



Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas.

Primera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

Caracterización neurohistológica del hipocampo de rata, inyectada con fracción 3 del extracto etanólico de *Bunodosoma granulifera*

Autor: MSc. Ángel R. Concepción Alfonso
Profesor e Investigador Auxiliar

Dpto. Histología, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", La Habana, Cuba.

Correo electrónico: aconce@giron.sld.cu

RESUMEN

Las investigaciones en el campo de la Neurohistología con aplicación en la evaluación de sustancias neurotóxicas, han tomado gran desarrollo en los últimos años, dado fundamentalmente por los métodos específicos de tinciones para los diferentes constituyentes del tejido nervioso.

Por otro lado las neurotoxinas, en especial las de origen marino, son cada vez más utilizadas en las investigaciones del campo de las neurociencias.

Partiendo de estos antecedentes se propone en el presente trabajo, la caracterización neurohistológica del hipocampo de rata, inyectada por vía intracerebroventricular (ICV) en ratas Wistar con la fracción 3 del extracto etanólico de la anémona marina *Bunodosoma granulifera* (F3 EEtBg) de nuestras costas, utilizando como droga patrón el ácido kaínico (AK), neurotoxina bien conocida con efectos necróticos específicos sobre las células piramidales del hipocampo.

La inyección de F3 EEtBg también provoca alteraciones sobre células piramidales del hipocampo, con daño a la mitocondria y al retículo endoplasmático, caracterizada mediante microscopía de luz y electrónica, lo que demuestra su carácter neurotóxico y su potencial uso para el diseño de modelos experimentales de epilepsia, parkinson u otros, como cuando se utiliza AK. La metodología podría ser utilizada en el campo de las evaluaciones neurotoxicológicas.

Objetivo: Caracterizar neurohistológicamente el hipocampo de rata, inyectada en ventrículo cerebral con fracción 3 del extracto etanólico de *Bunodosoma granulifera*.

PALABRAS CLAVE: Fracción 3 del extracto etanólico de *Bunodosoma granulifera*, Ácido Kaínico, hipocampo, microscopía de luz, microscopía electrónica.

INTRODUCCIÓN

La neurobiología ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, especialmente por las investigaciones realizadas con diferentes agentes neurotóxicos, que han permitido dilucidar algunas incógnitas sobre el Sistema Nervioso (SN). Al propio tiempo se han obtenido nuevos conocimientos acerca de algunas enfermedades humanas, como son por ejemplo: Esquizofrenia, Alzheimer, enfermedad de Parkinson y las epilepsias,

mediante el diseño de modelos experimentales que emplean neurotoxinas para modificar mecanismos moleculares específicos ¹⁻⁶

Las neurotoxinas de más interés en los últimos años son las de origen natural, sobre todo las extraídas de organismos marinos, tales como celenterados, equinodermos, moluscos y otros grupos de invertebrados que se caracterizan, entre otros, por presentar mecanismos de defensa basados en la liberación al medio de sustancias altamente tóxicas ⁷⁻¹⁰.

En el Phylum de los Celenterados se encuentran las anémonas marinas, que son animales de vida sésil y por tanto poseen mecanismos de defensa y nutrición altamente desarrollados, que compensan en cierta medida su poca movilidad ⁸.

Nuestro país tiene una amplia plataforma insular, con una rica fauna marina, de gran diversidad y muy bien representada por los grupos sistemáticos antes mencionados, lo que ha posibilitado a los investigadores dedicarse con mucho éxito a la búsqueda de compuestos, incluyéndose dentro de ellos los neuroactivos a partir de dichos organismos ^{10,11}.

Entre las especies más estudiadas se encuentran como se refirió antes, las anémonas, específicamente la *Bunodosoma granulífera* de nuestras costas, porque se ha probado que los diferentes extractos, fracciones, etc., obtenidos de ella tienen efectos sobre el SN de los mamíferos y de otros organismos ¹¹⁻¹³, entre estas se puede mencionar una nueva toxina de canal de potasio (BgK⁺), aislada del mucus de la referida anémona, que fue la primera de este tipo obtenida de un organismo marino ⁸.

Un estudio preliminar realizado con el extracto etanólico total de dicha anémona, inyectado en ventrículo lateral de ratas, provocó severas convulsiones y un efecto neurotóxico también severo sobre las células piramidales del hipocampo, las que se observaron totalmente necróticas ^{13,14}. Por tanto es necesario conocer si los compuestos neurotóxicos que se encontraban en ese extracto, se mantienen en la F3 EEtBg, lo cual es de gran importancia porque se podría llegar a obtenerlos puros, continuando con la purificación de dicha fracción y evaluando paralelamente cada una de las sustancias tóxicas obtenida de la misma.

Por otro lado en los últimos años la morfología ha ido tomando un lugar importante dentro de la Neurotoxicología. Según Switzer ¹⁵; en este campo de evaluación resulta muy difícil describir los cambios provocados por un compuesto químico particular, sin determinar si la causa es la destrucción de la estructura anatómica que lo produce, por lo que considera que los estudios Neurotoxicológicos deben comenzarse con técnicas que permitan detectar la degeneración neuronal, las cuales debían estar precedidas por la determinación de la Dosis Letal Media (DL 50) del producto de interés. De aquí que la metodología utilizada a partir de la inyección de la fracción 3 EEtBg, pudiera ser útil en evaluaciones neurotoxicológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

- Obtención e inyección ICV de la F3 EEtBg en ratas Wistar

La F3 EEtBg se obtuvo por filtración en gel de Sephadex G-50 en ácido acético al 20%, a partir del extracto etanólico total del cuerpo de la anémona marina *Bunodosoma granulífera*, colectada en costas cubanas.

Para la inyección los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal y lidocaina como anestésico local y la inyección de la toxina (F3 EEtBg) se realizó mediante técnica estereotáxica, en ventrículo lateral del cerebro de la rata Wistar. Para la determinación de la DL50 se tomaron 28 ratas machos de 300 ± 20 g de peso obtenidas del CENPALAB y se mantuvieron en condiciones de vivario, con alimento y agua ad libitum.

Se establecieron cuatro grupos de trabajo: I, II, III y IV, de siete animales cada uno, seis animales experimentales inyectados con F3 EEtBg y un control con SF (cuatro controles en total). A los animales de los grupos experimentales se les inyectó 1 µl de F3 EEtBg a diferentes concentraciones: grupo I: 0.5 mg/mL (0,5 µg/ µl); grupo II: 1 mg/mL (1,0 µg/ µl); grupo III: 2 mg/mL (2,0 µg/ µl) y grupo IV: 2.5 mg/mL (2,5 µg/ µl). Los animales controles recibieron 1µl de solución fisiológica, también por vía ICV.

Posteriormente se registró el número de muertes respecto al total de cada grupo y se analizaron los resultados por el tests de Litchfield y Wilcoxon, modificado por Rojas y Lavin ¹⁶ (según programa para microprocesador elaborado por los autores).

- Observaciones conductuales y procesamiento de las muestras para Microscopía Óptica

Se emplearon 30 ratas Wistar machos de 300 ± 20 g de peso, obtenidas del CENPALAB y mantenidas en nuestro centro en condiciones de vivario.

Para la caracterización neurohistológica del hipocampo de cada rata, se utilizaron 15 animales experimentales a los que se les inyectó una dosis de 1,0 µg (1,0 µg/µl) de la referida fracción tóxica (Se seleccionó dicha dosis de F3 EEtBg, por encontrarse dentro del rango del límite superior e inferior de su DL 50) y 15 animales controles (inyectados con SF). Los animales se separaron en cinco grupos, correspondiéndose con cinco periodos de evolución diferentes: 1d, 3d, 7d, 14d y 30d. Cada grupo estaba formado por tres animales controles y tres experimentales.

Después de inyectados los animales en el ventrículo cerebral y cerrada y desinfectada la herida, se liberó el animal del estereotáxico y se realizó la técnica conductual, mediante la observación visual de cada uno por separado, por espacio de 9 horas, colocados dentro de una jaula de Plexiglas, de las utilizadas normalmente como alojamiento, pero en este caso no se le colocó aserrín.

Transcurrido el tiempo de post-inyección indicado para cada grupo, los animales se anestesiaron con éter y se realizó la eutanasia de todos por perfusión intracardiaca. La perfusión se inició con SF y se prosiguió con formol neutro tamponado al 10%. Se extrajeron los encéfalos y se colocaron en igual fijador por 3 días.

Posteriormente las muestras se lavaron abundantemente con agua corriente y se siguieron los diferentes pasos hasta inclusión en parafina. Se hicieron cortes de 6 µm y se utilizaron las técnicas de coloraciones: Hematoxilina-Eosina (H-E), Cresil-violeta (C-V), Klüver-Barrera (K-B), Proteína acidica gliofibrilar (GFAP en Inglés), Gleys y Marsland (G-M). Se realizaron las observaciones en un Microscopio Binocular, modelo Olympus y se tomaron fotos a color con película Kónica de 35mm.

Se hizo una evaluación semi-cuantitativa de las muestras, expresada en la tabla como daño leve, moderado y severo.

Leve: significa que el daño histopatológico causado por el compuesto queda limitado a la vecindad de la lesión (por donde pasa la aguja) o que está dañada una pequeña cantidad de células (incluye unas pocas neuronas o un área puntual).

Moderado: significa que los daños histopatológicos causados por el compuesto, son mayores que los expresados anteriormente, o sea ya no son puntuales las lesiones, sino que se han extendido y han dañado gran cantidad de neuronas del hipocampo como partes del área CA1, CA2, CA3 o CA4, etc.

Severo: significa que los daños histopatológicos causados por el compuesto, son mucho mayores. En este caso el daño compromete por ejemplo totalmente las áreas del hipocampo antes mencionadas, donde se observa desaparición completa de las neuronas piramidales y esas áreas van siendo rellenas con células gliales (astrocitos).

- Procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se utilizaron tres animales controles inyectados con SF y tres experimentales, inyectados también en ventrículo cerebral con la F3 EEtBg. Después de la inyección ICV, se mantuvieron los animales en condiciones de vivario, con alimento y agua ad libitum durante siete días.

El procesamiento de las muestras para MET se inició con la anestesia de los animales con éter en cámara cerrada, seguido por perfusión intracardiaca con SF, seguida de fijador de Karnovsky¹⁷, el cual se ajusta a un PH 7,2-7,4.

Se extrae el encéfalo, se toman las muestras de hipocampo dorsal, se colocan en igual fijador durante una hora, se lavan 3 ó 4 veces en buffer fosfato, se post-fijan en tetraóxido de osmio (disuelto en agua destilada) al 0,5%, durante 1 hora, lavado en buffer fosfato, deshidratación, propileno e inclusión hasta araldita pura. Se deja polimerizar durante 48 horas.

Se hicieron los tacos de inclusión y se tallaron utilizando un ultramicrotomo.

Se realizaron cortes ultrafinos de unos 50-100 nm con un ultramicrotomo LKB IV, de fabricación Sueca y se montaron en rejillas de cobre de 400 huecos, sin membrana de soporte. Se realizó contraste con sales de citrato de plomo y acetato de uranilo, en solución acuosa, 15 minutos en cada una.

Para la observación y toma de las fotos, se utilizó un Microscopio Electrónico de Transmisión Hitachi H-7000. Se tomaron diez micrografías por campo de cada una de las muestras procesadas mediante MET y se presenta una micrografía de cada una de ellas.

RESULTADOS

- DL 50 de la F3 EEtBg mediante inyección ICV

La DL 50 de la F3 EEtBg, inyectada por vía ICV en ratas Wistar, fue 1,38 µg (tabla 2,1 y 2,2). Este valor fue obtenido según el método de Litchfield y Wilcoxon, modificado por Rojas y Lavín¹⁷, referido anteriormente y expresados en las siguientes tablas:

Tabla 1. Valores del % de mortalidad por grupos

Grupo	Dosis (µg)	Muertes	Total de animales	% de mortalidad Observada	% de mortalidad Esperada
1	0,5	1	6	16.67	15.35
2	1,0	2	6	33.33	37.35
3	2,0	4	6	66.67	64.68
4	2,5	6	6	92.33*	72.64

*- valor corregido.

Tabla 2. Valores para las diferentes dosis efectivas (intervalo de confianza para un 95%)

Dosis efectiva	Límite superior	Límite inferior
DE50=1,38 µg	2,62 µg	0,72 µg
DE16=0,514 µg	1,95 µg	0,135 µg
DE84=3,69 µg	14,0 µg	0,97 µg

- Resultados conductuales

Los animales controles de todos los grupos, después de inyectados con SF, mantuvieron un comportamiento normal, durante todo el tiempo en que se realizó la observación conductual.

Los animales de los grupos experimentales mostraron evidentes manifestaciones motoras epileptiformes. Alrededor de los 3 minutos post-inyección comenzaban a moverse las vibrisas, se observaron ligeros movimientos de cabeza y orejas, ronquidos débiles y muchos temblores.

A los 10 minutos, presentaron sacudidas esporádicas que involucraban la parte anterior del cuerpo, y los ronquidos y temblores de mayor intensidad, éstas se conocen como "sacudidas del perro mojado".

A los 30 minutos las convulsiones fueron intensas, involucraban todo el cuerpo y las sacudidas eran extremadamente violentas, continuaban los temblores fuertes y se observó cola de Straub, aproximadamente una hora después de la inyección.

Los ataques convulsivos severos duraron de 5 a 6 horas post-inyección, después disminuyó su intensidad, se observaron sacudidas esporádicas y los temblores leves.

Entre 7 u 8 horas los animales se desplazaban por la jaula describiendo movimientos circulares y respondían con gran excitación saltando bruscamente, ante cualquier golpe en la jaula; mostraban conductas de acicalo. Después de las 8 horas se notó mejoría al caminar y casi no presentaban convulsiones, solo algunas sacudidas esporádicas.

Caracterización neurohistológica del hipocampo de rata inyectada con F3 EEtBg, mediante microscopía de luz

Tabla 3. Resultados histopatológicos observado fundamentalmente en el hipocampo de ratas de los diferentes grupos, inyectadas con F3 EEtBg

Grupos	Ci	E	NN	Cong	H	PMN	H GI
1 día	F3	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	-
3 días	F3	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +
7 días	F3	+	+ + +	+ +	+	+ +	+ + +
14 días	F3	-	+ + +	-	-	-	+ + +
30 días	F3	-	+ + +	-	-	-	+ + +
Control	SF	+	-	-	-	-	-

Leyenda: Ci: compuesto inyectado E: edema NN: necrosis neuronal Cong: congestión H: hemorragia PMN: polimorfonucleares H gi: hiperplasia glial

C- animales controles **R-** animales experimentales inyectados con F3 **EEtBg**
Ci: Compuesto inyectado. **E:** Edema. **Nn:** Necrosis neuronal. **H:** Hemorragia
Presencia de polimorfonucleares: **PMN.** Congestión vascular: **Cong V** Hiperplasia glial:
H gl; **EEl:** (estructuras encefálicas involucradas).
SF: Suero fisiológico, **cc:** cuerpo calloso, **c.cer:** corteza cerebral, **vl:** ventrículo lateral,
hpc.d: hipocampo dorsal, **hpc.V:** hipocampo ventral, **c:** cerebelo.
Daño sobre el tejido: **-:** no presenta daño, **+**: daño leve, **++:** daño moderado y **+++:** daño severo.

- Animales controles: En todos los grupos se observó que solo estaba lesionada el área por donde penetró la aguja, describiéndose bien el recorrido que hizo ésta a través de corteza cerebral, cuerpo calloso, hasta llegar al ventrículo inyectado, donde se presentó leve hemorragia y leve presencia de PMN, en el grupo de 1 día. El hipocampo de estos animales se observó sin alteración histológica (Ver grupo control en la tabla 3 y fig. 1).

- Animales experimentales (inyectados con F3 EEtBg): En los grupos de 1d y 3d, se vieron daños entre moderados y severos, con áreas edematosas que abarcaron regiones de la corteza cerebral y cuerpo calloso por donde penetró la aguja, hasta un área bastante extensa del ventrículo lateral inyectado con un daño tisular severo, que fue más leve y de menor extensión del lado contralateral.

Se apreciaron gran cantidad de hematíes así como de leucocitos y polimorfonucleares neutrófilos (PMN), además una severa destrucción del plexo coroideo y congestión vascular en toda esa zona, fundamentalmente a nivel del ventrículo inyectado.

Se observó entre moderada y severa necrosis neuronal que además de afectar las células piramidales del hipocampo dorsal y ventral, abarcó la región adyacente al ventrículo inyectado y parte del contralateral, así como células endoteliales que revisten al ventrículo inyectado.

En de 1d no se observó hiperplasia glial, pero en el de 3d sí. Se observa leve desmielinización pero esta es puntual, asociada siempre a las áreas de edema y degeneración neuronal. Del grupo de 3d se presenta la fig. 2.

El grupo de 7d post-inyección se presenta en la tabla 3. Se apreciaron dañadas las mismas áreas del hipocampo que las descritas para los grupos de 1d y 3d, encontrándose diferencias en este grupo respecto a los otros, en particular disminuyeron los efectos vasculares.

Hay necrosis neuronal severa, en este caso más extensa y una hiperplasia glial más abundante, fundamentalmente en las zonas CA-1 a la CA-4 de los hipocampos dorsales, donde prácticamente desaparecieron las células piramidales.

El grupo de 14d post-inyección, presenta edema leve, hiperplasia glial abundante, que llenan las áreas edematosas asociadas a las estructuras cerebrales afectadas por esta patología.

Desaparecieron por completo los hematíes y los PMN, se observó congestión leve. Las estructuras cerebrales dañadas fueron las mismas que en el resto de los grupos.

En el grupo de 30d post-inyección se apreció que los hematíes y los PMN desaparecieron, no se observaron vasos congestionados, abundante hiperplasia glial ocupando los espacios donde estaban las neuronas necróticas. En este caso prácticamente todas las neuronas piramidales del hipocampo han sido sustituidas por neuroglías.

Resultados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, de animales procesados a los 7 días post-inyección

- Estructura fina del hipocampo normal (Animales Controles):

En la figura 3, se observan algunas características de la estructura fina de una neurona normal del hipocampo de rata. Además el tejido circundante constituido por axones fundamentalmente amielínicos, los que se aprecian sin alteraciones y se ve la continuidad del tejido.

- Estructura fina del hipocampo dañado (Animales Experimentales):

En la figura 4 se observa a la izquierda una neurona del hipocampo. El núcleo se aprecia bien conservado, con características normales.

En un borde externo la envoltura nuclear se observa alterada. Se ven vacuolizaciones citoplasmáticas al parecer relacionado con alteraciones del retículo endoplasmático, el cual ha sufrido el efecto de la fracción tóxica utilizada.

En otras regiones citoplasmáticas se observan alteraciones de este tipo, pero más leves.

A nivel de la membrana plasmática, también se observa una alteración vesiculosa como la descrita anteriormente.

En el tejido circundante se puede distinguir que las mitocondrias han sufrido un daño directo, ya que las mismas presentan un tamaño de aproximadamente cinco a seis veces mayor al de una normal, sus crestas mitocondriales están totalmente desorganizadas y en la que se encuentra en la región central, que además es la de mayor tamaño, presenta unas pequeñas vesículas en su matriz.

En la figura 5 se observa una gran cantidad de fibras mielínicas, en una de ellas al centro, abajo, se ve bastante tumefacta, incluso en su centro se ve una amplia alteración vesiculosa. Otras fibras presentan alteraciones de este tipo pero más leves.

En la mayoría de esas fibras, los anillos que forman la mielina se encuentran alterados, se presenta sin la continuidad característica de la misma, como consecuencia de un daño. Al centro arriba se observa una terminación mielínica, severamente dañada, con sus anillos separados y tortuosos, formando un ovillo.

DISCUSIÓN

Se utiliza el método de inyección ICV, porque se quiere conocer con exactitud si existe o no un efecto directo de la fracción tóxica utilizada sobre alguna estructura cerebral en particular, que permita realizar más adelante, su evaluación inyectando la propia fracción tóxica por otra vía. Por otro lado se necesita conocer la DL 50 de la F3 EEtBg, inyectada directamente en líquido cefalorraquídeo y después caracterizar su posible acción neurotóxica, mediante observación conductual y el método histopatológico.

La vía de inyección ICV en roedores, ha sido utilizada por otros investigadores para hallar la DL 50 de diferentes neurotoxinas ¹⁸ u otros compuestos biológicos ¹⁹.

Esta vía de inyección posibilita que al ser depositada una sustancia, compuesto o droga en el líquido cefalorraquídeo, la misma viaje a diferentes estructuras encefálicas, incluyendo el tronco encéfalo e incluso a médula espinal, en dependencia de su especificidad o afinidad y causa determinados efectos letales dado por su potencia, que para el caso de esta fracción neurotóxica, se demostró que era sobre las células piramidales del hipocampo, similares a aquellas causadas por el Ak ⁵, algo parecido ocurre con los efectos conductuales descritos para la F3 EEtBg, que se asemeja en gran medida a las provocadas por el AK, especialmente su efecto epiletogénico ⁵.

Se decide realizar la caracterización neurohistológica del hipocampo de ratas inyectadas con F3 EEtBg por vía ICV, para conocer su DL 50, que fue de 1,38 µg y en base a esta utilizar 1,0 µg que es una dosis subletal, evitando muertes innecesarias de animales y que ha permitido caracterizar su acción neurotóxica, mediante Microscopía de Luz y Microscopía Electrónica de Transmisión, corroborándose que posee alta afinidad por las células piramidales del hipocampo.

Se puede afirmar que existe correspondencia entre los resultados conductuales y los histopatológicos, tanto para los animales controles, como para los experimentales, de todos los grupos, en base a los resultados obtenidos en este trabajo.

En el caso de los controles los daños que sufrió el encéfalo son mecánicos, provocados por la penetración de la aguja hasta el ventrículo, no involucra ninguna otra estructura además de la corteza cerebral, el cuerpo calloso hasta el ventrículo lateral inyectado con SF y las afectaciones en estas zonas son leves, la solución salina es asimilada perfectamente por el organismo, de ahí que la conducta de todos los animales controles haya sido normal. Por otra parte ni el área de la corteza cerebral, ni la zona del cuerpo calloso por donde penetró la aguja, estaban relacionadas con funciones importantes que puedan alterar la actividad normal de estos animales. Otros investigadores en diferentes experimentos han utilizado la inyección ICV de SF como control ^{20,21}.

Partiendo de estos resultados se demuestra que las convulsiones observadas en los animales experimentales, así como su comportamiento general, se debieron al depósito del microlitro de la F3 EEtBg en el ventrículo lateral.

En los grupos experimentales la fracción tóxica que se inyectó ICV, afectó severamente sobre todo a partir de los tres días post-inyección (aunque desde un día ya se observan algunas alteraciones histológicas) las células piramidales del hipocampo, estructura cerebral que como se conoce, está involucrada en procesos, especialmente de aprendizaje y memoria en los mamíferos, incluyendo los roedores ^{22,23} y su afectación está relacionada además con la manifestación de crisis epileptogénicas ⁵, lo que explica el por qué de este tipo de conducta descrita en los grupos experimentales inyectados con F3 EEtBg.

La selectividad o afinidad de la F3 EEtBg por las células piramidales del hipocampo, sin afectar prácticamente las células granulosas, ni otros tipos de neuronas, excepto un daño leve a células de Purkinje del cerebelo, pudiera guardar relación al igual que sucede con el AK, con un fenómeno de afinidad de uno o varios componentes de dicha fracción, por receptores a la acetilcolina presentes en las neuronas piramidales, que se corresponde con un decrecimiento de la actividad colino acetiltransferasa de las neuronas de esas áreas cerebrales ²⁴. Otro receptor relacionado con este fenómeno es el glutamato ²⁵. Ha sido demostrado que la lesión que provoca el AK en el hipocampo, involucra la pérdida completa de las neuronas piramidales del área CA3 y que interactúa a su vez con las enzimas colino acetiltransferasa y ácido glutámico decarboxilasa ²⁶ y que también con la acetilcolina se interrelacionan otros neurotransmisores, para dar una respuesta adecuada a las diversas funciones del Sistema Nervioso Central; de ahí que algunos procesos fisiológicos o conductuales dependen del balance de varios sistemas de neurotransmisión y la pérdida del mismo, más que de la alteración aislada de uno de ellos, parece participar en la patogenia de algunas enfermedades tales como el Alzheimer y el Parkinson ²⁷.

Con respecto a las alteraciones histopatológicas relacionadas con el sistema vascular-encefálico, hay tres elementos que merecen ser discutidos y que son: la hemorragia, la congestión vascular y la presencia de PMN.

Como se pudo apreciar en las diferentes tablas de resultados estas alteraciones son severas especialmente en los grupos con lesiones más recientes y son leves a partir de los 7d post-inyección, hasta que ya a los 30d no se observan, esto demuestra el gran

efecto vascular-encefálico que provoca la F3 EEtBg a nivel del SNC, incluso en regiones alejadas del sitio de inyección, como es el hipocampo dorsal y ventral, especialmente en los siete primeros días posterior a la inyección. Mediante el uso del AK en ratas, también se han encontrado alteraciones vasculares, específicamente a nivel de la barrera hematoencefálica⁵. Por otro lado la presencia de una severa infiltración a PMN es un indicio del desarrollo de un proceso inflamatorio agudo, que posteriormente va a ser sustituido por una gliosis abundante, lo cual se corresponde con resultados encontrados por otros autores al utilizar el AK, donde el daño neuronal tan severo induce un proceso inflamatorio, que involucra a la microglia^{28,29}.

Otro daño histopatológico que merece ser analizado es el edema vasógeno, que conceptualmente es la acumulación de líquido en el medio extracelular y es la forma más común de edema cerebral, el cual está relacionado con un incremento de la permeabilidad de las células endoteliales de los capilares cerebrales, lo que lleva a un incremento de volumen de líquido extracelular por un desbalance hídrico, que provoca acumulación de ese líquido en el tejido circundante³⁰. Algunos autores consideran que el edema se puede producir también por la tumefacción astrogliar que se produce a nivel de los procesos astrocíticos perivascuales, ya que estas glías forman parte de la barrera hematoencefálica, lo que puede llegar a destruir a las neuronas por las relaciones tan íntimas que establecen entre ellas³⁰.

Todo esto puede corroborarse con lo observado en los grupos experimentales inyectados con F3 EEtBg, donde efectivamente el edema es muy severo en aquellas regiones donde la necrosis neuronal también lo es, como las áreas del hipocampo y las cercanas a la zona de inyección, pero este daño al igual que los tres explicados anteriormente solo aparece severo en los grupos experimentales de hasta 3d post-inyección, pues ya a los 7d las microglías comienzan a ocupar todas esas áreas edematosas y fagocitar a las neuronas necróticas.

En cuanto al fenómeno de desmielinización, este apareció de forma puntual asociada con los sitios de necrosis neuronal y edema severos, por lo que parece más bien consecuencia de estos daños y no por la presencia de algún componente desmielinizante en F3, aunque no se podría descartar esta posibilidad, ya que se trata de una fracción que posee varios componentes tóxicos.

Llama la atención la abundante gliosis observada en los animales experimentales a partir del tercer día post-inyección, que se va haciendo más evidente a partir de los 7d, manteniéndose así en el resto de los grupos estudiados.

En los resultados se presentan las neuronas piramidales en general, en un proceso degenerativo parecido al que ocurre en ciertas enfermedades degenerativas del sistema nervioso, como el Alzheimer, la esquizofrenia y otras. Mediante Microscopía electrónica se puede apreciar ese daño con mayor nitidez, específicamente sobre las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo, donde se vio que se forma una especie de ovillo que parece enrollado sobre sí mismo y donde se aprecia el estado degenerativo de este tipo de célula y que son muy parecidos a los que se observan en diferentes enfermedades degenerativas del SN, que unido a las otras alteraciones histopatológicas, hace pensar que la fracción tóxica utilizada, podría servir para el diseño de un modelo experimental que simule alguna de esas enfermedades humanas, que a su vez podría brindar la posibilidad de ser utilizado en la búsqueda de medicamentos, que contrarresten los perjuicios producidos por la misma.

Modelos experimentales utilizando la inyección de AK por diferentes vías, han permitido observar resultados similares a los descritos aquí, con un efecto directo sobre las neuronas piramidales del hipocampo que conlleva también una astrocitosis e involucran a la microglia^{31, 32}.

Por otro lado el citoplasma de las células piramidales se ve severamente alterado, en especial el retículo endoplasmático, el cual presenta sus cisternas muy dilatadas; el fenómeno de vacuolización observado en el citoplasma de los animales inyectados con F3 EEtBg, parece estar relacionado con un proceso en el cual ocurre una dilatación de las cisternas que constituyen el retículo endoplasmático; Ball y col.³³ inyectando AK en el área CA2 y CA3 del hipocampo, encuentran una estrecha relación entre receptores kainatos y otros receptores abundantes en cerebro, que se acoplan a nivel del retículo endoplasmático celular, lo que sustenta la idea de que ese acople y la distribución intracelular de los receptores al kainato, está determinado por este orgánulo citoplasmático, lo que podría justificar los resultados encontrados a nivel de retículo endoplasmático, inyectando F3 EEtBg.

También las mitocondrias presentan alterada su histología normal, observándose sus crestas mitocondriales desorganizadas, las membranas externas e internas, han perdido su configuración; además se aprecia de forma cualitativa que este organelo ha incrementado entre 4-6 veces su tamaño normal. Se conoce que la pérdida de fuentes de energía afecta muchos sistemas intracelulares, esto es consecuencia de un incremento de la permeabilidad de las membranas, que lleva a un trastorno del balance hidromineral, por afectación de la bomba de Na⁺ y por tanto la célula se vuelve tumefacta y muere; y en este caso se podría pensar que es debido a que continúa actuando en el tiempo, el efecto de la fracción tóxica utilizada.

Otros investigadores utilizando AK han encontrado alteraciones de enzimas mitocondriales que se relacionan con alteraciones ultraestructurales de este orgánulo, específicamente en neuronas piramidales del hipocampo^{34,35}. Se ha planteado que ocurre una disfunción mitocondrial en diferentes enfermedades neurodegenerativas³⁶.

La mielina no se presenta en su forma normal característica, se observa con los anillos separados y sin continuidad, lo que hace pensar que pudiera existir un efecto directo de alguno de los componentes de la fracción tóxica inyectada, sobre el metabolismo lipídico, por eso se rompe la membrana plasmática y se acumulan los lípidos por fuera del citoplasma o dentro del citoplasma, en el caso de que hubiese sido fagocitada; aunque lo más probable parece ser una consecuencia de la severa necrosis neuronal, que a su vez también puede afectar las células satélites, como las oligodendroglías; en este sentido se ha observado que la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos de dichas células también provoca su muerte³⁷.

En las enfermedades neurodegenerativas, junto a los cuadros patológicos del sistema nervioso, se ha visto una activación importante de la glía^{38,39}.

CONCLUSIONES

1- La DL 50 de la F3 EEtBg inyectada por vía ICV en ratas Wistar, demostró el fuerte poder neurotóxico que posee la referida fracción.

2- La F3 EEtBg inyectada por vía ICV en ratas Wistar produjo:

- Alteraciones conductuales, tales como actividad epileptogénica, ataques convulsivos y la llamada conducta del perro mojado, entre otras.
- Alta afinidad principalmente por las células piramidales del hipocampo.
- Severos daños a la mitocondria, al retículo endoplasmático y destrucción de la capa de mielina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jefferys JGR, Jiruska P. The Tetanus Toxin Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, 2009, 804-807.
2. Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM. Animal Models of Alzheimer's Disease. *Encyclopedia of Neuroscience* 2009, 415-421.

3. Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *European J Neurosci* 2010, 31: 2247–2265. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07260.x
4. Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, Chiou CS, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Apr; 95(2):158-165.
5. Sperk G. Kainic acid seizures in the rat. *Progress in Neurobiology* 1994; 42: 1-32.
6. Tang FR, Loke WK. Cyto-, axo- and dendro-architectonic changes of neurons in the limbic system in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, March 2010, 89 (1): 43-51.
7. Celedón G, González G, Lissi E, Cerda T, Martínez D, Soto C, Pupo M, Pazos F, Lanio ME, Álvarez C. Effect of calcium on the hemolytic activity of *Stichodactyla helianthus* toxin sticholysin II on human erythrocytes. *Toxicon* 2009, 54: 845-850.
8. Aneiros A, García I, Martínez JR, Harvey AL, Anderson AJ, Marshal DL, Engström A, Hellman U, Karlsson E. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, aminoacid sequence and biological activity. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1993; 1157: 86-92.
9. Wanke E, Zaharenko AJ, Redaelli E, Schiavon E. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon.* 2009 Dec 15; 54(8):1102-1111.
10. Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon* 2009, 54: 1135-1147.
11. Aneiros A, García I, Martínez JR, Morales A, Pérez M, Acosta K, Cuquerella E, Alvarez M, Marrero M, Jomarron L, Harvey A, Engstrom A, Karlsson E. Diversidad de propiedades biológicamente activas en la secreción de la anémona *Bunodosoma granulifera*. Fondo Nac. de Manuscritos de C. y Técnica, 1998. Biblioteca Nac. de C. y Tecnología, No. de registro 96135, 8 pp.
12. Concepción AR. Alteraciones histopatológicas del hipocampo de ratas inyectadas con neurotoxinas. Conferencia. VI Congreso de Ciencias Veterinarias de Cuba y II Seminario de la Ciencia de los Animales de Laboratorio. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba, 2007.
13. Concepción ÁR. Uso de neurotoxinas marinas en la experimentación animal: e-Gnosis [en línea] 2009, vol. 7 no. [citado 2009-12-23]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=73011184002>. ISSN
14. Concepción AR, de la Peña R. Evaluación neuromorfológica de la F3 del extracto etanólico de *Bunodosoma granulifera* en rata. Evento de C. Básicas Médicas "Girón 2008". La Habana, Cuba, 2008.
15. Switzer RC. Strategies for assesing neurotoxicity. *Neurosci Biobehav. rev.* 1991; 15(1): 89-93.
16. Rojas RC, Lavín JC. Método de Litchfield y Wilcoxon para calcular dosis efectiva. Un programa para microcomputadora. Libro de resúmenes del Primer Congreso Latinoamericano de informática. Palacio de las Convenciones. La Habana 1992; pp 118.
17. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965, 27:137 A.
18. Pan JY, Yu ZQ. Isolation and characterization of Hainantoxin-II, a new neurotoxic peptide from the Chinese bird spider (*Haplopelma hainanum*). *Dongwuxue Yanjiu* 2010 Dec; 31(6):570-574.
19. de Faria DR, Santana JS, Menani JV, de Paula PM. Antidipsogenic effects of central adenosine-5'-triphosphate. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Jan, 42(1):105-113.
20. Yu P, Chang YZ, Miao W, Wang SM, Cui R, Qian ZM, Ke Y, Duan XL. Effects of intracerebroventricular injection of iron dextran on the iron concentration and divalent metal transporter 1 expression in the caudate putamen and substantia nigra of rats. *Anat Rec (Hoboken).* 2009 Feb, 292(2):225-233.

21. Bersier MG, Rodríguez de Lores Arnaiz G. Intracerebroventricular administration of ouabain to rats changes the expression of NMDA receptor subunits in cerebral cortex and hippocampus. *Neurochem Res*. 2009 Sep; 34(9):1650-1657.
22. Valluet A, Hmitou I, Davis S, Druillennec S, Larcher M, Laroche S, Eychène A. B-raf alternative splicing is dispensable for development but required for learning and memory associated with the hippocampus in the adult mouse. *PLoS One* 2010 Dec 22; 5(12):e15272.
23. Li N, Yu ZL, Wang L, Zheng YT, Jia JX, Wang Q, Zhu MJ, Liu XL, Xia X, Li WJ. Increased tau phosphorylation and beta amyloid in the hippocampus of mouse pups by early life lead exposure. *Acta Biol Hung*. 2010 Jun; 61(2):123-134.
24. Du H, Li M, Yang P. Effects of 3-benzidino-6-phenylpyridazine, as an acetylcholinesterase inhibitor, on outward potassium current in acutely isolated rat hippocampal pyramidal neurons. *Toxicol Lett*. 2008 Sep 26; 181(2):104-111.
25. Schenk GJ, Werkman T, Wadman W, Veldhuisen B, Dijkmans TF, Blaas E, Kegel L, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Over-expression of the DCLK gene transcript CARP decreases CA3/CA1 network excitability. *Brain Res*. 2010 Sep 17; 1352: 21-34.
26. Kim YB, Ryu JK, Lee HJ, Lim IJ, Park D, Lee MC, Kim SU. Midkine, heparin-binding growth factor, blocks kainic acid-induced seizure and neuronal cell death in mouse hippocampus. *BMC Neurosci*. 2010 Mar 26; 11:42.
27. Martorana A, Esposito Z, Koch G. Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?. *CNS Neurosci Ther* 2010 Aug; 16(4):235-245.
28. Jeon GS, Park SK, Park SW, Kim DW, Chung CK, Cho SS. Glial expression of interleukin-18 and its receptor after excitotoxic damage in the mouse hippocampus. *Neurochem Res* 2008, 33:179-184.
29. Zheng H, Zhu W, Zhao H, Wang X, Wang W, Li Z. Kainic Acid-Activated Microglia Mediate Increased Excitability of Rat Hippocampal Neurons in vitro and in vivo: Crucial Role of Interleukin-1beta. *NeuroImmunoModulation* 2010, 17 (1): 31-38; (DOI: 10.1159/000243083).
30. Ravizza T, Balosso S, Vezzani A, Aronica E. Inflammatory Responses and Cytokines. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* 2009, 588-592.
31. Takahashi DK, Vargas J, Wilcox K. Increased coupling and altered glutamate transport currents in astrocytes following kainic-acid-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2010 Dec; 40(3):573-585.
32. Zhang ZM, Jin T, Quezada HC, Mix E, Winblad B, Zhu J. Kainic acid-induced microglial activation is attenuated in aged interleukin-18 deficient mice. *Journal of Neuroinflammation* 2010, 7:26 doi:10.1186/1742-2094-7-26
33. Ball SM, Atlason PT, Shittu-Balogun OO, Molnár E. Assembly and intracellular distribution of kainate receptors is determined by RNA editing and subunit composition. *J Neurochem*. 2010 Sep; 114(6):1805-18. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06895.x.
34. Shin EJ, Jeong JH, Kim AY, Koh YH, Nah SY, Kim WK, Ko KH, Kim HJ, Wie MB, Kwon YS, Yoneda Y, Kim HC. Protection against kainate neurotoxicity by ginsenosides: attenuation of convulsive behavior, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *J Neurosci Res*. 2009 Feb 15; 87(3):710-722.
35. Lu B. Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2009, 9 (3): 212-219.
36. Li SY, Jia YH, Sun WG, Tang Y, An GS, Ni JH, Jia HT. Stabilization of mitochondrial function by tetramethylpyrazine protects against kainate-induced oxidative lesions in the rat hippocampus. *Free Radic Biol Med*. 2010 Feb 15; 48(4):597-608.
37. Bolton C, Paul C. Glutamate receptors in neuroinflammatory demyelinating disease. *Mediators Inflamm*. 2006; 2006(2): 93684.
38. Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 6 February 2009, 158 (3): 1030-1038.
39. Cirillo G, Maggio N, Bianco MR, Vollono C, Sellitti S, Papa M. Discriminative behavioral assessment unveils remarkable reactive astrocytosis and early molecular correlates in basal ganglia of 3-nitropropionic acid subchronic treated rats. *Neurochem Int*. 2010 Jan; 56(1): 152-160.

ANEXOS

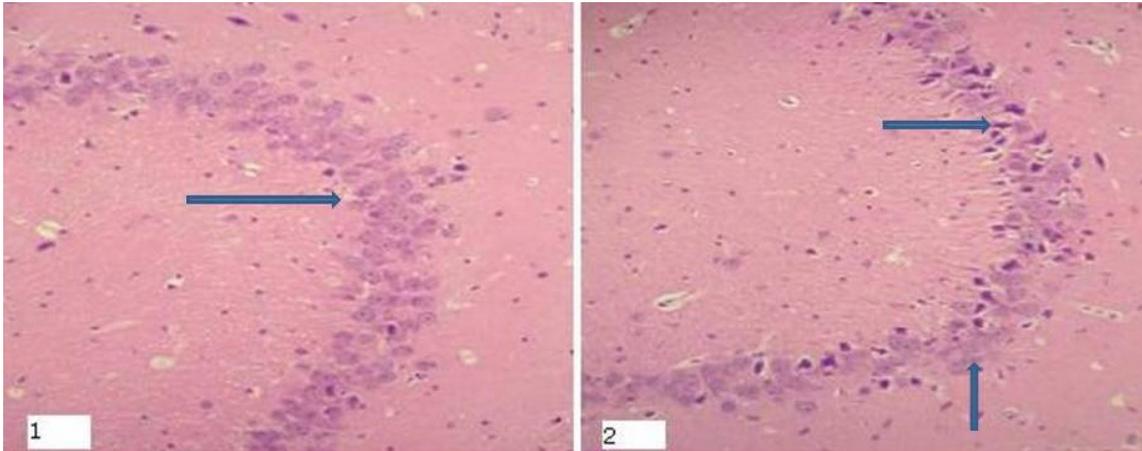


Figura 1. Control 3d post- inyección con SF. Neuronas del área CA3 de hipocampo normal (→). Se distinguen núcleo, nucleolo y citoplasma de las referidas neuronas. Coloración H-E. Bar=20 μ m

Figura 2- Experimental 3d post-inyección con F3 EEtBg. Área CA3 de hipocampo con neuronas moderadamente dañadas (→) y otras neuronas que van perdiendo sus características normales(↑). Coloración H-E. Bar=20 μ m

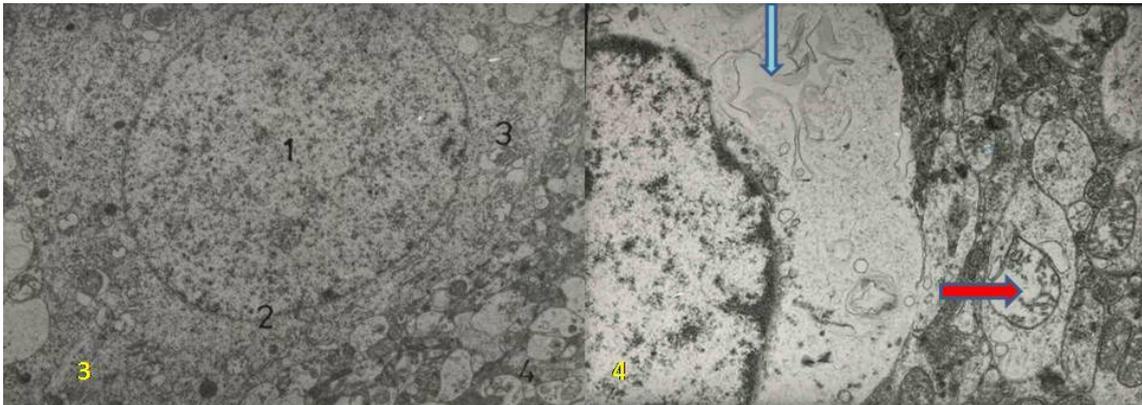


Figura 3. Estructura fina normal del hipocampo. Se observa una neurona al centro. Núcleo (1), envoltura nuclear (2), citoplasma (3) y el tejido circundante (4), normales. Observe la continuidad del tejido Bar=500 nm

Figura 4. Experimental. Mitocondrias incrementadas de tamaño, con sus crestas desorganizadas (→) y vacuolizaciones citoplasmáticas (↓) severamente dañados por el neurotóxico inyectado. Bar=500 nm

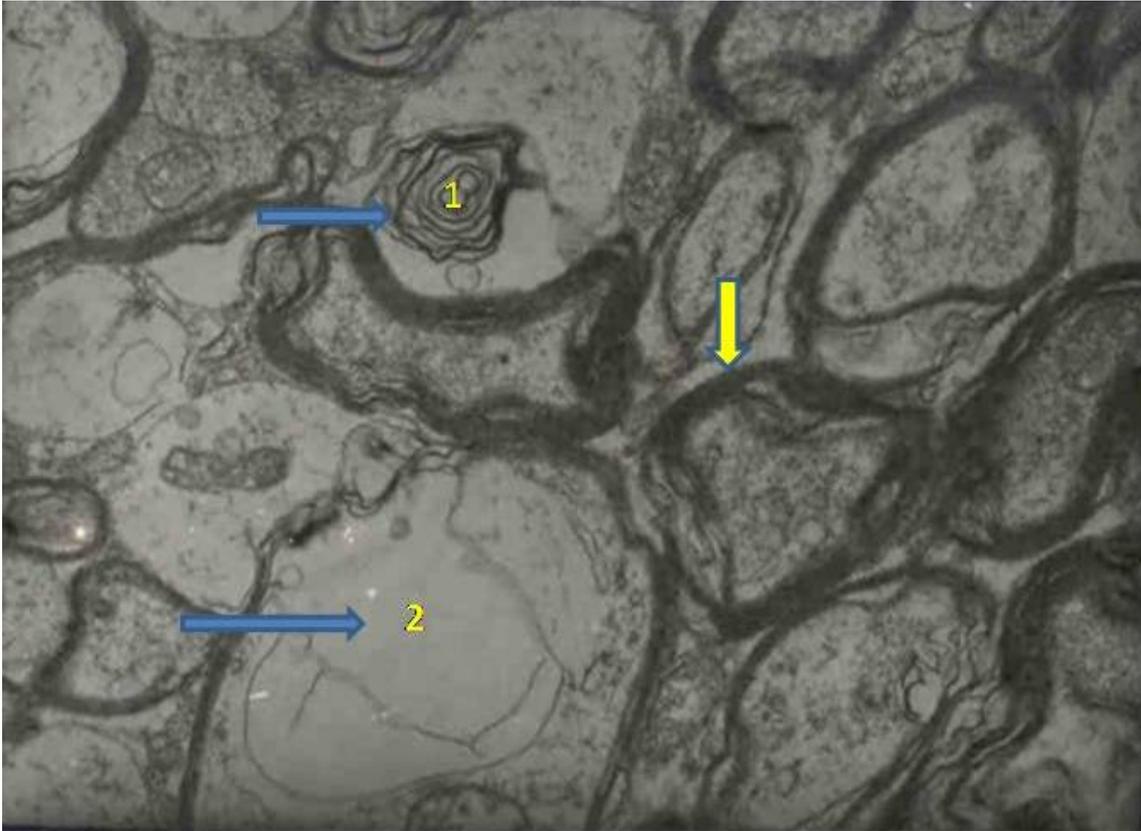


Figura 5. Experimental. Axones dañados con vacuolización intraxonal (→), en 1 se observa un ovillo y en 2 una gran vacuolización. Mielina alterada (↓). Bar=500 nm