eds.). Cognos Editores S.A. de C.V., México, D.F. pp. 1-24.
- ✓ Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, et al. (1994) 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxido dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. J. Biol. Chem. 269(29):19163-19166.
- ✓ Sandyk R and Anninos PA(1992) Magnetic fields alter the circadian periodicity of seizures. Intern J Neurosci. 63:265-274.

- ✓ Sandyk R, Anninos PA, Tsagas N, and Derpapas K (1991) Pineal calcification and anticonvulsant responsiveness to artificial magnetic stimulation in epileptic patients. Intern J Neurosci. 60: 173-175.
- ✓ Sano M and Fukuda K (2008) Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. Circ Res. 21, 103(11):1191-3.
- ✓ Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, and Hayes JD(1997) Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. Biochem J. 326 (Pt 3):837-846.
- ✓ Solís H, López HE, Cortés GD(2008) La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. Arch Neurocien (Mex)13(3):195-201.
- ✓ Sykova E (2004) Diffusion properties of the brain in health and disease. Neurochem Int. 45: 453-466.
- ✓ Szente Mand Baranui A(1987) Mechanism of aminopyridine induced ictal seizure activity in the cat neocortex. Brain Res. 41:373-386.
- ✓ Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC et al. (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem 2:181-198.
- ✓ Tapia R, and Massieu L(1997) Neuroquimica de los procesos epilepticos: sinapsis inhibidoras y excitadoras. Epilepsia. 85-102.
- ✓ Tapia R, Medina-Ceja L, and Peña F(1999) On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. Neurochem Int. 34:23–31.
- ✓ Thomas LB, Steindler DA. (1991) Glial boundaries and scars: programs for normal development and wound healing in the brain. Neuroscientist. 1:142-154.
- ✓ Topal T, Pztas Y, Karkmaz A, et al. (2005) Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. J Pineal Res 38:272–276.
- ✓ Torres MCA, Perales SMI, Zúñiga CH, Carranza AE(2004) Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayo nativos de la altura. Ciencia e Investigación VII (1). Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- ✓ Uttara B, Singh AV, Zamboni P and Mahajan RT (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. Current Neuropharmacology. 7, 65-74.

- ✓ Vilar-Rojas C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ (1996) Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. Arch Med Res. 27:1-6.
- ✓ Velísková J, Velsek L, Moshé SL (1996) Subthalamic nucleus: a new anticonvulsant site in the brain.Neuroreport. 7(11):1786-1788.
- ✓ Visioli F, Colombo C, and Balli C. (1998) Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markes. Biochem Biophys Res Commun.245(2):487-489.
- ✓ Waldbaum S, and Patel M (2010) Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy.Epilepsy Res.1:23-45.
- ✓ Westphalen RI, Kwak NB, Dniels K and Hemmings H Jr (2011) Regional differences in the effects of isoflurane on neurotransmitter release. Neuropharmacology. 61(4):699-706.
- ✓ Wilce MC, and Parker MW(1994) Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta. 1-18.
- ✓ Witztum JI(1993) Role of oxidised low-density lipoprotein in atherogenesis. Br Heart J69:12-18.
- ✓ Won-Hee Park, Kwang-Sup Soh, Byungcheon Lee, and Myoung-Yun Pyo. (2008) 4 Hz Magnetic Field Decreases Oxidative Stress in Mouse Brain: A Chemiluminescence Study. Electromagnetic Biology and Medicine.27:165-172.
- ✓ Xu L, Rensing N, Yang X-F, Zhang HX, Thio LL, Rothman SM, Weisenfeld AE, Wong M, and Yamada KA(2008) Leptin inhibits 4-aminopyridine– and pentylenetetrazole-induced seizures and AMPAR-mediated synaptic transmission in rodents. J Clin Invest. 118(1):272-280.
- ✓ Young IS and McEnery J (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 29 (Pt 2): 358-362.
- ✓ Zhadin ML (1998) Combined action of static and alternating magnetic fields on ion motion in a macromolecule: Theoretical aspects. Bioelectromagnetics. 19: 279-292.
- ✓ Zorrilla GAE(2002) El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev. Cubana Invest Biomed. 21(3):178-185.

13. ANEXOS.

Congresos:

13.1 Anexo I.

FORO: SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, NOVEMBER 12-16, 2011.WASHINGTON, DC.

Effect of electromagnetic fields of extremely low frequency on oxidative stress induced by 4-aminopyridine in the brain of adult rats.

León I. Razo-Juárez [a,b], Marisa Cabeza-Salinas [b], Sandra Orozco-Suarez [a] and Misael González-Ramírez [a].

[(a)]Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F. [(b)]Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos.

Abstract

Introduction. It has been shown that exposure to electromagnetic fields of extremely low frequency (ELF-EMF) may be a potential therapy for the treatment and / or prevention of diseases related to oxidative stress as in epilepsy. To counteract the effect of generating free radicals oxidative stress, the cell has an endogenous antioxidant system carried out by enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), mainly, responsible for metabolizing species reactive oxygen (ROS). Excessive production of ROS oxidize polyunsaturated fatty acids hydroperoxides forming process called lipoperoxidation.

Objective. To determine the effects of the application of electromagnetic fields of extremely low frequency on the activity of different antioxidant enzymes in the brain of adult rats treated with 4-AP.

Materials and methods. We used adult male Wistar rats weighing approximately 240 g, were kept in standard animal care conditions at 22 °C ± 2 °C, with a period of 12h light-dark

conditions and free access to food and water. The seizures were induced by the drug 4-aminopyridine. Brain regions as: amygdala, hippocampus and cerebral cortex were used to quantify the antioxidant enzymes and cellular damage by commercial kits.

Results. In relation to the activity of superoxide dismutase showed a significant increase of 29% in the amygdala and hippocampus brain regions in treatments 1 and 46.34% at 24h, but not in the cerebral cortex showed only an increase of 22.64% in groups 1 h, while the 24 and 72h showed a decline. In relation to the enzyme catalase showed a general decrease in activity in brain regions examined. While the activity of the enzyme glutathione s-transferase showed increased (28.83%) activity mainly in groups 1h and 24h (55.88%) in the regions studied, while in the 72h group decreased activity. As the concentration of hydroperoxides in the samples the results showed a significant decrease only in groups 72 hours in different brain regions, this is probably due to increased activity of the enzyme SOD and CAT in the groups due to the activity of electromagnetic fields.

Conclusion. Our results suggest that application of electromagnetic fields of extremely low frequency alter the activity of antioxidant enzymes in different times and in different brain regions.

13.2 Anexo II.

FORO: XXXIV CONGRESO ANUAL DEL CAPITULO MEXICANO DE LA LIGA INTERNACIONAL CONTRA LA EPILEPSIA.SEPTIEMBRE 28 AL 2 DE OCTUBRE, 2011. OAXACA, OAX.

Efecto de los campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia sobre el estrés oxidativo inducido con 4-aminopiridina en cerebro de ratas adultas.

León I. Razo-Juárez [a,b], Marisa Cabeza-Salinas [b], Sandra Orozco-Suarez [a] y Misael González-Ramírez [a].

[(a)]Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F. [(b)]Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos.

Resumen.

Introducción. Se ha demostrado que la exposición a los campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia (CEM-EBF), pueden funcionar como una terapia potencial para el tratamiento y/o prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como la epilepsia. La célula posee un sistema antioxidante endógeno dado por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) principalmente; encargadas de metabolizar las especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción excesiva de ROS daña a los ácidos grasos poliinsaturados proceso denominado lipoperoxidación.

Objetivo. Determinar el efecto de los campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia sobre la actividad enzimática antioxidante en el cerebro de ratas adultas tratadas con 4AP.

Materiales y métodos. Ratas Wistar macho adultas de 240 g de peso; fármaco 4-aminopiridina (4 mg/kg), solución amortiguadora de HEPES, bobina solenoide, tejidos cerebrales: Amígdala, hipocampo y corteza; kits de ensayo para hidroperóxidos de lípido

(LPO), Glutatión S-transferasa (GST), Catalasa (CAT), así como para la enzima Superóxido dismutasa (SOD).

Resultados. La superóxido dismutasa mostró un incremento significativo (42.33%) en el grupo CEM+4AP 1h en la amígdala al comparar los grupos 4AP 1h vs CEM+4AP 1h. En el hipocampo los grupos 4AP 1h vs CEM+4AP 1h mostraron un incremento de la actividad de la enzima SOD del 26.71% en el grupo CEM+4AP 1h. En la corteza los grupos 4AP 1h vs CEM+4AP 1h mostraron una disminución en la actividad del 36.77%; 72h después disminuyó un 58.34% en el grupo CEM+4AP. La catalasa en la amígdala mostró un disminución en la actividad del 9.49% en el grupo CEM+4AP 1h. En el hipocampo el grupo CEM+4AP 1h mostró una baja en la actividad del 37.46%. La glutatión s-transferasa mostró un incremento de su actividad en los grupos de 1h (28.83 %) y 24h (55.88 %), 72h después la actividad disminuyo. Los hidroperóxidos mostraron una baja significativa en los grupos 72 h debidos probablemente al incremento de la actividad de las enzimas SOD, CAT y GS-T por efecto de los CEM-EBF.

Conclusión. Nuestros resultados sugieren que los CEM-EBF modifican la actividad enzimática antioxidante en las diferentes regiones cerebrales estudiadas contribuyendo con ello a la reducción del estrés oxidativo y evitar así la lipoperoxidación neuronal.