



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS



EFEECTO DE LA HIPERTERMIA SOBRE EL DESARROLLO
CONDUCTUAL DE RATONES HEMBRA EN ETAPA PREPÚBER

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CURRICULAR
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACÉUTICO INDUSTRIAL

P R E S E N T A

LÓPEZ CANO SERGIO GABRIEL

ASESORES:

M. en C. GERARDO NORBERTO ESCALONA CARDOSO

DRA. NORMA PANIAGUA CASTRO

MÉXICO D.F. 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Desarrollo, del Departamento de Fisiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del M. en C. Gerardo Norberto Escalona Cardoso y coasesoría de la Dra. Norma Paniagua Castro. Con el financiamiento de los proyectos SIP 20151510 y 20150212.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	II

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Desarrollo del Sistema Nervioso Central.....	3
1.2 Hipertermia	3
1.2.1 Mecanismos de acción	3
1.2.1.2 Desnaturalización de proteínas.....	3
1.2.1.3 Muerte celular	3
1.2.1.4 Retraso en la proliferación celular	3
1.2.1.5 Cambios en la morfogénesis	3
1.2.2 Radicales libres.....	3
1.2.3 Reacción en cadena.....	3
1.2.4 Especies reactivas de oxígeno (RO'S)	3
1.2.5 Estrés oxidativo	3
1.3 Desarrollo motor	3
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	3
4. OBJETIVO GENERAL.....	3
5. OBJETIVOS PARTICULARES	3
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	3
7. RESULTADOS	3
8. DISCUSIÓN.....	3
9. CONCLUSIONES	3
10. BIBLIOGRAFIA.....	3

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIG.	TÍTULO	PÁG.
1	Actividad Motora.....	21
2	Caja de 2 compartimentos	24
3	Nado Forzado	25
4	Determinación de Corticoesterona.....	26
Tabla 1. Factores desencadenantes de la hipertermia.....		6
Tabla 2. Principales especies reactivas de oxígeno.....		14

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
MDC	Malformaciones del Desarrollo Cortical
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RO´S	Especies Reactivas de Oxígeno
RL	Radicales Libres
SOD	Súper Óxido Dismutasa
GB	Ganglios Basales

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, el considerado padre de la medicina, Hipócrates, ha enseñado a determinar que el cuerpo contiene 4 humores: la sangre, la bilis negra, la bilis amarilla y la flema. Si la salud estaba presente los humores se mezclaban entre sí, mientras que en la enfermedad se producían arreglos y variantes de la combinación entre ellos.

Aunado a ello, Hipócrates fue el primero en tratar de explicar el origen de las enfermedades, distinguiendo así entre las enfermedades endémicas (presentes en el área dada) y aquellas otras que se hacían excesivamente comunes (epidémicas), las cuales podrían ser originadas por varios factores, que al estado estable de los humores se vería alterado (Le Francois, 2001).

En la actualidad, para preservar la vida saludable, se necesita mantener una equidad entre 3 variables, por lo que se ha determinado que el origen de las mismas proviene de:

- 1.- Estado físico (alteraciones de la salud).
- 2.- Estado mental (alteraciones de la fuerza vital por emociones y/o pensamientos)
- 3.- Estado social (interacciones del organismo con el medio ambiente).

Al mantener la equidad de estos 3 estados, es posible llegar a la homeostasis del organismo, con esto evitando cualquier tipo de alteración o perturbación que ya sea mínima, puede detonar para el desarrollo de algún padecimiento. Con esto se entiende que la genética y el ambiente determinan el origen de la enfermedad, que es inducida por un desorden genético originado por la exposición a factores ambientales o por herencia. Posteriormente y con el paso del tiempo es posible desarrollar enfermedades ya sea por factores externos o internos que pueden dañar la mente, los sentimientos, los órganos y sistemas del individuo (Le Francois, 2001).

Existen diversas fuentes que reportan aproximadamente el 3% de los recién nacidos tienen un defecto en el desarrollo que pudiera requerir de atención

medica, otra tercera parte aproximadamente de estas condiciones podría considerarse que la vida se encuentre en peligro. Al aumentar la edad, los defectos que son detectados son más del doble. Y alrededor del 25% los defectos son de origen genético y menos del 10 % puede atribuirse a un agente teratogénico, sin embargo en la mayoría de los casos la causa del defecto sigue siendo desconocido (Shepard, 1989).

En los animales homeotérmos la temperatura corporal es generalmente más alta que la del hábitat, sin embargo existen regiones del mundo que la exceden en gran proporción. La temperatura real a la que se mantiene el cuerpo en este tipo de organismos varia de especie a especie, y en menor grado, de individuo a individuo. En el hombre la temperatura bucal es de 37°C; sin embargo, la rectal representa la temperatura interna y varia muy poco con los cambios externos; en la parte central del cuerpo humano normal, experimenta una fluctuación circadiana regular de 0.5°C a 0.7°C (Ganong, 1990).

Cuando la temperatura corporal se incrementa a 42 o 43°C, es muy difícil y casi imposible que los mecanismos de regulación puedan compensar este cambio y así retornar a valores normales; y esto ocurre en muchos estados patológicos, por ello es muy importante para el médico, valorar la gravedad del estado del paciente. La causa más frecuente de fiebre es la infección grave por bacterias y virus como sucede en la fiebre amarilla, la fiebre tifoidea, tuberculosis, difteria, sarampión, parotiditis, poliomielitis y neumonía (Guyton, 1985).

Se sabe desde hace 50 años que la hipertermia y una amplia variedad de factores como el metabolismo, ambiente materno, estado nutricional, y alcoholismo, pueden alterar el desarrollo normal de los mamíferos después de actuar en el organismo materno o fetal (Mirkes y Fantel, 1990).

1.1 Desarrollo del Sistema Nervioso Central.

Puesto que la conducta representa la expresión integrada de la respuesta del individuo al interactuar con el medio ambiente, el deterioro de los sistemas biológicos se refleja en la actividad del SNC (Weiss y Cory-Slechta, 1994).

El análisis anatómico, bioquímico y conductual, es útil en la evaluación del funcionamiento del SNC y su asociación ayuda en los estudios de la acción toxica sobre la conducta. Idealmente las pruebas de diagnóstico para alteraciones del SNC deben ser sensibles y rápidas. (Rodier y cols. 1979; Butcher, 1985).

El sistema nervioso, conjuntamente con el endocrino regula y coordina las actividades de los órganos y sistemas, función imprescindible para preservar la integridad del organismo en condiciones de homeostasis. Estas funciones son posibles por que el sistema nervioso tiene una alta especialización en procesar la información y su posterior integración.

Dicho sistema es susceptible durante su desarrollo, a sufrir daños por agentes físicos y químicos, produciendo alteraciones debidas a la exposición de algunos agentes cuya dosis pueden ser incluso más bajas que las que causen toxicidad maternal y neonatal (Vistrain, 1996).

Desde este punto de vista, diversos investigadores han observado alteraciones importantes de comportamiento emocional en el aprendizaje y en otros parámetros de comportamiento, en animales que habían sufrido condiciones de estrés durante su desarrollo gestacional, pero el mecanismo de este efecto no se conoce (Menéndez-Patterson, 1980).

En estudios con animales, se ha encontrado que durante el periodo prenatal, el desarrollo del producto está determinado por ciertas cuestiones ambientales; es por ello que eventos deletéreos durante el embarazo inducen defectos neurobiológicos y conductuales en las crías, algunos de ellos con la alteración en la formación del hipocampo.

De hecho, los resultados de estrés prenatal muestran una mayor producción materna de hormonas relacionadas con el estrés, las cuales al aumentar su concentración durante períodos críticos del desarrollo cerebral del feto provocan una respuesta definitiva, ya que la corticosterona en las crías se ha asociado con

una reducción en el número de receptores a corticosterona en hipocampo (Lemaire et al., 2000).

El periodo durante el cual se desarrolla en Sistema Nervioso, es bastante prolongado y vulnerable a efectos tóxicos, ya que continua hasta el periodo postnatal; consecuentemente la capacidad dinámica y de integración del organismo, manifestada a través de la conducta es un indicador sensible de su desarrollo progresivo. Buelke-Sam y Kimmel en 1979, informaron que la actividad neuromuscular (reflejos y desarrollo motor) es ampliamente usada en estudios de toxicidad. El proceso de mielinización en humanos, comienza durante el cuarto mes de vida intrauterina y para muchas fibras del SNC culmina en el periodo postnatal, siendo más activo en las fases de crecimiento; se desarrolla a partir de un área gruesa del ectodermo embrionario en forma de sandalia, llamada placa neural; el proceso noto cordal subyacente y el mesodermo adyacente inducen al ectodermo que los recubre a diferenciarse hacia la placa neural, a partir de la cual se forma los pliegues, el tubo y la cresta neural de manera lenta, el tubo se diferencia hacia el SNC, que consiste en encéfalo y médula espinal. La cresta origina la mayor parte del SNP. El tubo inicia su formación en la región del cuarto a sexto pares de somitas. Este es el primordio de la región cervical de la medula espinal. En esta etapa los 2 tercios craneales de la placa y el tubo neural, cuyo límite caudal se localiza a nivel del cuarto par de somitas, representa el futuro encéfalo y el tercio caudal del tubo y la placa representa la médula espinal futura (Moore y Persaud, 1995).

En la futura región cefálica, los abultamientos darán lugar a las vesículas del prosencefalo, mesencéfalo y rombencéfalo (vesículas encefálicas anterior, media y posterior respetivamente). A su vez, el prosencefalo da lugar al telencéfalo, que se transformara en los hemisferios cerebrales y al diencéfalo, formado por el epítalamo; en la parte dorsal se desarrolla una zona para la correlación de los impulsos olfatorios, el tálamo que transmite sensibilidad cutánea y el hipotálamo que regula el comportamiento emocional. El mesencéfalo tiene como derivados

más complejos los tubérculos cuadrigeminos y los pedúnculos cerebrales. Los tubérculos están relacionados con las fibras de la retina y envían impulsos a los músculos motores oculares, y los pedúnculos constituyen centros de reflejos acústicos. El rombencéfalo da lugar al metencéfalo que origina el cerebelo y la protuberancia anular en conexión íntima en los centros sensitivos relacionados con el equilibrio del cuerpo así como con el mantenimiento del tono muscular, también con el mielencéfalo o bulbo raquídeo (estructura de transición entre cerebro y médula), que alberga centros de casi todos los reflejos involuntarios (Zarrabeitia y cols., 1991)

El reflejo ha sido la base en la descripción del comportamiento; su estudio ha llevado a generalizar muy las relaciones que existen entre la conducta y lo que ocurre en el SNC; para la interpretación de las alteraciones sobre la conducta, siguiendo una exposición perinatal, es importante evaluar las características físicas del animal, así como pruebas de desarrollo físico; respuestas neuromusculares más frecuentemente evaluadas para obtener información sobre la integridad funcional del SNC, así como el comportamiento exploratorio, preferencia a la sacarina y conducta sexual, entre otras (Buelke-Sam y Kimmel, 1979)

1.2 Hipertermia

La temperatura es una medida de calor, el calor generado por reacciones bioquímicas en un organismo su temperatura interna.

La endotermia es el mantenimiento de una apreciable diferencia entre la temperatura corporal y la temperatura ambiental (Hill, 2007)

Por medio de la producción interna de calor el cuerpo puede mantenerse caliente en ambientes fríos, ya que el calor es producido en un metabolismo oxidativo, así como frío en ambientes calurosos, por la sudoración del cuerpo. Una temperatura

corporal implica un equilibrio exacto entre la producción de calor y la pérdida del mismo.

La temperatura corporal promedio es de 37.5°C en el recto, 36.5° C en la boca y 35.5°C en la axila. Aunque existe una fluctuación diaria de alrededor de 1 o 2°C (Le Vay, 2004).

La hipertermia se define como la elevación de 1.5 °C por arriba del valor basal (Lee y cols., 2009), o como el incremento de la temperatura corporal por un fracaso de los mecanismos periféricos para mantener la temperatura corporal normal. Esta deficiencia causa el incremento de la temperatura por encima de los valores normales. (Argente, 2008).

Este estado es potencialmente mortal y no es tratable con antipiréticos debido a que no existe una termorregulación (Melero, 2008).

Este estado de hipertermia puede clasificarse de la siguiente manera:

- Hipertermia ligera: entre 37.5 - 38.5°C
- Hipertermia moderada: entre 38.6 - 39.9°C
- Hipertermia alta: Mayor de 40°C
- Hipertermia maligna: Mayor de 41°C

(Duque-Ramírez y Rubio-Vanegas, 2006)

Tabla 1. Factores desencadenantes de la hipertermia.

Causa	Ejemplo
Producción excesiva de calor.	<ul style="list-style-type: none">❖ Ejercicio intenso y prolongado.❖ Reacciones adversas a neurolépticos y anestésicos.

Disminución de la disipación del calor (por temperatura y humedad elevada).	❖ Golpe de calor
Perdida de la regulación central (Daño hipotalámico).	❖ Traumatismo ❖ Hemorragia ❖ Tumor
Otras.	❖ Uso de anticolinérgicos. ❖ Uso de drogas.

Es por ello que desde un punto de vista fisiopatológico, el diagnóstico que va a diferenciar entre una hipertermia y una fiebre se basa en una minuciosa historia clínica y no en los registros térmicos.

Se ha encontrado que el tipo y severidad de las malformaciones depende de la especie y la cepa del animal (genotipo) así como de las etapas críticas de organogénesis en las que se aplica la hipertermia. A pesar de que existen similitudes en los defectos causados por la alta temperatura en diferentes especies, cada una de ellas tiene su propio espectro de características; estos efectos indican que las diferencias genéticas influyen en el tipo y severidad del daño (Webster y cols., 1985; Finell y cols., 1986).

Los endotermos son una clase de animales que pueden mantener una temperatura estable aunque existan cambios considerables en la temperatura ambiental. En los humanos, el valor para la temperatura oral corresponde a 37°C, pero esta puede variar de acuerdo con la hora y la parte del cuerpo en donde se determine. En las ratas la temperatura central es de 38 °C. Además factores como la edad, la alimentación y el embarazo pueden modificar este valor (Junquera y De la Cruz, 1998).

Estudios en ratas han demostrado que la hipertermia induce convulsiones acompañadas de pérdida neuronal; por lo que es ampliamente utilizado como modelo para convulsiones febriles (Erkankli y cols., 2011).

La temperatura corporal está regulada por un balance entre la producción y la pérdida de calor, cuando la producción de calor en el cuerpo es mayor que su pérdida, el calor se acumula y por lo tanto la temperatura se eleva, lo cual puede provocar un estado de hipertermia en el individuo; este fenómeno también ocurre inversamente.

Se tiene evidencia de que la hipertermia puede llegar a retardar el crecimiento de algunos tumores; sin embargo temperaturas rectales por arriba de 41 °C durante periodos prolongados, resultan peligrosas ya que provocan daño cerebral permanente, y si se exceden los 43 °C se desarrolla golpe de calor y sobreviene la muerte (Ganong, 2001).

La hipertermia maligna se caracteriza por una mutación en el gen codificante del receptor de la rianodina, lo que provoca una excesiva liberación de calcio durante la contracción muscular desencadenada por el estrés. Esto, da lugar a contracciones musculares, aumento del metabolismo muscular y a un gran incremento en la producción de calor en el músculo, el cual sufre un considerable aumento de la temperatura corporal lo que puede llegar a provocar la muerte (Ganong, 2001).

Ciertas anormalidades en el desarrollo de la corteza cerebral están estrechamente relacionadas con la epilepsia en seres humanos. El modelo de la irradiación en el útero de ratas comparte muchas características clínicas e histopatológicas con malformación humana del desarrollo cortical que inducen daño neuronal difuso. Se han creado varios modelos animales de malformaciones del desarrollo cortical (MDC). El seguimiento sistemático a largo plazo se ha realizado sólo en el modelo de la irradiación *in útero* (Kondo, 2001).

Se ha demostrado que las células migratorias son más sensibles a la radiación. Por lo tanto, defectos en la migración y el daño neuronal se observaron en el hipocampo de la rata irradiada (Kellinghaus y cols., 2004).

Los estudios experimentales han demostrado que son fácilmente inducidas las convulsiones por hipertermia y producen una alta mortalidad acompañada por la pérdida neuronal en ratas. Se ha sugerido en estudios experimentales y clínicos que la patología cerebral subyacente podría aumentar la susceptibilidad a las crisis en la infancia temprana y que esto va a generar convulsiones relacionadas con la esclerosis del hipocampo en el futuro (Palmini y cols., 1991, Germano y Sperber., 1993).

Daño del hipocampo observado en pacientes jóvenes con la pérdida neuronal y gliosis puede ser causada por la hipertermia. Las convulsiones inducidas por hipertermia son más frecuentes en las ratas con malformaciones del desarrollo cortical (MCD) como la displasia cortical focal (Germano y Sperber., 1993) y la heterotropía (Sloviter y Pedley, 1998).

1.2.1 Mecanismos de acción

La hipertermia se produce cuando estamos expuestos a un ambiente de altas temperaturas, causando con esto una disfunción en el sistema termorregulador, induciendo diferentes mecanismos.

Se ha reconocido durante muchos años que el calor provoca la desnaturalización de las proteínas, incluso a la temperatura corporal normal existe una pérdida equilibrada pero significativa de células debido al daño por calor. Es posible que la muerte celular y otros cambios celulares involucrados en el daño embrionario sean causados por la desnaturalización de enzimas y otras proteínas funcionales y estructurales. Las investigaciones recientes sobre la respuesta de choque térmico en embriones añaden peso a esta posibilidad (Graham y cols., 1998; White y cols., 2007).

Estudios específicos sobre la afección de la hipertermia sobre defectos neuroepiteliales en embriones muestran que hay muerte celular mesodérmica y retraso en la proliferación celular (Vistrain, 1996).

La inducción de alteraciones por hipertermia, podría deberse al efecto directo de la temperatura sobre los embriones o en forma indirecta, por modificaciones metabólicas, endócrinas o fisiológicas en la madre o bien, la suma de los dos (Brenes, 1997).

Se ha encontrado una perturbación grave de la membrana basal, lo que lleva a una arquitectura desordenada del neuroepitelio, incluyendo la subsiguiente formación de rosetas y nidos ectópicos de las neuronas.

El cerebro embrionario dañado por el calor no parece tener una capacidad de crecimiento que compense el déficit de células muertas por calor (Graham y cols., 1998).

La hipertermia induce muerte celular, disrupción de las membranas, alteración vascular, necrosis de placenta, paro en la actividad proliferativa, marcada reducción en la mitosis y niveles variables de muerte celular apoptótica.

Además, debido al estrés térmico la mitocondria y otros organelos pueden verse alterados tanto en función como en estructura, provocando alteraciones que interfieren con la función celular y su morfogénesis (Vistrain, 1996, Graham y cols., 1998; Babita y cols. 2013).

Se ha postulado que uno de los principales mecanismos por los cuales la hipertermia produce las aberraciones mencionadas anteriormente se debe a la perturbación del equilibrio pro-oxidante y antioxidante por la generación de especies reactivas de oxígeno (RO'S). Varios estudios han sugerido que la exposición al calor podría causar estrés oxidativo, que a su vez conduce a la citotoxicidad. El estrés térmico aumenta la producción de radicales de oxígeno, posiblemente por la interrupción del sistema de transporte de electrones de la

membrana. El calor inducido por la formación de RO'S puede ser un factor adicional que proporciona cambios moleculares en el ADN, proteínas, lípidos y otras moléculas biológicas (Vistrain, 1996, Graham y cols., 1998; Babita y cols., 2013).

1.2.1.2 Desnaturalización de proteínas

Los cambios ambientales o los tratamientos químicos pueden causar una desorganización en la conformación activa de una proteína, con la pérdida concomitante de la actividad biológica. Esa desorganización se llama desnaturalización. La mayoría de las veces la desnaturalización suele ser pequeña, quizá el equivalente a la desorganización en 3 o 4 puentes de hidrógeno. Dado que existen diversas formas en las que se pueden desnaturalizar las proteínas, una de ellas es el aumento de la temperatura. Y es que un aumento inusual de la temperatura provoca movimientos moleculares rápidos, que pueden inducir a la ruptura de los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas, provocando una mutación en la proteína, haciendo que pierda su estabilidad y actividad (Melo y Cuamatzi., 2007; Sadava, 2009)

1.2.1.3 Muerte celular

Aunque no están bien definidos los límites de la tolerancia a la hipertermia por el organismo humano, se sabe que por encima de los 42°C (punto crítico térmico), hay un daño, por alteraciones en los enlaces químicos relacionados con reacciones enzimáticas, que conducen a la inestabilidad en la membrana hasta romperla. Tras el rompimiento de la membrana, hay un incremento rápido de la presión intracelular ocasionada por la ebullición del líquido intracelular (Carrasco y De Paz., 2000; Córdova, 2009)

1.2.1.4 Retraso en la proliferación celular

Cuando la temperatura se eleva por encima de los 43°C el calor genera daños irreparables que dan lugar a la muerte de las células en un proceso conocido como ablación térmica. Específicamente los efectos generados por el calor excesivo corresponden a la afectación de los procesos proliferativos de las células, básicos para la reproducción (meiosis, mitosis). Las células proliferativas son mucho más sensibles al calor que las no proliferativas (Piñeiro, 2005).

1.2.1.5 Cambios en la morfogénesis

Los ácidos nucleicos DNA y RNA son los portadores de la información genética de la célula, el daño de estos ácidos nucleicos por calor, con frecuencia resultan letal para la célula, ya que no podrá replicarse o inducir la síntesis de proteínas, que afectaran directamente las funciones metabólicas (Tortora y cols, 2007).

1.2.2 Radicales libres

Un radical libre (RL) es un átomo o grupo de átomos que contienen por lo menos un electrón en su última capa orbital no apareado. Los electrones son partículas cargadas negativamente, se suelen presentar en pares y tienen una organización química estable. Cuando un electrón carece de pareja otro átomo o molécula se une a él, lo que produce una reacción química. Son en general extremadamente inestables y reaccionan con facilidad, tales estados químicos reaccionan fácilmente con sustancias químicas inorgánicas y orgánicas; al ser generados en las células atacan ávidamente los ácidos nucleicos, así como una gran variedad de proteínas y de lípidos celulares. Además los RL dan comienzo a reacciones autocatalíticas; las moléculas que reaccionan con RL son convertidas a su vez en RL, generando el daño por una reacción en cadena (Kumar y cols., 2008).

1.2.3 Reacción en cadena

Las reacciones en las que el producto de una de las etapas es el reactivo del siguiente paso se denominan reacciones en cadena; todas las reacciones en cadena se caracterizan por una secuencia de 3 etapas (Seyhan, 2000):

1. Iniciación: En la que se forma el primer intermediario y se inicia la cadena.
2. Propagación: En la que la cadena se repite varias veces.
3. Terminación: En la que la reacción en cadena se detiene.

1.2.4 Especies reactivas de oxígeno (RO'S)

El oxígeno es indispensable para la vida de distintos y variados organismos, entre los cuales destaca el ser humano. No obstante, si su presión es excesiva puede llegar a ser tóxico, ya que tiende a producir RL.

Las especies reactivas de oxígeno (RO'S) son un tipo de RL del derivado del oxígeno cuya función en la lesión celular está bien establecida. Tienen muy diversos efectos sobre las células, sin embargo, tres reacciones en particular son relevantes de acuerdo a la reacción con la lesión celular mediada por RL:

1. Peroxidación lipídica de las membranas.
2. Enlaces entre proteínas.
3. Fragmentación del DNA.

(Kumar y cols, 2008)

Tabla 2. Principales especies reactivas de oxígeno

ROS	Fórmula
Radical superóxido	O_2^-
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2

Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Radical oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Radical peróxido	$\text{ROO}\cdot$

1.2.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se origina debido al desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante celular; la producción de ROS, ocurre de manera constante en la mitocondria. Entre un 2 y 5% del oxígeno disponible para la cadena respiratoria se reduce para generar RL (Lagos y cols, 2012).

Es una condición asociada a un mayor daño celular inducido por los RL o las ROS (Lerner y Urbina, 2008).

Las células han desarrollado muchos mecanismos para eliminar las RL, y de este modo reducir al mínimo la lesión. Hay varios sistemas enzimáticos y no enzimáticos endógenos que contribuyen a la inactivación de las reacciones de los RL:

1. Velocidad de descomposición espontanea aumentada por la acción de superóxido dismutasa (SOD).
2. Protección catalizada por la Glutación peroxidasa, acción de la catalasa (presente en peroxisomas).
3. Antioxidantes endógenos o exógenos (Vitaminas E, A y C, ácido lipóico y el β -caroteno), (Kumar y cols, 2008).

El estado de estrés oxidativo refleja un relativo balance entre las RO'S generadas y las RO'S removidas. Por eso, una alteración entre la generación de RO'S y los mecanismos antioxidantes puede resultar en daño celular (Tortolero y cols., 2005)

1.3 Desarrollo motor

En conjunto los estudios anteriores tienen en común que la hipertermia produce defectos a nivel del tubo neural y que a pesar de que puede causar alteraciones en el desarrollo normal de varios órganos, el sistema nervioso es el principal blanco ya que es el más sensible al efecto de la temperatura (Froeze, 1991).

También en la mayoría de los trabajos experimentales, no se evalúan los cambios conductuales que las crías pueden llegar a presentar; sólo en el trabajo de Shiota y Kayamura (1998) se menciona que se encontró una disminución en la actividad motora en campo abierto.

Algunos otros trabajos mencionan cambios en la morfología neuronal destacando al hipocampo, sin embargo, ninguno menciona los cambios en otras estructuras involucradas en más conductas (Erkankli y cols., 2011).

La expresión de los patrones de acción demuestra que los fetos son sensibles a los estímulos exteroceptivos, como estímulos cutáneos, olfativos y gustativos. De hecho, se han observado patrones de actividad fetal, como limpieza facial, que asemeja el acicalamiento en ratas adultas (Robinson y Brumley, 2005).

Cuando las ratas son adultas los movimientos que ejecutan son más coordinados. Para poder lograr la locomoción y otros patrones de movimientos más complejos, son varios los núcleos y estructuras encargadas de ello. El circuito espinal motor está encargado de funciones básicas de los miembros posteriores, en ratas parece estar distribuido a lo largo de la ampliación lumbar y la médula torácica inferior, y es probablemente se compone de muchos generadores de ritmo que controlan los diferentes músculos y articulaciones, para los miembros anteriores está situado en la parte cervical inferior y segmentos torácicos superiores. La otra fuente principal de entrada a los circuitos del centro locomotor espinal surge del cerebro. Los circuitos espinales reciben aportación directa de la corteza cerebral, núcleo rojo, núcleos vestibulares y numerosos núcleos del bulbo raquídeo incluyendo *locus coeruleus* y los núcleos del rafe. Además, hay muchas áreas del

cerebro que intervienen en el control locomotor pero no proyectan directamente en la médula espinal, los cuales incluyen el cerebelo, los ganglios basales y varias zonas colectivamente conocidas como regiones del aparato locomotor. Los ganglios basales (GB) representan a un importante sistema neuronal, el cual está formado por 4 núcleos: estriado, el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. Los GB están localizados en la parte más interna de los hemisferios cerebrales y están interconectados con diversas estructuras como la corteza, tallo cerebral y amígdala (Worbe y cols. 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Desde 1935 se han hecho estudios que han demostrado que la hipertermia es un importante agente en el retraso y proliferación de ciertas estructuras tanto en animales como en humanos.

Los daños inducidos por la exposición a altas temperaturas en distintas etapas de la vida son revisados por diversos estudios, no obstante, los estudios sobre el efecto de la hipertermia durante la etapa prepúber, y la consecuencia conductual son pocos.

Por este motivo el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la hipertermia conductual de ratones hembra en etapa prepúber y observar si existen cambios conductuales, motores y sobre el desarrollo de ansiedad o depresión.

3. HIPÓTESIS

Si se inducen diferentes grados de hipertermia en ratones hembra en etapa prepúber; entonces se producirán cambios conductuales y neurológicos similares a la ansiedad o depresión.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un ambiente hipertérmico sobre parámetros conductuales en ratones hembra en etapa prepúber.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el efecto de un ambiente hipertérmico sobre la actividad motora de ratones hembra en etapa prepúber.
- b) Evaluar el efecto de un ambiente hipertérmico sobre la ansiedad de ratones hembra en etapa prepúber.
- c) Evaluar el efecto de un ambiente hipertérmico sobre la depresión de ratones hembra en etapa prepúber.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se emplearon 4 lotes de 8 ratones hembra con un peso corporal promedio de 20 g, en jaulas de acero inoxidable, con cama de aserrín a condiciones de temperatura y humedad controladas, con agua y alimento a libre demanda.

Los animales recibieron los siguientes tratamientos de acuerdo al lote correspondiente:

- a) Temperatura ambiente (Testigo)
- b) Temperatura de 38°C
- c) Temperatura de 40°C
- d) Temperatura de 42°C

Todos estos tratamientos se realizaron durante 10 minutos por 15 días en una incubadora con un termostato para mantener la temperatura constante, registrando el peso corporal diario.

Al término del tratamiento se procedió a realizar las pruebas conductuales, una por día, las cuales fueron:

Actividad Motora a Campo Abierto (Día 16): se realizó en una tabla cuadrículada, y consistió en colocar al ratón en una esquina de la tabla y contar el número de cuadros que recorría; esta prueba duró tres minutos y se determinó el número de cuadros que recorre el ratón por minuto, en la cuál se evaluó si el ratón presenta deficiencias para poder moverse con facilidad, además de la capacidad de exploración que tiene el mismo.

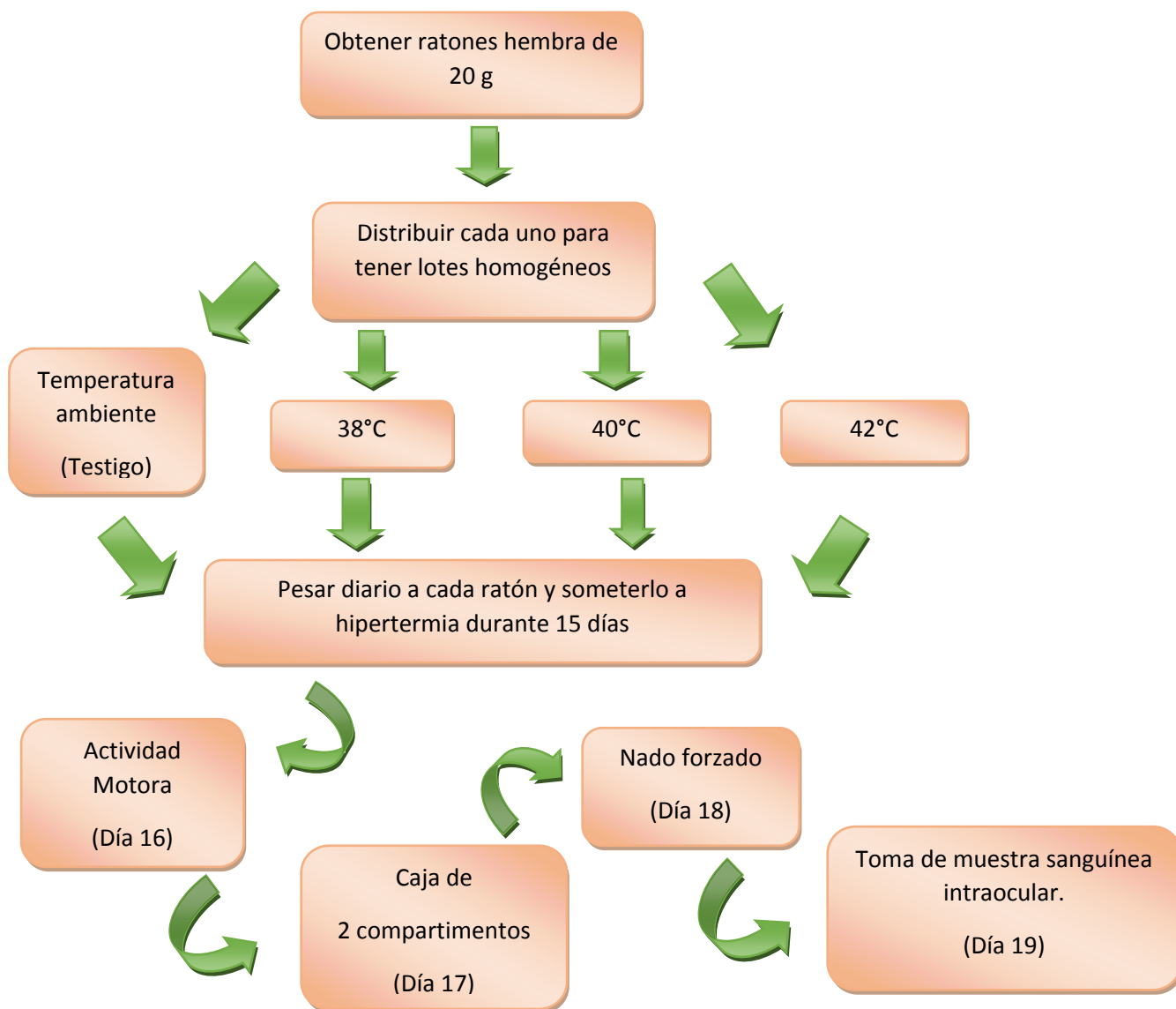
Caja de 2 Compartimentos (Día 17): se realizó en una caja que consta de un campo oscuro, y otro iluminado con luz artificial; la prueba duró 10 minutos en la que se tenían 4 parámetros a medir, y así determinar su conducta: número de transiciones de un campo a otro, el tiempo de inmovilidad, número de levantamientos de los ratones, y el tiempo de permanencia en el campo iluminado.

Nado Forzado (Día 18): se realizó con un recipiente de vidrio de 25 cm de alto y 10 cm de diámetro lleno de agua a 37°C, (para no modificar la actividad del ratón durante la prueba) esta prueba duró 5 minutos y se determinó el tiempo de inmovilidad total del ratón dentro del agua, es decir que no presentó movimientos de nado.

Posterior a estas pruebas conductuales se realizó una toma de muestra sanguínea por punción retroorbital (Día 19) para la obtención del suero, y posteriormente se determinaron los niveles de corticosterona con un kit comercial.

Los resultados se analizaron con el programa estadístico Sigma Plot ver.11 con las pruebas ANOVA unifactorial para las variables que pasaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas y Kruskal Wallis para las variables no paramétricas.

DIAGRAMA GENERAL DEL TRABAJO



7. RESULTADOS

Los resultados de la prueba de actividad motora en campo abierto se muestran en la figura 1, con respecto al número de cuadros recorridos (Fig. 1A) se observó una mayor actividad en el primer minuto y luego descendió conforme avanzó el tiempo; esta tendencia fue igual en todos los tratamientos. En cuanto a la actividad motora acumulada (Fig. 1B) se notó un ligero incremento con el tratamiento de 38°C y una ligera disminución en el lote de 42°C, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre ninguno de los lotes.

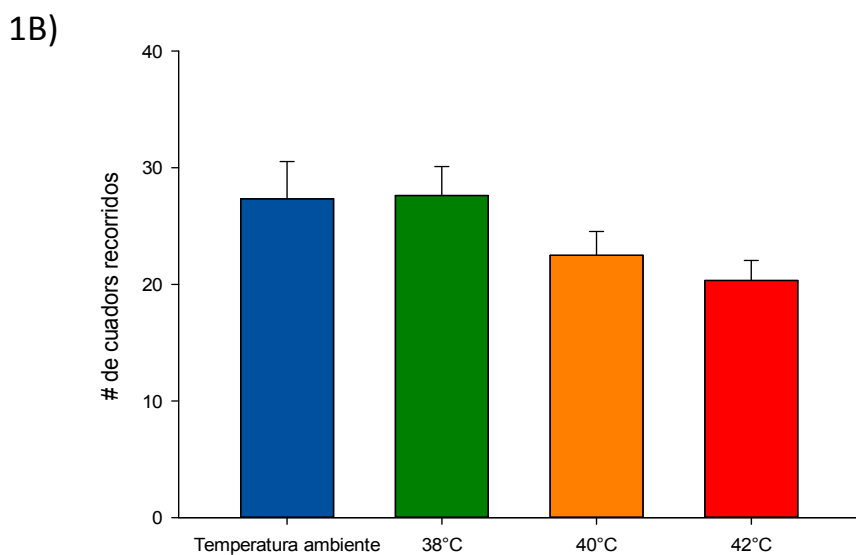
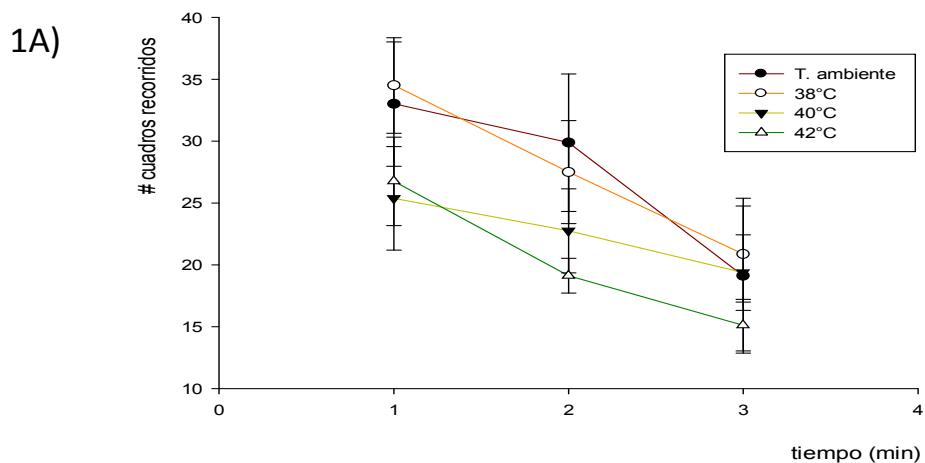
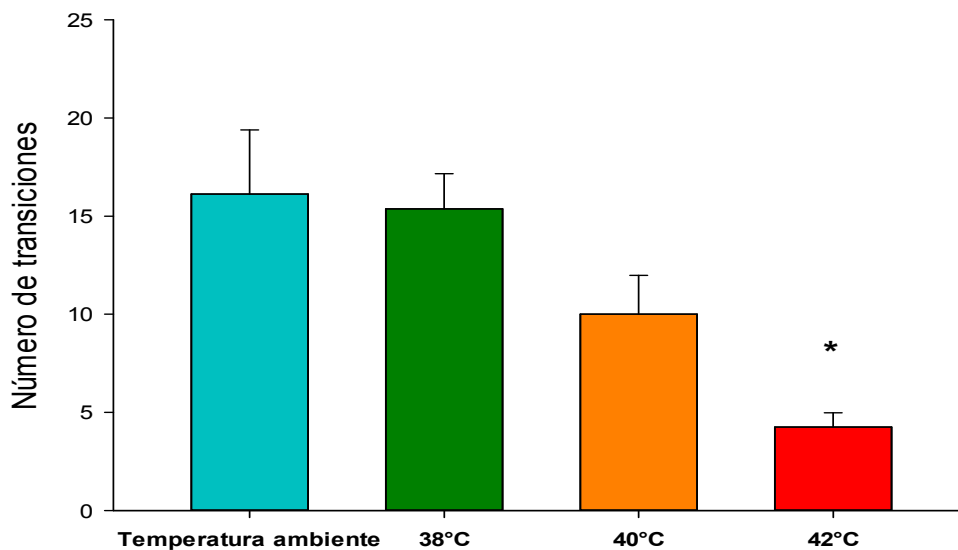


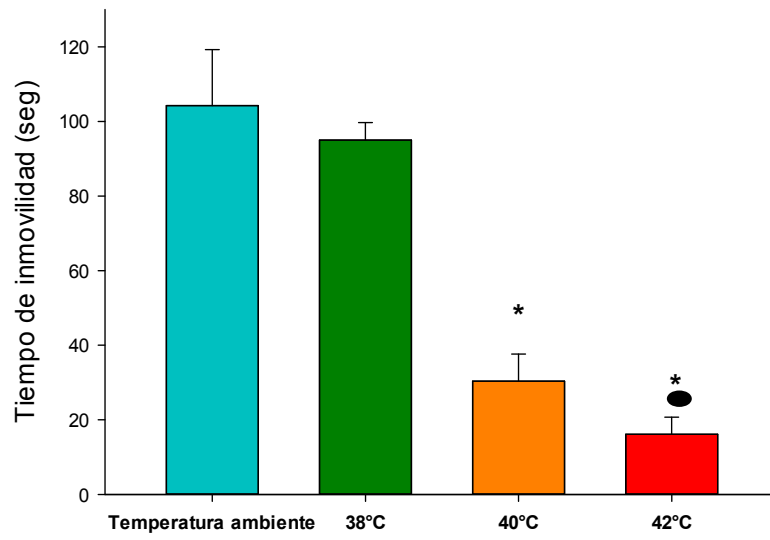
Fig.1 Actividad motora 1A) por minuto, 1B) acumulada, de ratones hembra durante el tratamiento; n=8, Temperatura ambiente, 38°C, 40°C, 42°C, Media \pm E.E. ANOVA unifactorial ($p \geq 0.05$)

Los resultados de la prueba de Caja de 2 compartimentos se muestran en la figura 2, con respecto al número de transiciones (Fig. 2A) se observó una menor actividad en el lote de 42°C con respecto al lote testigo ($p < 0.05$), los resultados del tiempo de inmovilidad (Fig. 2B) observamos una tendencia parecida al anterior parámetro, los lotes tratados con 42°C y 40°C son menores significativamente en comparación con los lotes Testigo y 38°C; en los resultados obtenidos en el número de levantamientos (Fig. 2C) se observó un menor número en el lote tratado a 42°C en comparación con los demás lotes, y los resultados obtenidos en el tiempo de permanencia en el campo iluminado (Fig. 2D) se observó una diferencia significativa entre todos los lotes tratados, En todas las variables se observa una disminución significativa dependiente de la temperatura, siendo la de 42°C la que más afecta a los ratones.

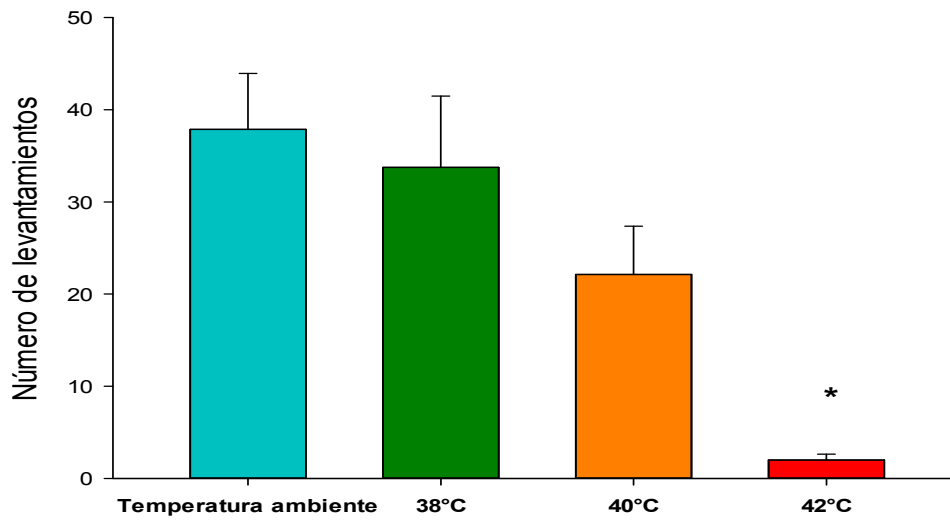
2A)



2B)



2C)



2D)

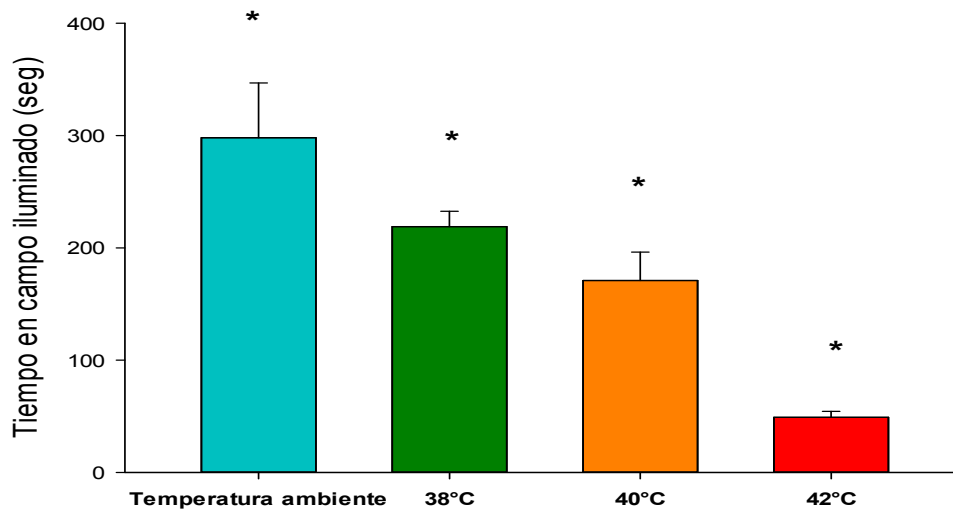


Fig.2. Resultados de la prueba de ansiedad en la caja de 2 compartimentos, de los ratones hembra sometidas a tratamiento; 2A) Número de transiciones, 2B) Tiempo de inmovilidad en el compartimento iluminado, 2C) Número de levantamientos y 2D) Tiempo de permanencia en el lado iluminado; n=8 Temperatura ambiente, 38°C, 40°C, 42°C, Media \pm EE. ANOVA * $p < 0.05$ contra los demás tratamientos; ● $p < 0.05$ contra el lote testigo y el de 38°C.

Los resultados obtenidos en la prueba de nado forzado se muestran en la figura 3, donde la variable medida fue el tiempo de inmovilidad de los ratones hembra, en el cual se observó un mayor tiempo de éste en el lote de 42°C con respecto al lote testigo ($p < 0.05$).

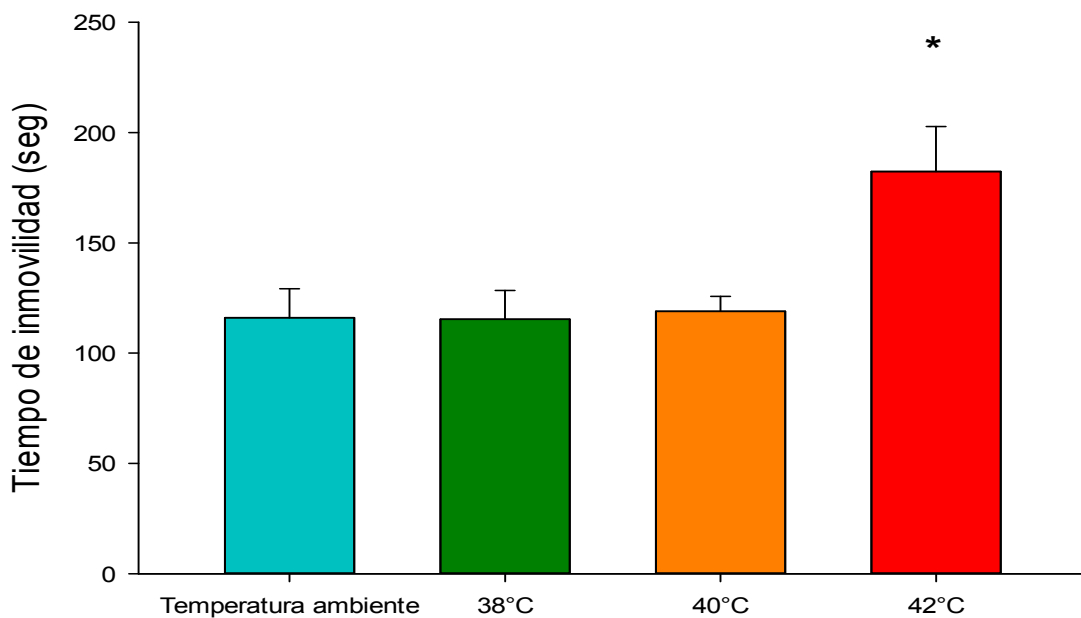


Fig.3. Tiempo de inmovilidad en prueba de Nado forzado de ratones hembra durante el tratamiento; Temperatura ambiente n=8, 38°C, 40°C, 42°C, Media \pm EE, ANOVA unifactorial ($p \geq 0.05$).

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de Cortisona en sangre se observan en la figura 4, y no se encontraron diferencias significativas entre los lotes.

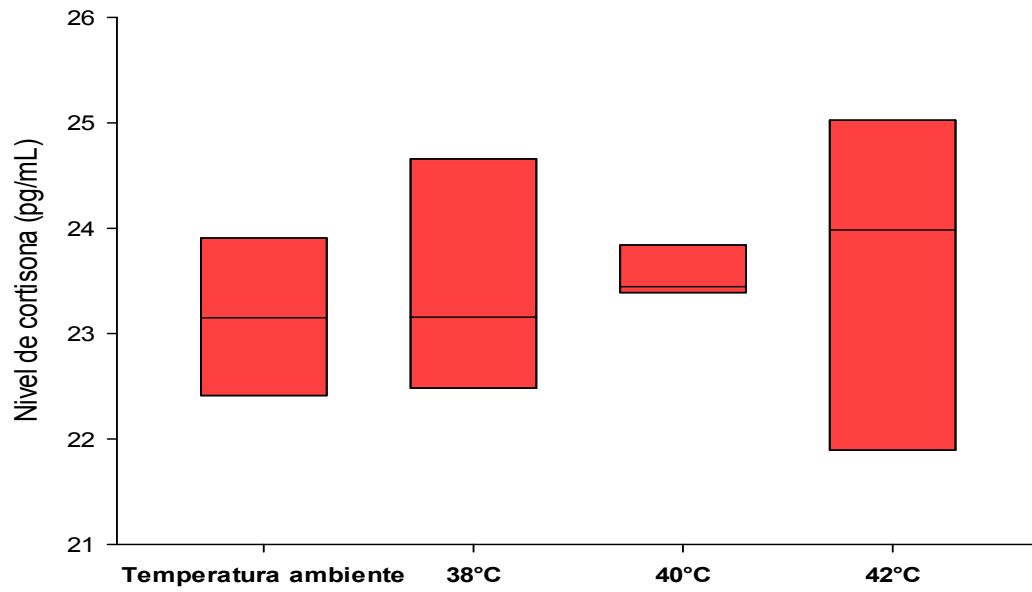


Fig.4. Concentración de cortisona en sangre de los ratones hembra sometidas a diversos tratamientos; n=8 Temperatura ambiente, 38°C, 40°C, 42°C, Media \pm EE ANOVA unifactorial ($p < 0.05$)

8. DISCUSIÓN

De acuerdo a los antecedentes, se considera que la hipertermia es un agente altamente tóxico, al no dejar que los sistemas de termorregulación del organismo retornen a valores normales (Argente, 2008), este estado es potencialmente mortal y no es tratable con antipiréticos debido a que no existe una termorregulación ni pirógenos mediadores (Melero, 2008).

Es por ello que se realizaron distintas pruebas para verificar si las temperaturas ambientales elevadas modificarían el comportamiento de los ratones hembra en etapa prepúber, o podrían generar un estado de ansiedad o depresión.

La primera prueba fue la de actividad motora en campo abierto, donde se encontró que en la distancia recorrida por minuto existió una tendencia a disminuir, ya que el animal explora exhaustivamente en el primer minuto, pero esto decrece conforme pasa el tiempo, esto se observó en todos los lotes analizados y no hubo diferencia entre ellos, con lo que se puede decir que las altas temperaturas no afectan la capacidad motora del animal.

La segunda prueba que se realizó fue la caja de 2 compartimentos prueba para determinar si los animales tratados presentan un estado de ansiedad, observamos que hubo una diferencia significativa del lote tratado a 42°C con respecto a los demás lotes, por lo que podemos decir que el ratón permanecía más tiempo en el campo oscuro y no le interesaba salir de esa área, se puede confirmar esta aseveración en la figura 2D ya que existe una diferencia entre todos los lotes estudiados, por lo que se puede decir que está presente una alteración conductual, en la prueba observamos que los animales preferían estar más tiempo en el campo oscuro; el comportamiento normal de una animal ante esta situación es permanecer más tiempo en el lado oscuro, por lo que observamos que permanecen más de la mitad del tiempo en el campo oscuro, comparado con la actividad normal de un ratón. Es importante notar que los ratones tratados con temperaturas mayores a la ambiental presentan un tiempo de permanencia en el campo iluminado cada vez menor, hasta observar que el daño generado por la

temperatura de 42°C hay un decremento del tiempo de permanencia en el campo iluminado lo que sugiere que esos ratones presentaron un estado de ansiedad, tal que el ratón prefiere quedarse oculto y no seguir explorando en la caja.

Para el tiempo de inmovilidad del ratón solo era observable cuando se encontraba en el campo iluminado, y es destacable que aun cuando los ratones pasaban al lado iluminado su movilidad fue menor siguiendo una relación con la intensidad de la temperatura y la inmovilidad, esto mismo sucedió con el número de levantamientos que presentaron los animales lo que se puede decir que los ratones posiblemente generaron un estado de ansiedad.

Otra prueba que se realizó fue la de nado forzado y es para observar si el ratón pudo haber generado un estado de depresión, por lo que la variable medida fue el tiempo de inmovilidad que tiene el ratón en esta condición, ya que se obliga al ratón a nadar, lo que nos dice que y de acuerdo al análisis estadístico el lote tratado con 42°C presentaron un mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los demás lotes (testigo, 38°C y 40°C), por lo que podemos decir que los ratones tratados con esta temperatura además de haber generado ansiedad también generaron un estado de depresión, y esto es explicable ya que el calor se considera un agente que genera estrés, y al estarlo induciendo en un periodo prolongado y frecuente hace que el animal empiece a generar cierta ansiedad, clínicamente se considera que esto puede dar origen a la depresión, y el animal en esta prueba al permanecer más tiempo inmóvil en el agua quiere decir que el animal ya no tiene el instinto de supervivencia, por lo que deja de intentar salir del agua o nadar al haber generado este estado depresivo.

Para determinar la participación del sistema de alerta endógeno formado por el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales, se determinaron los niveles de cortisona en sangre, siendo este el principal glucocorticoide en los roedores, de acuerdo a los resultados, no se encontró diferencia significativa en esta variable, esto se debió principalmente a que se encontró una gran dispersión en los datos. Esto se puede deber a que se hizo la determinación de hormona hasta terminar las pruebas conductuales, tal vez si se hubieran realizado antes la dispersión

hubiera sido menor, y se observaría un incremento en la concentración de cortisona dependiente de la temperatura ambiental, o también, es posible que con el tiempo de tratamiento de 15 días el sistema estaba incrementándose continuamente y en un tiempo mayor de exposición se hubiera notado la diferencia

9. CONCLUSIONES

- La temperatura de 38, 40 y 42°C disminuyó el tiempo de permanencia en el lado iluminado de una manera dependiente de la temperatura de exposición.
- La temperatura de 42°C generó en los ratones hembra en etapa prepúber un estado de ansiedad y depresión.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Argente H., (2008). *Semiología médica: Fisiopatología, semiotecnia y propeútica*. Ed. Médica Panamericana. pp. 75.
2. Babita B., Purushottam GK., Jayashree VD y Pramod M. (2013). Testicular oxidative stress protective effects of *Abharaka Bhasma* in male wistar rats after heat exposure. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (2):474-477.
3. Brenes G. (1997). Efecto de la diabetes e hipertermia sobre la teratogenicidad en ratón CD-1. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México.
4. Buelke- Sam, J. y Kimmel, (1979). C.A.: Development and estandarization of screening methods for behavioral teratology. *Teratology*, 20: 17-30.
5. Butcher, R.E. (1985). An Historial Perspective on Behavioral Teratology. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:537-540.
6. Carrasco. M.S., De Paz J.A., (2000). *Tratado de emergencias médicas*. Ed. Arán. Pp. 1444.

7. Córdova J.A., (2009). Procedimientos endoscópicos en gastroenterología. 2da Edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 40.
8. Duque-Ramírez, L.G., Rubio-Vanegas, H. (2006). Semiología médica integral. 1ª Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
9. Erkankli G., Isler C., Kemerdere R., Ulu M., Umay C., Ozkaymackci, Aker G., Ercan F., Ozkara C., Onat F. Y Uzan M. (2011). Hippocampal neuronal damage in rats exposed to double hit: irradiation and hyperthermia. *Turkish Neurosurgery*. 21(4): 454-460.
10. Finnell, R.H., Moon. S.P., Abbott, L.C., Golden, JA and Chernoff. G.F. (1986). Strain differences in heat-induced neural tube defects in mice. *Teratology* 33: 247-252.
11. Froeze, G. (1991). The sensivity of thoracolumbar spinal cord of the mouse to hyperthermia. *Radiation Research* 125:173-180.
12. Ganong, W. (2001). Tratado de Fisiología Médica, 10ª ed. Ed. El Manual Moderno. México D.F. 115-117.
13. Ganong, W. F. (1990). Fisiología Médica, 12ª ed. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
14. Germano I.M., Sperber E.F. (1993). The effects of neuronal migration disorders on seizure susceptibility. *Epilepsia* 35:137.
15. Graham JM., Matthew JE. y Marshal JE. (1998). Teratogen Update: Gestational Effects of Maternal Hyperthermia Due to Febrile Illnesses and Resultant Patterns of Defects in Humans. *Teratology*, 58:209-221.
16. Guyton, A.C. (1985). Fisiología Humana. Ed. Interamericana, 5ª Edición, México.

17. Hill R.W., (2007). Fisiología animal comparada: Un enfoque ambiental. Ed. Reverte. pp. 80.
18. Junquera H. y De la Cruz F., (1998). Regulación de la Temperatura. En: Fisiología. Células, órganos y Sistemas, 1ª ed. Ed. Fondo de cultura económica. México D.F., Pág. 135-145.
19. Kellinghaus C., Kunieda T., Ying Z., Pan A., Lüders H.O., Najm I.M., (2004). Severity of histopathologic abnormalities and in vivo epileptogenicity in the *in útero* radiation model of rats is dose dependent. *Epilepsia* 45:583–591.
20. Kondo S., Najm I., Kunieda T., Perryman S., Yacobova K., Lüders H.O. (2001): Electroencephalographic characterization of an adult rat model of radiation-induced cortical dysplasia. *Epilepsia* 42:1221-1227.
21. Kumar, Vinay. Abbas, Abul K. Fausto, Nelson. Mitchell, Richard N. (2008). Robbins Patología humana/ 8va Edición. Editorial Elsevier. Barcelona.
22. Lagos Grisales, G.; Cediell Collazos, V.; Villegas Rojas, S. 2012). Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en paciente VIH positivos y donantes voluntarios de sangre, Pereira, Colombia, 2007-2009. *Revista Médica de Risalda* 18,1, pp. 54-64.
23. Le Francois G., (2001). El ciclo de la vida. 6ta Edición. Ed. Thompson. pp.95-96.
24. Le Vay D. (2004). Anatomía y Fisiología Humana. 2da Edición. Ed. Paidotribo. pp. 288-289.
25. Lee J., Mirkes E., Jin D. y Kyu W. (2009). Effects of Maternal Hyperthermia on Myogenesis- Related Factors in Developing Upper Limb. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 85:184-192.
26. Lemaire, V., Koelh M., Le Moal, M y Abrous DN. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus.
27. Lerner, J. Urbina M, (2008). [compilación de] Fertilidad y reproducción asistida / 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas.

28. Melero, M. J. (2008). Fiebre. En: *Semiología Médica. Fisiopatología, semiotecnia y propeútica. Enseñanza basada en el paciente*. Argente, H. A., Álvarez, M. E. Primera Edición. Editorial. Médica Panamericana. Argentina. Pp. 72-77.
29. Melo V., Cuamatzi O., (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2da Edición. Ed. Reverte. pp. 98-99.
30. Menéndez-Patterson A., Florez-Lozano JA., Fernandez-Fernandez S. y Marin B. (1980). Stres "in utero" y conducta sexual. *Anuario de psicología* Núm. 22 Depto. Interfacultativo de Fisiología (Medicina y Ciencias) Universidad de Oviedo.
31. Merello M. (1999). Anatomía de los ganglios basales. En: *Archivos de Neurología, Neurocirugía y Neuropsiquiatría*. Instituto de Investigaciones Neurológicas Raúl Carrea "FLENI" Buenos Aires. Pág: 11-18.
32. Mirkes P.E. Y Fantel, A.G. (1990). Maternal Influences on Development En: *Postinplantation Mammalian Embryos*, Copp, A.J. y Cockroft, D.L (Ed.), IRL Press, Oxford pp 235-248.
33. Moore K.L. y Persaud, T.V.M. (1995). *Embriología Clínica* Ed. Interamericana, 5ª Edición, México.
34. Palmiini A, Andermann F, Aicardi J, Dulac O, Chaves F, Ponsot G, Pinard JM, Goutieres F, Livingston J, Tampieri D, Andermann E, Robitaille Y. (1991). Diffuse cortical dysplasia, or the 'double cortex' syndrome: the clinical and epileptic spectrum in 10 patients. *Neurology* 41:1656–1662.
35. Piñeiro D., (2005). *Eco cardiografía: Para la toma de decisiones clínicas*. Ed. Médica Panamericana. pp. 39.
36. Robinson SR y Michele RB (2005). Prenatal Behavior. En: *The behavior of the laboratory rat*. Ian Q. Whisman. Cap. 24. pp. 257-265. Oxford University Press.
37. Rodier, P.M., Reynolds, S.S. y Roberts, W.N. (1979): Behavioral Consequences of interference with CNS Development in the early fetal period. *Teratology*, 19: 327-336.

- 38.Sadava D. (2009). Vida. La ciencia de la Biología. 8va Edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 48.
- 39.Seyhan N. (2000). Ege Química orgánica: Estructura y reactividad. Tomo dos. Editorial Reverté Barcelona.
- 40.Shepard, T.H. (1989). Catalog of Teratogenic Agents. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 41.Sloviter R.S., Pedley T.A. (1998). Subtle hippocampal malformation: importance in febrile seizures and development of epilepsy (Editorial;comment). Neurology 50:846-849.
- 42.Sumner SCJ, Fennell TR. (1994). Review of the metabolic fate of styrene. Crit Rev Toxicol 25 (Suppl.), S11–S33.
- 43.Tortelero, I.; Arata-Bellabarba, G.; Osuna J. A.; Gómez R.; Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo.3, 3 pp.12-19.
- 44.Tórtora G., Funke B., Case C., (2007). Inducción a la microbiología. 9na Edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 190.
- 45.Vistrain, P. (1996). Efecto de la hipertermia materna en rata sobre el desarrollo físico y funcional de la progenie. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México.
- 46.Webster, W.S., Germain, M. y Edwards, M.J. (1985). The induction of microphthalmia, encephalocele and other head defects following hyperthermia during gastrulation process in the rat. Teratology, 31:73-82.
- 47.Weiss, B y Cory- Slechta, D.A. (1994): Assessment of Behavioral Toxicity. En: Principles and methods of Toxicology, Hayes, A.W. (Ed), Raven Press, New York. pp 1091.

48. White MG, Luca LE, Nonner D, Saleh O, Hu B, Barrett EF, Barrett JN. (2007). Cellular mechanisms of neuronal damage from hyperthermia *Progress in Brain Research* 162:347-71.
49. Worbe Y, Yelnik J y LeHéricy S. (2010). Basal Ganglia. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Koob GF, Le Moal M. Thompson RF. El Sevier.
50. Zarrabeitia, F.M., Banasco, A.J., Olivares, I.A., Jaquinet, A.M. y Guardado, F.E. (1991). *Temas de embriología animal*. Ed. Pueblo y educación, La Habana.