



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Proyecto genérico correspondiente: Evaluación de productos relacionados a la salud.

Título: Evaluación del efecto antioxidante y anticonvulsivo en rata cuando se administra dexametasona en un modelo de epilepsia inducido por ácido kaínico.

Proyecto de Servicio Social.

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

Alumno: Pérez Juárez Ángel Manuel

Matricula: 2132030303

Asesor interno: Dra. Tomasa Verónica Barón Flores, 26848

Asesor Externo: Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz, 4125449

Fecha de inicio: 30 de Octubre de 2017

Fecha de entrega: 30 de Abril de 2017

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	1
Tipo de crisis	2
Clasificaciones	2
Clasificación internacional de las crisis epilépticas	2
Clasificación Internacional de las Epilepsias y Síndromes epilépticos	3
Fisiopatología	4
Tratamiento	5
Dexametasona	6
Mecanismo de acción	7
Glutación oxidado y reducido	7
Ácido Kaínico	9
Mecanismo de ácido kaínico	10
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
General	11
Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
5. RESULTADOS	13
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	15
7. DISCUSIÓN	16
8. CONCLUSIÓN	17
9. REFERENCIAS	17

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, siendo superada solamente por el accidente vascular cerebral 3. Afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. La incidencia de esa patología varía de acuerdo con la edad, sexo, raza, tipo de síndrome epiléptica y condiciones socioeconómicas. ¹

La epilepsia afecta a un 0,5-1% de la población general, con dos picos, uno en la infancia y otro en la vejez. Así, la incidencia de la epilepsia en el anciano es elevada, entendiéndose como tal la que se inicia en personas mayores de 60-65 años, excluyéndose las que comienzan en edades más tempranas y permanecen en este grupo etario.

Las crisis epilépticas son consecuencia de un desequilibrio entre los procesos de excitación e inhibición neuronal del SNC, que tiene como consecuencia una descarga neuronal anómala, siendo muchos los factores que pueden alterar dicho equilibrio. Existen diferencias entre los individuos en cuanto a la susceptibilidad o umbral para sufrir una crisis epiléptica, lo que sugiere la existencia de factores endógenos subyacentes, entre ellos factores genéticos y, por otro lado, que determinados procesos o patologías tienen muchas probabilidades de producir un trastorno epiléptico crónico. ²

El paciente epiléptico presenta una mayor mortalidad por muerte súbita inesperada, estado del mal epiléptico y un elevado índice de suicidio. La enfermedad se caracteriza por un estado de hiperactividad de las neuronas y circuitos cerebrales, capaces de generar descargas eléctricas sincronizadas, pudiendo manifestarse de formas diversas, desde descargas interictales electroencefalográficas hasta brotes prolongados con crisis epilépticas o, en casos más graves, asumiendo la forma del estado del mal epiléptico, condición caracterizada por crisis epilépticas aisladas prolongadas o por crisis repetidas en intervalos cortos. La descarga interictal corresponde en el nivel celular, a las descargas paroxísticas sincronizadas de determinada población neuronal, representadas por brotes potenciales de acción.

MARCO TEORICO

La epilepsia se define como un trastorno caracterizado por la recurrencia de crisis epilépticas. Estas, a su vez, son el resultado de descargas excesivas y desordenadas de neuronas cerebrales. Las crisis epilépticas pueden ser convulsivas y no convulsivas. Las primeras son aquellas en las cuales hay

movimiento (ej. Crisis parciales motoras, o crisis tónico-clónicas generalizadas). En las no convulsivas, no hay movimiento, pero se presentan igualmente descargas anormales, responsables del fenómeno observado.

Tipos de crisis

Crisis parcial: son aquellas que se generan en un área específica del cerebro (Ej. lóbulo frontal izquierdo).

Crisis Generalizada: son aquellas en las cuales hay compromiso simultáneo de ambos hemisferios cerebrales.

Síndrome epiléptico: se define por la asociación de diferentes crisis epilépticas, el estado neurológico intercrítico del paciente y las características electroencefalográficas ictales e interictales.

Clasificaciones

Hay dos grandes clasificaciones que utilizamos en la actualidad en epilepsia: La clasificación de las Crisis Epilépticas y la de las Epilepsias y Síndromes Epilépticos.

Clasificación Internacional de las crisis epilépticas:

También conocida como Clasificación de Kioto, ya que en esa ciudad japonesa se reunió el Comité de Clasificación y Terminología proponiendo esta clasificación en 1981. En ella se tienen en cuenta los criterios clínicos (crisis epilépticas) y electrofisiológicos (Electroencefalograma).

Ha sido de gran utilidad, marcó una pauta en el mundo entero y es universalmente aceptada y empleada por quienes trabajan en epilepsia.

Ha permitido, entre otras cosas, disponer de un vocabulario específico y de una terminología unificada que permiten llevar a cabo estudios epidemiológicos más uniformes.

Al clasificar de manera correcta a un paciente, se puede elegir el (o los) fármacos más adecuados para su manejo, informarlo a él o a sus padres, si se trata de un menor, sobre el tiempo aproximado que debe recibir tratamiento y sobre el pronóstico de la entidad.

Previamente a la utilización de esta clasificación, empleábamos con frecuencia el término "paciente con síndrome convulsivo", lo cual era cuando menos difuso, ya que, para empezar, no todas las crisis

epilépticas son convulsivas y, en segundo término, el sólo tipo de crisis que presenta un paciente no es criterio suficiente para clasificarlo.

Ejemplo de lo anterior puede constituir un niño que inicie un cuadro clínico caracterizado por crisis mioclónicas pluricotidianas. Varias veces al día el paciente podría tener desde una epilepsia mioclónica benigna del lactante, de excelente pronóstico, hasta una entidad del grupo de las epilepsias mioclónicas progresivas, generalmente de mal pronóstico y algunas de ellas potencialmente fatales.

Clasificación Internacional de las Epilepsias y Síndromes epilépticos

Factores importantes como etiología, aspectos terapéuticos más precisos y pronóstico, no están contemplados en la clasificación de Kioto.

Conscientes de esto y con valiosos aportes de expertos de muchas partes del mundo, se llegó a la Clasificación de la Epilepsias y Síndromes Epilépticos en 1985, conocida también como Clasificación de Hamburgo. Esta Clasificación tuvo modificaciones en 1989.

En esta clasificación se emplea, como uno de los puntos esenciales, la crisis como expresión Clínica de la Epilepsia. Tiene además en cuenta, la etiología de la epilepsia y las divide en Primarias o Idiopáticas y Secundarias o Sintomáticas.

En las epilepsias idiopáticas la única etiología presumible es hereditaria. La palabra proviene del término griego "ιδιος", que quiere decir propio, personal. Las epilepsias idiopáticas se diagnostican de acuerdo con la edad de aparición, al tipo de crisis, a los hallazgos electroencefalográficos y se presumen de etiología genética.

Las epilepsias sintomáticas son aquellas en las cuales las crisis epilépticas son el resultado de una patología cerebral. Esta puede estar claramente definida (Ej.: encefalopatía hipóxico-isquémica, secuelas de neuroinfección etc....) o eventualmente puede haber una sospecha clínica, pero no ha podido demostrarse la patología con los exámenes paraclínicos realizados. En este tipo de casos, se emplea el término epilepsia criptogénica.

Su otro gran eje las divide en epilepsias o síndromes epilépticos generalizados: tienen crisis en las que el inicio indica compromiso simultáneo de ambos hemisferios, y epilepsias o síndromes epilépticos parciales (focales o locales): el tipo de crisis y los hallazgos paraclínicos indican un origen focal de las crisis.

FISIOPATOLOGÍA

Se han planteado diferentes hipótesis para explicar la génesis de las crisis epilépticas:

- 1) Alteraciones neuronales
- 2) Alteraciones en los neurotransmisores
- 3) Kindling

1) Alteraciones neuronales:

Las neuronas que generan descargas epilépticas tienen la particularidad de producir potenciales de acción de mayor voltaje que las demás neuronas. Ante un estímulo determinado pueden generar "potenciales de acción gigantes", cuya expresión clínica puede ser una crisis epiléptica.

Por otra parte, es bien conocido que las neuronas están genéticamente codificadas para generar potenciales de acción ante diferentes estímulos. Sin embargo, si estos no son lo suficientemente intensos, no se logrará generar el potencial. El punto al cual debe llegar el estímulo para generar el potencial de acción se denomina "umbral de la neurona." Entre más alto sea este, más intenso tendrá que ser el estímulo para generar la descarga. Se ha planteado entonces que las neuronas que generan crisis epilépticas tienen un umbral muy bajo y esto facilita la aparición de crisis.

Parte de las estrategias farmacológicas, para controlar esta entidad, es administrar fármacos que incrementan el umbral de las neuronas, u otros que bloquean los canales del calcio, disminuyendo en esta forma la amplitud del potencial de acción.

Alteraciones en los neurotransmisores:

En el cerebro hay neurotransmisores inhibidores y excitadores. El principal neurotransmisor inhibidor en el sistema nervioso es el ácido gama-aminobutírico, denominado GABA. A su vez, los principales aminoácidos excitatorios son el ácido glutámico y el aspartato.

Se ha planteado que en la epilepsia podría haber un desequilibrio entre estos neurotransmisores, existiendo un déficit de GABA o un exceso de aminoácidos excitatorios. De hecho, algunos fármacos antiepilépticos actúan incrementando los niveles de GABA y se conocen como medicamentos "gabaérgicos". Otros medicamentos bloquean la acción de los neurotransmisores excitatorios.

Kindling:

Este fenómeno logra producir crisis epilépticas en forma experimental. Consiste en aplicar a un grupo neuronal, durante breves períodos de tiempo (no más de un segundo), estímulos eléctricos repetitivos, de baja intensidad. Los estímulos se usan con diferentes intervalos de tiempo (2 a 24 horas). Inicialmente esto lleva a generar en dichas neuronas descargas que se visualizan en el electroencefalograma (EEG) pero sin ninguna manifestación clínica.

Posteriormente, la aplicación de estos mismos estímulos generará descargas de mayor voltaje en el EEGs y producirá diferentes manifestaciones clínicas en el sujeto de experimentación, hasta llegar incluso a producir una convulsión.

Si se deja de estimular en ese momento, el sujeto podrá llevar una vida normal, pero si se vuelve a estimular incluso mucho tiempo después, (en estudios hasta tres años después) se volverán a generar descargas acompañadas de manifestaciones clínicas.

Si al llegar al punto en el que el estímulo genera manifestaciones clínicas se sigue estimulando el tejido nervioso, este descargará luego espontáneamente, sin necesidad de ningún tipo de epilepsia. Se genera en esta forma, tejido epileptogénico.³

Tratamiento

Por más de 80 años, el tratamiento más eficaz para las personas que padecen de epilepsia (condición caracterizada por ataques o convulsiones) ha sido el uso de medicamentos que evitan o controlan los ataques. Estos medicamentos son conocidos como agentes anticonvulsivos o medicamentos antiepilépticos (o también llamados AED, por sus siglas en inglés). Si bien los medicamentos no curan la epilepsia, permiten que muchas personas disfruten de una vida normal, activa y completamente libre de ataques. Para algunos pacientes, los medicamentos no son 100% efectivos y pueden continuar sufriendo algunos ataques, aunque con menor frecuencia. Cuando los medicamentos no logran el efecto deseado, los médicos prueban métodos de tratamiento alternativos. En los niños, por ejemplo, la dieta cetogénica (una dieta rica en grasas baja en carbohidratos, con control y restricción de calorías) puede ser una opción. Para otros pacientes, el médico podría recomendar una cirugía del cerebro o la estimulación del nervio vago (que consiste en la aplicación de descargas eléctricas al nervio del cuello que conecta con varias zonas del cerebro comprometidas por la epilepsia).⁴

Fármacos

Barbituricos: Fenobarbital y Pentobarbital. Actúan sobre el receptor GABA_A aumentando la inhibición mediada por el neurotransmisor. Dosis: 2-4mg/kg/día

Hidantoínas: Acatan inhibiendo los canales de Na⁺. Dosis: 3-5mg/kg/día

Benzodiazepinas: Aumentan el flujo de iones Cl por la apertura del receptor GABA_A. Los más usados son del Clonazepam, Diazepam y Clobazam por ser de mayor potencia.

Iminostilbenes: Carbamacepina. Actúan inhibiendo los canales de Na⁺. Dosis 10mg/kg/día.⁵

Dexametasona

La dexametasona y sus derivados, dexametasona fosfato sódico y dexametasona acetato son glucocorticoides sintéticos utilizados como antiinflamatorios e inmunosupresores. La dexametasona no tiene prácticamente actividad mineralcorticoide y por lo tanto no puede ser usada en el tratamiento de la insuficiencia adrenal. La dexametasona es considerada el corticoide de elección para tratar el edema cerebral ya que es el que mejor penetra en el sistema nervioso central. Como glucocorticoide, la dexametasona es unas 20 veces más potente que la hidrocortisona y 5 a 7 veces más potente que la prednisona. Además, es uno de los corticoides de acción más prolongada. Su acción antiinflamatoria se atribuye a que induce la síntesis de macrocortina, la cual inhibe a la fosfolipasa A₂ y, en consecuencia, a todo el proceso de síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos; además, suprime la emigración leucocitaria, estabiliza la membrana liposómica, reduce la actividad de los fibroblastos, revierte los efectos capilares de la histamina e inhibe la formación de anticuerpos. Su actividad glucocorticoide incluye, además, efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. La acción sobre los primeros consiste en incremento de la gluconeogénesis y en disminución del uso periférico de la glucosa, lo que da lugar a elevación de la glucemia; además, acumulación de carbohidratos que promueven su almacenamiento en forma de glucógeno, principalmente en el hígado. La acción sobre los lípidos incluye lipólisis y redistribución de los ácidos grasos del tejido adiposo. Por último, la acción sobre el metabolismo de las proteínas da lugar a aumento del catabolismo proteínico originando un balance negativo de nitrógeno. Igual que la hidrocortisona, sus efectos se atribuyen a la acción sobre receptores citoplásmicos específicos que promueven la síntesis de diversas enzimas. Se absorbe

bien tanto desde el tubo digestivo como de los sitios de aplicación local. Su vida media biológica es de 36 a 72 h. Se excretan metabolitos conjugados hidrosolubles de dexametasona en la orina. ⁶

Mecanismo de la Dexametasona

Los glucocorticoides son hormonas naturales que previenen o suprimen las respuestas inmunes e inflamatorias cuando se administran en dosis farmacológicas. Los glucocorticoides libres cruzan fácilmente las membranas de las células y se unen a unos receptores citoplasmáticos específicos (se difunde a través de las membranas celulares y forma complejos con receptores citoplasmáticos específicos. Después estos complejos penetran en el núcleo de la célula, se unen al ADN (cromatina) y estimulan la transcripción del ARN mensajero (ARNm) y la posterior síntesis de varias enzimas) induciendo una serie de respuestas que modifican la transcripción y, por tanto, la síntesis de proteínas. Estas respuestas son la inhibición de la infiltración leucocitaria en el lugar de la inflamación, la interferencia con los mediadores de la inflamación y la supresión de las respuestas inmunológicas.

En el estatus epiléptico (ataque repentino por el incumplimiento o lesiones) se usa la Dexametasona bajo sospecha de una lesión o por un edema cerebral. La dexametasona es generalmente considerada como el esteroide de elección debido a su efecto mineralocorticoide mínimo y su vida media larga.

También aumentan la síntesis de Lipomodulina (macrocortina), inhibidor de la liberación de Ácido araquidónico (ayuda a la integridad de la membrana mitocondrial) a partir de los fosfolípidos de membrana que es mediada por la fosfolipasa A2, con la consiguiente inhibición de la síntesis de mediadores de la inflamación derivados de dicho ácido (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Las acciones inmunosupresoras también pueden contribuir significativamente al efecto antiinflamatorio. (cuba) EcuRed. Dexametasona. ⁷

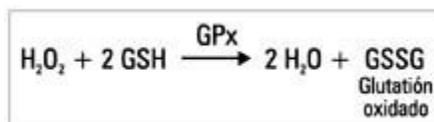
Glutati6n oxidado y reducido

Las especies reactivas del oxígeno constituyen átomos, iones y moléculas con uno o más electrones impareados en el orbital más externo; así como moléculas derivadas del oxígeno que tengan alta capacidad reactiva. Estas especies pueden provocar daño en diferentes tejidos al interactuar con moléculas de importancia biológica. Por su potencial efecto destructivo el organismo utiliza potentes mecanismos para evitar la acumulación de estas formas radicálicas; entre éstos se encuentran medios antioxidantes endógenos constituidos por algunos sistemas enzimáticos y otros

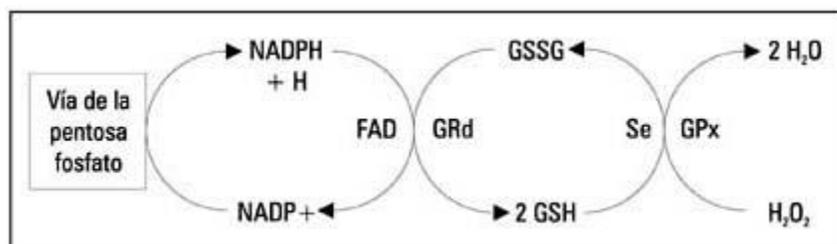
exógenos constituidos por algunas vitaminas. Uno de estos sistemas antioxidantes es el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa; el glutatión reductasa.

La Glutatión reductasa permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H₂O₂; este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia. El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance REDOX de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular.⁸

Los cambios de concentración de GSH en sangre podrían dar una medida del estrés oxidativo *in vivo*. La importancia de sus funciones dentro de los sistemas biológicos ha dado lugar a la existencia de un sistema GSH que incluye además enzimas relacionadas con su metabolismo, responsables del mantenimiento de su estado REDOX en condiciones fisiológicas. La oxidación enzimática del GSH se produce como producto de la actividad del glutatión peroxidasa (GPx), tal como se describe a continuación.



El glutatión oxidado (GSSG) es luego reducido por el glutatión reductasa (GRd), que utiliza la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), proveniente de la vía pentosa fosfato como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH/GSSG.



El GSH está sujeto a un constante recambio en el organismo; hígado, riñones, pulmones, corazón, intestinos y músculos son los principales órganos responsables de su homeostasis.⁹

En las células y tejidos sanos del cuerpo humano, más del 90 % de glutatión total se encuentra en la forma reducida (GSH) y menos del 10 % se encuentra en la forma disulfuro (GSSG), por lo tanto, un aumento de la proporción entre GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo

El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato. Es un antioxidante, y protege a las células de toxinas tales como los radicales libres.¹⁰

Ácido kaínico

Diversos hallazgos experimentales y clínicos relacionados con la posible toxicidad de los aminoácidos excitadores han dado lugar a la teoría excitotóxica, que postula que los niveles excesivos de glutamato endógeno o la hipersensibilidad de sus receptores se relacionan con la degeneración neuronal.¹¹ La excitotoxicidad es el mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. Esta provoca la entrada excesiva de calcio (Ca²⁺) a la célula, que es secuestrado por la mitocondria. Ello provoca un incremento del calcio mitocondrial, que provoca la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, la activación de proteasas, fosfolipasas, el óxido nítrico sintasa y endonucleasas, y la inhibición de la síntesis de proteínas.¹² Los modelos de excitotoxicidad en animales adultos más utilizados son el del ácido kaínico y la pilocarpina: modelos de epilepsia del lóbulo temporal, inducidos por la inyección unilateral o sistémica de uno de estos compuestos, en dosis convulsionantes que provocan daño excitotóxico en las neuronas piramidales del hipocampo y en la región hilar. El daño depende de la dosis, la especie y la cepa animal; pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de las fibras

gliales. Por ese motivo, los modelos de administración sistémica de ácido kaínico o pilocarpina se consideran adecuados para el estudio de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas o estado epiléptico, cuyo sustrato neuroanatómico es la esclerosis temporal mesial.¹³

El ácido kaínico (KA) es capaz de generar excitotoxicidad en las células neurales con ello acelerar los procesos que preceden a la apoptosis, la excitotoxicidad consiste en un exceso de liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato y ha sido reconocido como causa de daño neural en diferentes condiciones patológicas. Las lesiones con KA inducidas tienen como consecuencia la muerte celular, que puede reflejarse en cambios neuroquímicos y alteraciones conductuales.

Mecanismo del ácido kaínico

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la lesión consiste en la sobreactivación de receptores tipo NMDA/AMPA que aumentan el calcio intracelular conduciendo finalmente a la apoptosis.

Uno de los primeros cambios que ocurren después de la administración de ácido kaínico es la inducción de ARN mensajero (ARNm) y la expresión de proteínas de choque térmico de diferentes pesos moleculares (HSP27, HSP70 y HSP72). Esta última se expresa constitutivamente en el cerebro de los mamíferos, y se sobre expresa en las poblaciones neuronales sensibles del hipocampo. La expresión de estas proteínas parece prevenir el plegamiento anormal de proteínas de nueva síntesis en las poblaciones vulnerables al ácido kaínico. Durante las dos semanas siguientes a la administración, esas proteínas se transportan por el árbol dendrítico y a lo largo de los axones hacia las zonas más distales. La HSP70 y la HSP72 tienen una función protectora, aunque no consiguen rescatar a las células de la muerte excitotóxica. La sobreexpresión de HSP27 y HSP70 in vivo protege del daño excitotóxico, mientras que los niveles excesivamente altos de la HSP72 pueden ser nocivos para las células.

La excitotoxicidad provocada con ácido kaínico por vía intraperitoneal también induce la expresión del ARNm de la caspasa 3 y el aumento de la expresión de procaspasa 3 en algunas neuronas de las regiones vulnerables del hipocampo. Unas pocas neuronas expresan el fragmento activo (escindido) de 17 kDa de la caspasa 3. Ello indica la participación de la vía de las caspasas en algunas neuronas del hipocampo, lo que revela muerte celular con componente apoptótico en subpoblaciones del hipocampo.¹⁴

Justificación

La epilepsia es un padecimiento crónico recurrente, en México su prevalencia oscila entre 1.8 a 2 % lo que representa más de un millón de pacientes. El 76% de los epilépticos inician su padecimiento

antes de la adolescencia; por lo que la Organización Mundial de la salud (OMS) reconoce a la epilepsia como un problema de salud pública. De acuerdo con la OMS, la epilepsia es la presentación crónica, recurrente de fenómenos paroxísticos por descargas eléctricas anormales en el cerebro (crisis epilépticas) que tiene manifestaciones clínicas variadas y causas diversas.

Aproximadamente un 10% de la población presenta un solo episodio convulsivo durante la vida. En esa situación, la utilización de anticonvulsivos no está indicada. Después del apareamiento de una segunda crisis convulsiva, el diagnóstico de epilepsia se confirma iniciándose la rutina del tratamiento con fármacos antiepilépticos. La elección del anticonvulsivo debe hacerse de acuerdo con el tipo de crisis, la eficacia y los efectos colaterales, y siempre que sea posible, utilizada en monoterapia, o sea, el objetivo del tratamiento farmacológico es el control de las convulsiones sin efectos colaterales. Es importante destacar, que la mayoría de los efectos adversos de los anticonvulsivos es dosis dependiente, eso significa que la disminución de la dosis del fármaco reduce la intensidad de los efectos colaterales, sin necesidad de suspender el fármaco.¹⁵

Los glucocorticoides son frecuentemente utilizados para el tratamiento de pacientes con alteraciones neurooncológicas. Los glucocorticoides o corticosteroides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona).¹⁶ La indicación más frecuente del uso de glucocorticoides es en tumoraciones cerebrales con el objetivo de reducir el edema peritumoral. Está condición es frecuentemente encontrada en una variedad de tumoraciones cerebrales, incluyendo gliomas de alto grado en un 80%, meningiomas en un 20%, linfomas cerebrales en un 10% y metástasis cerebrales en un 20 a 40% y metástasis leptomeningeadas o dúrales en un 10%. Los meningiomas son tumores meningoepiteliales originados de células aracnoideas, de crecimiento lento (aproximadamente 2 mm por año), su base puede infiltrar a la duramadre, destruir leptomeninges y penetrar al hueso adyacente. Se presentan con una frecuencia mundial de 8.4 casos por cada 100,000 habitantes, pico máximo de aparición entre la quinta y sexta décadas de la vida, con predominancia en mujeres.¹⁷

La dexametasona es generalmente considerada como el esteroide de elección debido a su efecto mineralocorticoide mínimo y su vida media larga.

OBJETIVOS

GENERALES

Evaluar los niveles de glutatión en hipocampo después de la administración de Dexametasona en un modelo basado en daño neuronal y crisis provocadas por el ácido kaínico en ratas macho de cepa Wistar.

ESPECIFICO

-Evaluar el efecto de la administración de Dexametasona por el conteo de movimientos tónicos crónicos generalizados provocados por el Ácido kaínico.

-Valorar el efecto de la dexametasona como antioxidante en un modelo epiléptico provocado por el ácido kaínico.

METODOLOGÍA

El proyecto será realizado en el laboratorio de Neurofarmacología Molecular de la UIDIS en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Se utilizarán ratas del género Macho, cepa Wistar de peso entre 200 a 250mg. Las ratas son divididas en cuatro grupos los cuales tendrán 8 ratas en cada uno.

Las ratas serán administradas con Dexametasona 2mg/kg, por via durante 5 días. En el 5 día se le administrara el ácido kaínico 10mg/Kg, dos horas después de la administración de dexametasona y se evaluaran los efectos durante de 2h Se observará la latencia de la primera crisis convulsiva, de igual forma los movimientos tónicos generalizados, así como las sacudidas de perro las cuales son características del ácido kaínico. Finalmente, las ratas serán sacrificadas por el método de decapitación, se extraerá el cerebro del cual se evaluarán los niveles de glutatión de ambos lóbulos y su zona requerida: hipocampo.

Tabla 1. Diseño de los grupos de ratas a evaluar

Grupo	Control	Descripción
1	Negativo	Vehículo de ácido kaínico + vehículo de dexametasona
2		Dexametasona + vehículo de ácido kaínico
3	Positiva	Vehículo de Dexametasona + + Ácido kaínico
4		Dexametasona + ácido kaínico

El GSH es el principal antioxidante endógeno no enzimático en el SNC. Medir sus niveles constituye un buen marcador de estrés oxidativo cuando éstos son disminuidos por algún trastorno agudo como la epilepsia. Las ratas de todos los grupos se sacrificarán por decapitación las 24 h después de la administración del ácido kaínico y los niveles de GSH se evaluarán. El hipocampo, estriado y corteza de ambos lóbulos de cada animal se utilizará para medir el contenido de GSH presente en

el tejido. El estándar de glutatión reducido se preparará cada vez que se vaya a utilizar con fosfato de sodio 0,1 M, 5 mm de EDTA (pH 8) y se mantendrá en hielo hasta su uso. La solución de o-ftaldehído (OPA) se preparará diariamente en metanol absoluto grado reactivo justo antes de su uso.

Las muestras se homogenizarán en 3.75 ml de amortiguador de fosfatos-EDTA (pH 8.0) + 1 ml de HPO₃ (25%). Se centrifugarán a 3000 x g por 15 min y el sobrenadante se separará.

A 500 µl del sobrenadante se agregarán 4.5 ml de amortiguador de fosfatos + 100 µl de OPA. Las muestras se incubarán a temperatura ambiente por 15 min. y la señal fluorescente se analizará por espectrofotometría de luminiscencia a 420 nm de emisión y 250 nm de excitación. Los resultados se expresarán como µg de GSH/mg de proteína.) en un espectrofotómetro de UV/visible a 500 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En ambos grupos se realizará un análisis exploratorio de los datos para determinar si existe o no una distribución normal y si las varianzas presentan homogeneidad. Al finalizar los análisis, se empleará estadística paramétrica, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey, esta prueba para los marcadores de inflamación, y ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett para evaluar la recuperación funcional motora.

Todos los datos serán analizados con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 19.0.

Glutatión en celda

Después de la administración, el hipocampo es homogenizado en 12ml de PB-EDTA.

La mezcla es centrifugada a 12,000 rpm por 30min a 4° C

El sobrenadante es mantenido en un tubo y conservado a 4° C. Se desecha el sedimento.

Determinación de GSH

Una alícuota de sobrenadante es diluida 1:10 con PB-EDTA.

La mezcla se lleva a vortex y se deja reposar por 15min a temperatura ambiente.

La fluorescencia es determinada a 350nm de excitación y 420nm de emisión.

Calibración de la curva

La curva de calibración es preparada usando 5µg/ml de GSH Stock de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo/reactivo	1	2	3	4	5	6
PB-EDTA	1900ml	1880ml	1860ml	1820ml	1780ml	1700
GSH-Stock	0	20	40	80	120	200

OPA	100	100	100	100	100	100
GSH final	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.5

Determinación de GSSG

A una mezcla de 100µl de N-ethylmaleimida (NEM) y 250µl de sobrenadante se incuba por 30min a temperatura ambiente

Después es agregado 2.150 de NaOH 0.1M y se lleva al vortez

Las muestras se corren por duplicado, 600ml de la mezcla se agregan a un tubo que contiene 1.3ml de NaOH 0.1M y se mezcla.

Después se le agrega 100ml de OPA y 15min después se determina la florescencia a 350nm de excitación y 420nm de emisión.

Tubo/reactivo	1	2	3	4	5	6
NaOH 0.1M	1900	1880	1860	1820	1780	1700
GSSG Stock	0	20	40	80	120	200
OPA	100	100	100	100	100	100
GSSG	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.5

Curva estándar para la cuantificación de GSH

Curva	GSH (sol. Trabajo)	Buffer (µ/ml)	Concentración (µ/ml)
A	0	1000	0.0093
B	1.875	998.125	0.01875
C	3.75	996.25	0.0375
D	7.5	992.5	0.075
E	15	985	0.15
F	30	970	0.3
G	60	940	0.6
H	120	880	1.2
I	240	760	2.4
J	480	520	

Buffer: 0.1M de Fosfato de sodio- EDTA 0.005MpH 8

Para 250ml de Buffer:

Fosfato monobásico monohidratado= 3.45g

Fosfato dibásico dodecahidratado= 8.955g

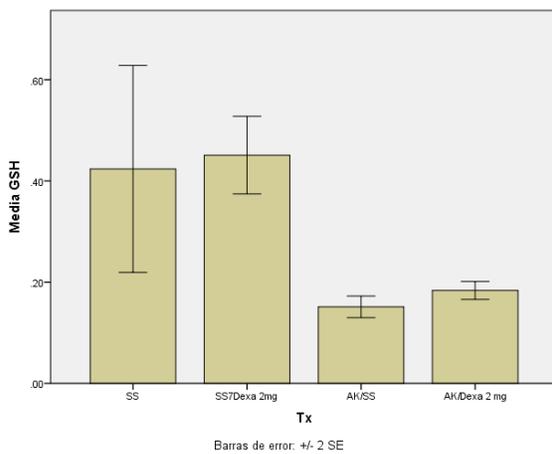
EDTA= 0.465ml

Diluirlos en agua desionizada, ajustar pH a 8 y aforar a 250ml

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Niveles de glutatión reducido ($\mu\text{/ml}$)

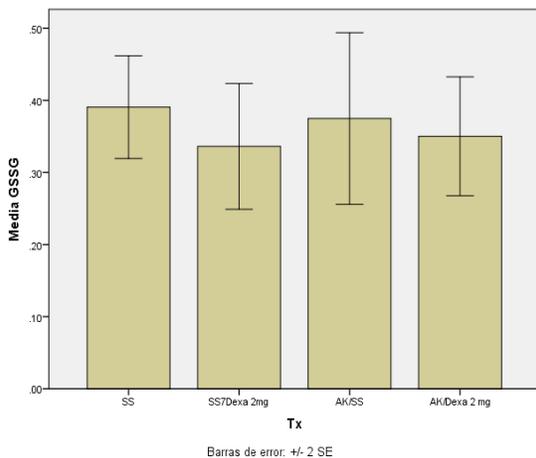
Grafica 1



En la gráfica 1 se observa una disminución en el grupo de ácido kaínico/ solución salina, según la literatura el GSH está presente en un 90% por lo que un aumento o reducción de este se notaría. Podemos observar el tratamiento con Dexametasona tuvo una ligera protección del GSH.

Niveles de glutatión oxidado (GSSG) ($\mu\text{/ml}$)

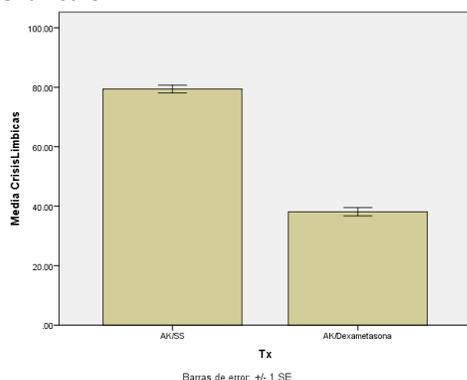
Grafica 2



Por el contrario, en la gráfica 2 observamos las variaciones de GSSG en los grupos, en el organismo el glutatión oxidado se encuentra aproximadamente en un 10%. La concentración del grupo ácido Kaínico/dexametasona es menor al grupo de ácido Kaínico/solución salina donde los niveles de GSSG disminuyen y aumenta el GSH el cual tiene los efectos neuroprotectores ante un daño epiléptico.

Conducta en ratas

Gráfica 3



En la gráfica 3 podemos apreciar una clara disminución en conducta producida por los ataques epilépticos, el grupo cuyo tratamiento fue ácido kaínico/dexametasona tuvo una considerable disminución de ataques que el grupo donde solo se administró ácido kaínico.

DISCUSIÓN

En las gráficas donde se muestra los niveles de glutatión obtenidos de los grupos a los 4 grupos, se observa una disminución en los niveles de glutatión reducido en donde el tratamiento involucra la administración de ácido kaínico. Siendo el glutatión reducido el que se encuentra en mayor cantidad, se puede observar en la gráfica que la disminución fue mucho más drástica que en comparación con los otros grupos. Por otra parte, tenemos la gráfica que muestra los niveles de glutatión oxidado, en esta podemos ver que los grupos a los que se les administro ácido kaínico para generar las crisis convulsivas no tienen una disminución tan grande como la gráfica del glutatión reducido, esto se puede deber a que el tipo de glutatión que tiene el efecto protector es el reducido. Al generar las crisis epilépticas el glutatión protege al sistema nervioso, si aparecen niveles bajos indica que se llevó a cabo un efecto neuroprotector para evitar el daño. Otro factor importante que considerar es que solo hay un 10% de glutatión oxidado presente en la célula por lo que una disminución de este no se haría notorio como en el reducido.

En cuestión al comportamiento, podemos observar que todos los grupos presentaron las llamadas “sacudidas de perro” pero lo que hay que recalcar es el promedio que tuvieron cada grupo siendo el grupo de ácido kaínico/dexametasa quien tuvo menos número que el grupo que solo se le administro ácido kaínico. Por último, con la gráfica de comportamiento observamos que hay una diferencia entre la cantidad de ratas que sufrieron ataques por parte del grupo 3 mientras que en el grupo 4 hubo menor cantidad de ratas con las crisis.

CONCLUSIÓN

Con los datos obtenidos de Glutación reducido podemos confirmar que hubo un daño pero no hubo una diferencia tan significativa entre los valores de los grupos 3 (grupo de ácido kaínico) y el grupo 4 (ácido kaínico/dexametasona) ya que basándonos en la gráfica 1, la dexametasona no protegió en gran medida el sistema nervioso pero, a pesar de esto, si hubo una disminución considerable en el comportamiento y las crisis, dando en primera instancia resultados positivos para que la dexametasona sea puesta a prueba en experimentos más rigurosos y significativos dado que si ayudo a la disminución de crisis epilépticas.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Yacubian EMT – Epilepsias, em: Nitrine R, Bacheschi LA – A Neurologia que Todo Médico Deve Saber. 2a Ed, São Paulo, Atheneu, 2008;235-256
- 2- Hector A. Serra, Juan Manuel Roganovich, Leonardo F. L. Rizzo. Glucocorticoides: Paradigma de medicina traslacional de lo molecular a lo clínico.
- 3- Sanches Palacios Leonardo. Epilepsia. Vol. 28. No.2. Bogotá. Junio, 1999.
- 4- [http://www.epilepsynw.org/wp-content/themes/epilepsy/brochures/Espanol/Medicaciones-para-la-Epilepsia-\(Medications\).pdf](http://www.epilepsynw.org/wp-content/themes/epilepsy/brochures/Espanol/Medicaciones-para-la-Epilepsia-(Medications).pdf). 2018. Acceso 15 junio de 2018
- 5- Flore de María Trejo Medinilla, Gerardo E. Barajas Vásquez, Elena D. Ramírez, Olga Y. Balbosa Cisneros, Sergio H. Sánchez Rodríguez. Anatomía de la epilepsia y fármacos utilizados en su tratamiento. Madrid, España. 2005; 1-18.
- 6- Rodolfo Rodriguez Carranza. Vademecum Académico de Medicamentos. Sexta edición. 2012.
- 7- <https://www.ecured.cu/Dexametasona>. 2018. Acceso 15 junio 2018
- 8- Elio Cisneros Prego. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. Rev. Cubana. Invest Bioméd v.14 no.1. Ciudad de la Habana 1995.

- 9- Ruth Cisneros, Raquel Oré, Inés Arnao, Silvia Suárez. Relacion de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con meca. An. Fac. Med. v.72. Lima, 2011.
- 10- <https://www.coenzima.com/glutatin> Acceso 18 junio 2018
- 11- Olney JW. Excitatory transmitters and epilepsy-related brain damage. Int Rev Neurobiol. 1985; 27:337-62.
- 12- Haglid KG, Wang S, Qiner Y, Hamberger A. Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. Mol Neurobiol. 1994;9(1-3):259-63.
- 13- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience. 1981;6(7):1361-91.
- 14- Henshall DC, Chen J, Simon RP. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. J Neurochem. 2000;74(3):1215-23.
- 15- Marcius Vinícius Mulatinho Maranhão, Eni Araújo Gomes, Priscila Evaristo de Carvalho. Epilepsia y anestesia. 2011.; 124-136
- 16- Hector A. Serra, Juan Manuel Roganovich, Leonardo F. L. Rizzo. Glucocorticoides: Paradigma de medicina traslacional de lo molecular a lo clínico.