

REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO COMPUTARIZADO EN RATAS PARA LA DETECCION DE ANTICONVULSIVANTES

Mario F. Guerrero P*, Blanca Meneses de Góngora* y Carmen Lilia Gracia de Garcia*.

* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá.

RESUMEN

Se implementó una técnica novedosa de registro electroencefalográfico en ratas anestesiadas, sometidas a los siguientes estímulos convulsivantes: descarga eléctrica, pentilentetrazol y ácido kaínico para la detección de sustancias potencialmente activas contra la epilepsia.

Palabras o Frases Claves: Electroencefalograma en ratas -Modelos Experimentales de Epilepsia- Descarga Eléctrica -Pentilentetrazol- Acido Kaínico.

SUMMARY

COMPUTARIZED ELECTROENCEPHALOGRAM RECORD IN RATS TO ASSESS ANTICONVULSANT AGENTS

A computerized electroencephalogram record was implemented in anesthetized rats subjected to convulsant stimulus: electrical discharges, pentylenetetrazol and kainic acid, to assess novel antiepileptic agents.

Key Word or Phrases: Electroencephalogram in rats -Experimental models of epilepsy-Electrical discharges- Pentilentetrazol- Kainic acid-

INTRODUCCION

La epilepsia constituye un conjunto de trastornos en la actividad eléctrica cerebral, la cual se puede detectar a través del análisis del electroencefalograma (1). Una sustancia anticonvulsivante, debe ser capaz, no solo de prevenir la aparición de los fenómenos motores característicos de la epilepsia, como la convulsión, sino evitar la aparición de descargas epilépticas en el registro electroencefalográfico. Por lo tanto es necesario contar con un procedimiento adecuado para tal fin.

Recibido para su publicación: 30 de agosto de 1997

Aprobada su publicación: 18 de agosto de 1997

PARTE EXPERIMENTAL

Biomodelos

Se utilizaron ratas albinas macho, colonia Wistar, criadas en el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional; de 8-12 semanas, con pesos de 150-300 g. mantenidas a temperatura de 20-21°C, con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, y dieta y agua a libre demanda.

Electroencefalograma

Preparación Del Animal: Cada rata se anestesió con la mezcla de droperidol más fentanilo (Thalamonal[®]) a dosis de 2,5 mg/kg y 0.05 mg/kg respectivamente, vía im previa sedación con éter etílico; y se relajó con dextrotubocurarina (Tucurín[®]) a dosis de 0,025 mg/kg, vía sc. A los cinco minutos de la administración de la mezcla anestésica y el relajante, la rata se pasó al registro del electroencefalograma.

Registro: A cada animal se le colocaron electrodos de aguja, (ref. 46-720 Coulbourn Instrument -CI-), vía sc. a nivel interauricular, uno a cada lado. Un tercer electrodo, de referencia a tierra se ubicó en la línea media. Los electrodos se conectaron a un amplificador de alta ganancia con filtro pasa banda (ref. S75-01 -CI-) al que se le asignó un factor de ganancia de potencial de 40000 y un rango de frecuencia (filtro pasa banda) de 1 a 40 Hz.

La señal se analizó a través de cuatro canales del convertidor análogo digital del polígrafo computarizado: en el canal 1 la señal completa sin atenuación; en el canal 2 la señal atenuada en 30%, para observar más fácilmente la ondas de alto voltaje; en los canales 3 y 4 se registraron las señales entre 1 y 20 Hz. y entre 20 y 40 Hz. respectivamente, para lo cual se utilizaron dos filtros pasa banda adicionales (ref. S76-36 CI). La velocidad de adquisición de datos asignada fue de 1000/s. Cada registro se observó en el monitor del computador mediante el programa CODAS (Computer-based Oscil-

lograph and Data Acquisition System -Dataq Instruments, Inc. Akron, Ohio USA-1989).

A cada rata se le efectuó un registro antes y después del estímulo convulsivante: carga eléctrica, pentilente-trazol ó ácido kaínico. La aparición de ondas de alto voltaje posteriores al estímulo, en franco contraste con el patrón electroencefalográfico de base previo, se interpretó como ausencia de protección (1-3).

Parámetros de Estimulación y Patrones

Los parámetros y patrones utilizados para cada uno de los estímulos convulsivantes aparecen en la Tabla 1.

Tabla No. 1 Estímulos Convulsivantes y Patrones

ESTIMULO	PATRON (mg/Kg. p.o)	EEG (1-3)
Descarga eléctrica* 100 mA, 60 Hz. 20 ms (4-6)	fenitoina sódica 70	Espigas; Ondas lentas
Pentilentetrazol 70mg/Kg., sc. (5)	Clonazepam 5	Complejo espiga-Onda lenta
Acido Kainico 10 mg/Kg, ip (7,8)	carbamazepina 70	poliespigas

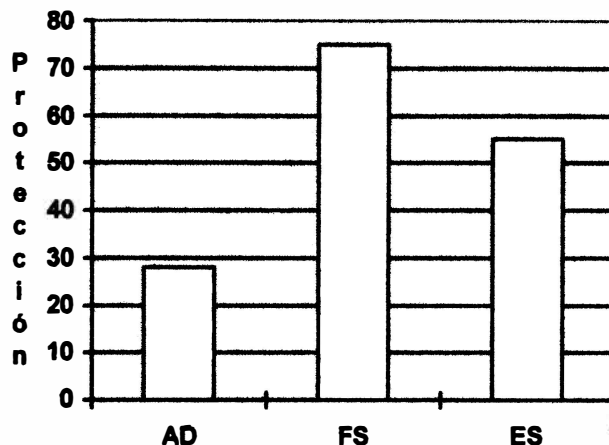
* Estimulador ref. E 13-51 -coulburn Instrument -

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se siguió un diseño de distribución de tratamientos completamente al azar. Los tratamientos utilizados en cada uno de los estímulos convulsivantes fueron: sustancia patrón, extracto de semilla de *Apium graveolens*, (1000 mg/kg.vo, según ensayos preliminares), y agua destilada como tratamiento control. Se utilizaron 80 ratas, para el ensayo con descarga eléctrica; 45 para el ensayo con pentilentetrazol, y 45 para el ensayo con ácido kaínico. Cada animal se clasificó en una de las dos categorías: protegido o no protegido, según la presencia o ausencia de ondas de alto voltaje. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante las pruebas de Chi² para el ensayo con estímulo eléctrico; y de Fisher para los ensayos con pentilentetrazol y ácido kaínico. El nivel de significancia escogido fue de 0,05. (9,10).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados totales del ensayo en ratas bajo anestesia estimuladas eléctricamente se presentan en la figura 1.



AD: agua destilada; FS: fenitoina sódica; ES: extracto de semilla de *Apium graveolens*

Figura 1. Porcentaje de protección de los tratamientos en el EEG de ratas estimuladas eléctricamente (Chi²:9.27)

El análisis muestra protección significativa para el grupo de tratamiento con fenitoina sódica. El extracto de semilla confiere protección con una probabilidad de error del 25%.

Para el ensayo de electroencefalograma (EEG) en ratas anestesiadas sometidas a estímulo con pentilentetrazol, el análisis muestra que el agente utilizado como patrón, clonazepam, confirió protección significativa (ver Figura 2). Para el ensayo del EEG en ratas estimuladas con ácido kaínico, no se observó protección en ningún tratamiento.

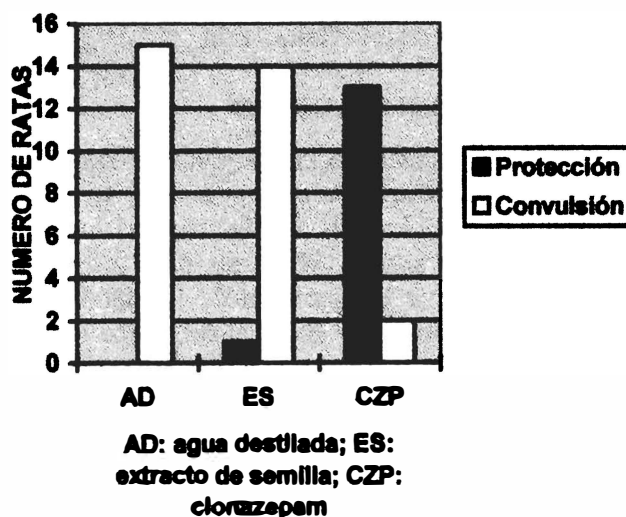


Figura 2. Frecuencia de protección de los tratamientos en el EEG de ratas estimuladas con pentilentetrazol.

La técnica farmacológica electroencefalográfica implementada permite observar la aparición de ondas abiertamente anómalas, de alto voltaje, en franco contraste con el ritmo de base, ante un estímulo convulsivante adecuado. (ver fig: 3-7). El análisis de los trazados muestra ondas lentas altas con el estímulo eléctrico, complejos espiga-onda con pentilentetrazol, y poliespi-gas con ácido kaínico, lo que es consecuente con lo descrito en la literatura (1-3). Igualmente importante es mostrar el efecto protector que se evidencia en el registro con la fenitoína sódica y el clonazepam, como agentes patrones.

Es necesario considerar el efecto de la anestesia en los registros. La utilización de droperidol más fentanilo (neuroleptoanestesia) no altera de modo importante el umbral convulsivo lo cual es un factor crítico en un ensayo, que como el presente intenta evaluar sustancias potencialmente anticonvulsivantes (11-12). Otro tipo de anestésicos, por lo demás muy útiles como el tiopental sódico y la ketamina, son desde este punto de vista, totalmente inadecuados, por el perfil anti y proconvulsivante que poseen respectivamente). Además la adición de dextrotubocurarina como relajante atenúa el efecto artefacto que puede resultar de la contracción muscular.

Es de resaltar que el extracto de semilla de *Apium graveolens* también evidencia un efecto protector en el electroencefalograma de ratas estimuladas eléctricamente, en un nivel de confianza de 75% que se considera importante. Si bien tiene menor actividad que el fármaco de síntesis, hay mérito para proseguir estudios con este producto natural.

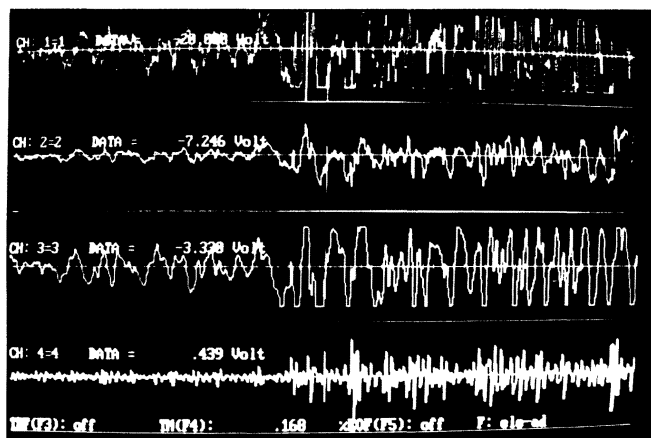


Figura 3. EEG de rata estimulada eléctricamente. Tratamiento: agua destilada. (Amp. X40000. Canal 1: 1-40 Hz; Canal 2: Atenuación del 30%; Canal 3: 1-20 Hz; Canal 4: 20-40 Hz).

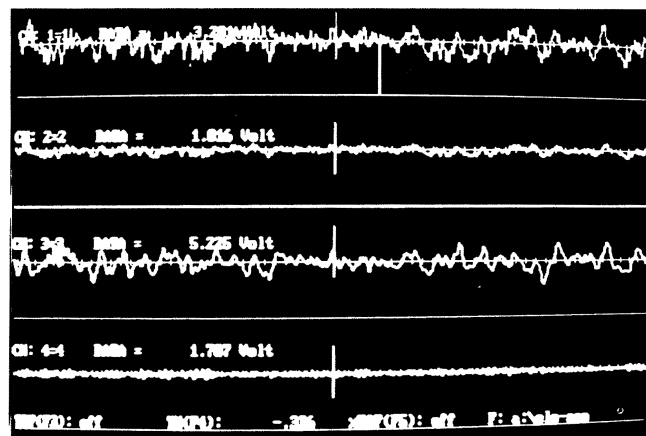


Figura 4. EEG de rata estimulada eléctricamente. Efecto protector de extracto de semilla de *Apium graveolens*. (Amp. X40000. Canal 1: 1-40 Hz; Canal 2: Atenuación del 30%; Canal 3: 1-20 Hz; Canal 4: 20-40 Hz)

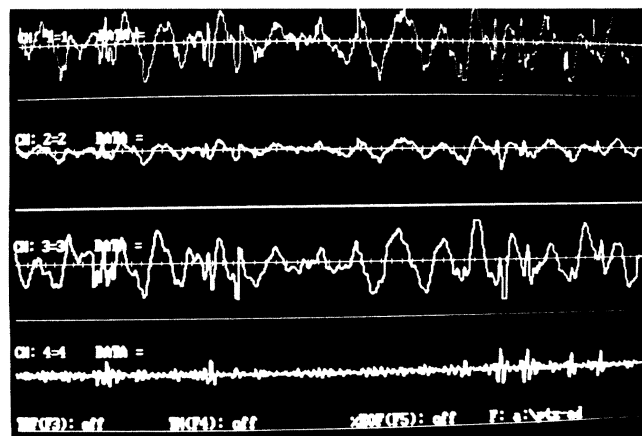


Figura 5. EEG de rata estimulada con Pentilentetrazol. Tratamiento: Agua destilada. (Amp. X40000. Canal 1: 1-40 Hz; Canal 2: Atenuación del 30%; Canal 3: 1-20 Hz; Canal 4: 20-40 Hz)

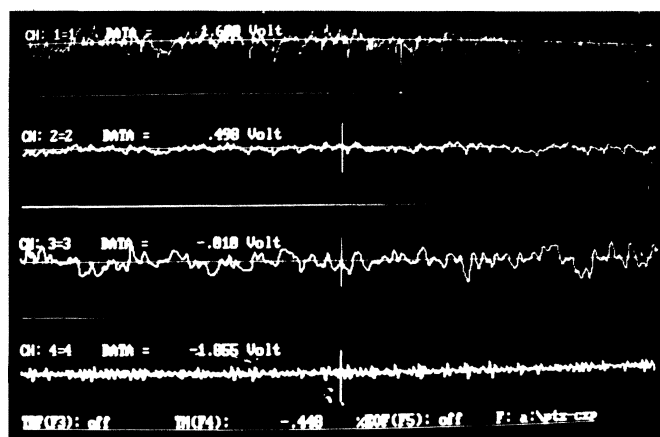


Figura 6. EEG de rata estimulada con pentilentetrazol. Tratamiento: Clonazepam. (Amp. X40000. Canal 1: 1-40 Hz; Canal 2: Atenuación del 30%; Canal 3: 1-20 Hz; Canal 4: 20-40 Hz).

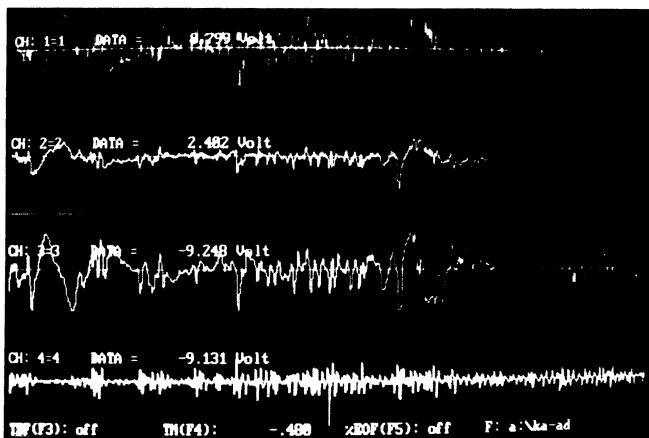


Figura 7. EEG de rata estimulada con el ácido kaínico. Tratamiento: agua destilada. (Amp. $\times 40000$. Canal 1: 1-40 Hz; Canal 2: Atenuación del 30%; Canal 3: 1-20 Hz; Canal 4: 20-40 Hz).

Quedan así sentadas las bases de una técnica novedosa para la evaluación de sustancias potencialmente antiepilépticas: el electroencefalograma en ratas anestesiadas, sometidas a estímulos convulsivantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa de Investigación: "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas" (copatrocinado por COLCIENCIAS), dirigido por el Profesor Roberto Pinzón; al Programa de Posgrado en Farmacología; a los Profesores: Luz Estela O. de Nigrinis, y Fernando Ospina del Departamento de Farmacia; y al profesor Henry García del Centro de Estudios Interfacultades.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Wyllie. *The treatment of Epilepsy: Principles and Practice*. Lea & Febiger. Philadelphia. (1993). pp. 173-751.
2. V. Longo. "Electroencephalographic atlas for pharmacological research". Elsevier ed. New York. (1962). pp. 3-67.
3. A. Feria. *Epilepsia: Un Enfoque Multidisciplinario*. Trillas. (1986). pp. 74-231.
4. E. Swinyard. En "Experimental models of epilepsy". Raven Press. New York (1972). pp. 435-457.
5. E. Swinyard. and J. Woodhead. "Experimental detection, quantification and evaluation of anticonvulsants". Woodbury ed. Raven Press. New York. (1972). pp. 435-451.
6. R. Krall *Epilepsia*. **19**, 409-428. (1978)
7. J. Olney. *Advances in Neurology*. **44**, 857-876. (1986).
8. B. Diamond *European Journal of Pharmacology*. **183** (2), 515-516. (1990)
9. W. Cochran and G. Cox. "Diseños experimentales" Trillas. México. (1974). pp. 128-132.
10. S. Siegel. "Estadística no paramétrica". Trillas. Mexico. 3^a ed. (1991). pp. 120-210.
11. A. Bovis. *Therapeutic drugs*. Circollin Dolleny. Livingstone. (1991):D229-32; F26-29; T163-6.
12. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9 ed. J. Hardman y L. Limbird. Eds. McGraw- Hill. New York. (1996) pp.307-330.