



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Inducción de crisis convulsivas en un  
modelo murino genéticamente  
condicionado, mediante el método kindling  
amigdalino eléctrico**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Médica veterinaria zootecnista**

**P R E S E N T A**

Karen de Lourdes Olvera Pérez

**DIRECTORES DE TESIS**

Dr. Juan Carlos Martínez Lazcano

M. en C. Jaime Alonso Navarro  
Hernández



Ciudad universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Quisiera dedicar este trabajo a todas las personas que ayudaron a hacer posible la realización del mismo, por su gran apoyo y tiempo de dedicación, sin ustedes nunca habría sido posible llegar hasta este punto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todo el equipo de profesionales y técnicos del Departamento de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” a cargo del Dr. Carlos Herlindo Paz Tres.

Al Dr. José Bargas Díaz del Departamento de Neurociencia cognitiva del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, por haber proporcionado el material biológico que hizo posible la realización de este trabajo.

A mis tutores, por haber tenido la paciencia y disponibilidad de tiempo, a lo largo del proceso de mi titulación.

A mi honorable jurado: presidente MVZ Carlos Villagrán Vélez, vocal MVZ Miguel Ángel Martínez Castillo, secretario MVZ Eduardo Carlos Santoscoy Mejía, suplente MVZ Jaime Alonso Navarro Hernández y suplente MVZ Marisol Rivera Huerta, por su disponibilidad y aportaciones que ayudaron a enriquecer la investigación.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	28
REFERENCIAS	29
FIGURAS	38
CUADROS	45

## RESUMEN

OLVERA PÉREZ KAREN DE LOURDES. Inducción de crisis convulsivas en un modelo murino genéticamente condicionado, mediante el método kindling amigdalino eléctrico (bajo la dirección de: Dr. Juan Carlos Martínez Lazcano y M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández).

La epilepsia es un desorden neurológico crónico, caracterizado por presentar convulsiones recurrentes y espontáneas. Para estudiar los mecanismos y posibles tratamientos de la epilepsia se utilizan modelos animales, ya sea por estimulación química con agentes farmacológicos, o bien por estimulación eléctrica directa sobre una región específica o por electroshock, así como modelos genéticos epileptogénicos espontáneos y transgénicos, un ejemplo de estos es el ratón condicionado PV-Cre, el cual es una herramienta útil para la identificación de células positivas a la parvalbúmina. El objetivo de este trabajo fue obtener ratones PV-Cre con crisis convulsivas en estado 5 de la escala Racine, antes de los 65 días de edad, por medio del método kindling eléctrico amigdalino. Para este estudio se utilizaron 2 grupos de 4 ratones machos C57BL/6 y PV-Cre de 27 días de edad, cada uno. Para aplicar el método kindling, cada animal fue anestesiado con isoflurano y se le implantó quirúrgicamente, con la ayuda de un instrumento estereotáxico, un electrodo intracraneal en la región de la amígdala cerebral izquierda. El modelo fue ensayado 7 días posteriores a la cirugía, aplicando en los electrodos implantados un estímulo eléctrico de 5V, 60Hz y 1 ms de duración cada 24 horas por medio de un estimulador GRASS 788. Las reacciones de cada animal estimulado fueron calificadas con base en la escala Racine, dando como resultado estados conductuales similares entre ambas cepas de ratones y completando el modelo antes de los 65 días de edad.

## Glosario de términos

**Adeno-asociado:** vector adenoviral de primera generación, que permite la introducción de material genético al interior de una célula diana con el objeto de producir en ella cambios funcionales, terapéuticos o de señalización (Narvaiza *et al.*, 2003).

**Ataxia:** falta de coordinación muscular; falta de precisión (Tortora *et al.*, 2006).

**Crisis convulsivas clónicas:** sacudida repetitiva que involucra el mismo grupo de músculos, es prolongada y dura de 2 a 3 ciclos por segundo (Fisher *et al.*, 2017).

**Crisis convulsivas de ausencia:** son un tipo de convulsión generalizada, caracterizada por episodios de alteración en el estado de la conciencia, que duran de unos segundos hasta medio minuto, se identifican por el inicio repentino de la interrupción de actividades en curso, en la cual el individuo no responde a los estímulos externos (Fisher *et al.*, 2017).

**Crisis convulsivas focales:** son aquellas que inician con la activación de una parte de un hemisferio cerebral (Fisher *et al.*, 2017).

**Crisis convulsivas generalizadas:** tienen un comienzo simétrico bilateral, es decir, involucran a ambos hemisferios cerebrales y normalmente van asociadas a pérdida de consciencia (Fisher *et al.*, 2017).

**Crisis convulsivas tónicas:** se refiere a un sostenido incremento en la contracción de un músculo que puede durar de segundos a minutos (Fisher *et al.*, 2017).

**Crisis convulsivas tónico-clónicas:** es una secuencia de movimientos que consiste en una fase tónica seguida de una fase clónica o viceversa (Fisher *et al.*, 2017).

**Exón:** región de un gen que codifica para segmentos de proteínas (Tortora *et al.*, 2006).

**Gen reportero:** Secuencia de ADN codificante que produce una proteína cuya principal característica es servir como etiqueta o señalización en bacterias, cultivos celulares, tejidos y en organismos completos animales o vegetales. (Alberts *et al.*, 1994).

**Kindling eléctrico amigdalino:** Modelo experimental que produce crisis convulsivas focales, secundariamente generalizadas, a partir de estimulaciones eléctricas subumbrales, las cuales debido a la periodicidad se propagan hasta obtener convulsiones tónico-clónico-generalizadas (Pitkanen *et al.*, 2017).

**Knock in:** son animales a los que por manipulación genética *in ovo* se les integra algún gen nuevo en su cromosoma (Hedrich *et al.*, 2004).

**Knock out:** son animales a los que se les ha eliminado la función de un gen determinado (Hedrich *et al.*, 2004).

**Parvalbúmina (PV):** Proteína citosólica ligadora de calcio, hidrosoluble y termoestable (Vig *et al.*, 2000) localizada principalmente en interneuronas, en células de canasta y de Purkinje del cerebro de los mamíferos, las cuales contienen ácido gama-aminobutírico (GABA) (Heizmann, 1998; Vig *et al.*, 2000).

**Patch clamp (fijación de membranas):** Técnica electrofisiológica empleada para estudiar corrientes iónicas individuales o múltiples en canales celulares (Radesca 2009).

**Ratón condicionado PV-Cre:** Ratón transgénico *knock-in* que contiene la secuencia promotora del gen PV que dirige la expresión de la recombinasa Cre en células que expresan PV (PV+). Estos ratones son útiles para estudiar la diferenciación neuronal (Jackson, 2017).

**Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA):** son receptores celulares pertenecientes a un subgrupo denominado ionotrópicos, que son un tipo de receptores de glutamato presente en las sinapsis neuronales, los cuales participan en la regulación del potencial excitatorio postsináptico. La activación de estos receptores induce la apertura del canal iónico central que da origen a una despolarización rápida y su consiguiente excitación neuronal (Delgado *et al.*, 2014).

**Sistema de recombinación Cre/LoxP:** Tecnología de recombinasa específica de sitio usada para suprimir, insertar, translocar e invertir sitios en el ADN celular. La secuencia genética PLox/Cre/LoxP capacita la inducción condicional o la supresión de determinada expresión genética en un periodo restringido de la vida de un organismo (ratón) o de un tipo particular de célula o tejido. Esta secuencia puede ser seccionada y posteriormente completada. En ratones transgénicos, la expresión del gen Cre está dirigida por regiones reguladoras o promotores específicos que restringen la expresión a sitios de interés (Lomelí *et al.*, 2007). Su presencia en ratones knock-in permite identificar células PV+.



## INTRODUCCIÓN

### Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad tan antigua como la humanidad misma (Ramos *et al.*, 2012). El término que la define fue acuñado en el año de 1870 por Hughlings Jackson y proviene del griego “*epilambaneim*” que significa “tomar por sorpresa” (Martínez, 2009; AGE, 2017). El interés por ella, ya sea para revelar sus causas u obtener sus mecanismos de control data probablemente de épocas prehistóricas, hecho que se deduce por el hallazgo de diversos cráneos trepanados que cuentan con miles de años de antigüedad, y se han encontrado tanto en África como en Europa y América, lo que indica que el hombre ha tratado de intervenir en las funciones cerebrales desde hace mucho tiempo (Brailowsky, 1999).

La espectacularidad de sus manifestaciones clínicas, que en algunos casos llegan a ser muy violentas, desencadenó la creencia de que se debía a causas sobrenaturales, por este motivo, fue considerada como castigo divino o posesión demoniaca durante varios siglos (Ramos *et al.*, 2012).

La referencia más antigua de la epilepsia está contenida en el código de Hammurabi (2,080 a.C.), que prohibía a las personas con esta enfermedad casarse, testificar ante una corte e incluso ser vendidos como esclavos (Espinoza, 2010).

Sin embargo, los griegos fueron los primeros en describirla como una enfermedad física e Hipócrates, padre de la Medicina moderna (460 a. C.), explicaba que la epilepsia no tenía que ver con factores místicos ni divinos, si no que posee un origen natural y que su causa está localizada en el cerebro, además agregó que debía ser tratada con dietas y medicamentos específicos (AGE, 2017).

A finales del siglo XIX se inició la era moderna de la neurología occidental, que fue marcada por la participación de diversos colaboradores, tales como: Jean – Marie Charcot en Francia, Theodor Meynert en Viena, Hughlings Jackson y William Gowers en Londres, quienes dieron un impulso definitivo no solo al estudio científico de las epilepsias, sino también al de la fisiología cerebral (Espinoza, 2010).

En la actualidad, conocemos que la epilepsia es un desorden neurológico crónico, caracterizado por presentar convulsiones recurrentes y espontáneas, las cuales tienen

consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas adversas (Blume *et al.*, 2001; García *et al.*, 2010). Las convulsiones son resultado de la excesiva descarga eléctrica en un grupo de células cerebrales (WHO, 2018). Una teoría sobre el origen de la epilepsia postula que su principal mecanismo consiste en el desequilibrio funcional entre la transmisión inhibitoria (GABAérgica) y la transmisión excitatoria (glutamatérgica); este desequilibrio inicia cierta actividad electroquímica anormal en algunas neuronas cerebrales, produciéndose un foco epiléptico (Hernán *et al.*, 2007; Brailowky *et al.*, 1989). La función de la corteza cerebral está determinada principalmente por el balance entre la actividad generada por neuronas excitatorias e inhibitorias (aproximadamente 70% de las neuronas corticales glutamatérgicas y aproximadamente 20–30% del total de neuronas neocorticales e interneuronas inhibitorias gamma-aminobutíricas: GABAérgicas). Las interneuronas GABAérgicas de todas las áreas neocorticales expresan tres clases de proteínas ligadoras de calcio: parvalbúmina (PV), calbindina (CB), y calretinina (CR). Las neuronas GABAérgicas del sistema inhibitorio cerebral se caracterizan por su alta tasa de producción de potenciales de acción rápidos (*fast-spiking*) y por la expresión de parvalbúmina (PV), la cual mantiene la estabilidad de la red neuronal inhibitoria y cuya alteración se propone como uno de los principales mecanismos que inducen estados epilépticos. Las células que expresan la parvalbúmina (PV+) son interneuronas inhibitorias, no piramidales de la corteza cerebral frontal. La deficiencia de PV deteriora las propiedades de la red neuronal, provocando aumento de la susceptibilidad a las convulsiones epilépticas debido a que la actividad de las interneuronas depende críticamente de la acción de la PV; sustancias como la 4-aminopiridina y pentilenetetrazol (PTZ) inducen convulsiones por reducir significativamente el contenido de PV en el núcleo mamilar medial del cerebro de la rata (Kawaguchi *et al.*, 2002; Schwaller *et al.*, 2004).

La epilepsia se presenta en todas las especies de mamíferos y probablemente es más frecuente en aquellas cuyo cerebro es filogenéticamente más complejo (Reynolds *et al.*, 2005). En humanos, la epilepsia se considera la enfermedad neurológica más frecuente en el mundo (Maldonado, 2008), está uniformemente distribuida, no tiene límites raciales o geográficos, ocurre en hombres y mujeres, a todas las edades, aunque especialmente en la infancia y la adolescencia, y crecientemente en la tercera edad (WHO, 2005). En

relación con el sexo, también se observa que la prevalencia de la epilepsia generalmente es más alta en el hombre, y esto se ha atribuido en algunos estudios a que éste presenta un mayor riesgo de traumatismo en la cabeza. Sin embargo, esta apreciación no se ha corroborado del todo (Velasco *et al.*, 2005). La prevalencia mundial es aproximadamente de 0.71% y en México oscila entre el 1% y 3% de la población (OMS, 2017).

En la clínica médica veterinaria, esta enfermedad representa de 1% a 5% de los casos en perros y de entre 2% y 3% del total de pacientes gatos, según algunos informes de hospitales de referencia provenientes de Estados Unidos de América y España (Hernández, 2007; De Lahunta, 2009; De Risio *et al.*, 2014). En México, no existe estadística alguna que sirva como punto de partida; sin embargo, en el Hospital Veterinario de Especialidades de la UNAM se estima que los pacientes caninos que han presentado cuando menos un evento convulsivo reciente, representa aproximadamente 28% como motivo de consulta principal por el Área de Neurología. Mientras que la epilepsia de tipo idiopática está estimada en un 60% de los casos recibidos (Flores *et al.*, 2018).

Por otro lado, es importante destacar que las epilepsias son un grupo muy extenso y heterogéneo de variantes o tipos, sin mencionar las más de 200 enfermedades genéticas en las que la epilepsia es una parte más o menos importante del fenotipo. A pesar de esto, en 1981 se aceptó la primera propuesta de clasificación de los tipos de crisis epilépticas elaborada por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), esta se caracterizó por estar basada en la semiología de las crisis y en las características del electroencefalograma (EEG) durante la crisis (EEG crítico) y durante el periodo entre crisis (EEG intercrítico), dicha clasificación se ha ido actualizando conforme a los nuevos avances científicos (Gorostidi, 2006).

Además, existen una serie de fenómenos o etapas que se identifican en el paciente y que conviene definir:

- *Periodo prodrómico*: fenómeno comportamental que precede al inicio de una crisis; puede durar de segundos a días. El animal puede esconderse, seguir al propietario, o parecer inquieto o asustado.

- *Aura*: sensación subjetiva que señala el inicio de la crisis; difícil de reconocer en medicina veterinaria a menos que el animal vomite, salive, u orine o defecue de forma inadecuada justo antes del inicio de la crisis.
- *Convulsión*: se define como un cambio electrográfico o de comportamiento que resulta de una descarga súbita y excesiva de las neuronas y que suele durar minutos.
- *Periodo post-ictal*: comportamiento atípico que prosigue inmediatamente tras la crisis; el animal puede estar inquieto, delirante, letárgico, confundido, ciego, sediento, hambriento, orinar o defecar de forma inadecuada; puede perdurar de minutos a días.

Cabe mencionar, que esta enfermedad tiene muchas causas conocidas, como el daño cerebral en el nacimiento, los trastornos metabólicos (hipoglucemia, hipocalcemia, uremia, hipoxia), infecciones (encefalitis o meningitis), intoxicación por sustancias como: alcohol, tranquilizantes o alucinógenos; alteraciones vasculares (hemorragia, hipotensión), lesiones craneales, tumores y abscesos cerebrales; otras causas son los estados febriles graves, aunque la mayor parte de las crisis convulsivas no tienen una causa demostrable cuando esto sucede, se define a la enfermedad como idiopática y al paciente como epiléptico (Tortora *et al.*, 2006; Tatum *et al.*, 2009).

Existen además, gran cantidad de factores externos e internos que pueden generar el desencadenamiento de convulsiones espontáneas. En pacientes humanos que experimentan privación del sueño, menstruación, estrés emocional, ruido excesivo, cambios repentinos del estilo de vida o eventos inusuales, se ha reconocido la presentación de crisis epilépticas, tal es el caso de los perros de raza Cobrador de Labrador. Otros estudios han demostrado que algunos estados emocionales donde se presentan conductas de ansiedad, hiperactividad o estrés, son capaces de provocar crisis convulsivas en 22% de los animales.

Por otro lado, las convulsiones reflejas pueden darse debido a diversas sensaciones o percepciones en específico. Entre los ejemplos más destacados se encuentran, el parpadeo al mirar luz (generalmente la de un televisor o computadora) estímulos visuales, inmersión en agua caliente, actividades como leer o comer y algunos sonidos, esto último

es lo que más se ha conocido en perros; también se han registrado estímulos táctiles y propioceptivos que generan convulsiones (De Risio *et al.*, 2014).

La epilepsia idiopática se caracteriza por presentar episodios repetidos de convulsiones para los que no se conoce ningún hallazgo clínico o patológico que se considere como causa de las crisis convulsivas, por lo que representa un diagnóstico basado en la exclusión de todas las posibles causas conocidas de convulsiones (Gorostidi, 2006).

Los perros con epilepsia idiopática tienen un umbral más bajo, como resultado de una alteración genética que puede ser heredada. Según análisis de pedigrí y diversos estudios de mejoramiento se ha determinado una epilepsia idiopática hereditaria en una gran cantidad de razas que incluyen las siguientes: Pastor Alemán, Retriever dorado, Keehound, Beagle, Dachshund, Pastor Belga tervuren, Labrador, Cocker, Setter irlandés, Schnawzer, Poodle, San Bernardo, Husky siberiano, Collie, Fox Terrier pelo de alambre y Bernés de la montaña (De Risio *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2018).

En el caso de los gatos, la predisposición de raza la tienen aquellos que son de pelo corto, como el Abisinio, Bengalí y Azul ruso. Al parecer en esta especie no existe ninguna predisposición relacionada con el sexo, al contrario de los perros, en los cuales las hembras tienen una mayor probabilidad de padecer convulsiones (De Risio *et al.*, 2014).

Es posible declarar, que para diagnosticar correctamente a un paciente con epilepsia se ha de tener en cuenta el tipo de crisis, la edad de aparición, la etiología, la severidad y recurrencia, el horario de aparición, los factores desencadenantes, los patrones de EEG (intercríticos y críticos, en vigilia y en sueño) y los resultados de neuroimagen (Imirizaldu, 2003; Salas-Puig *et al.*, 2007).

El diagnóstico diferencial debe realizarse principalmente con otros trastornos neurológicos o episodios paroxísticos como son los espasmos del sollozo en niños, síncope vasovagales, las crisis de migraña, la amnesia global transitoria, fenómenos psicógenos, la narcolepsia-cataplejía y el vértigo posicional paroxístico benigno, entre otros (Salas-Puig *et al.*, 2007).

Para el manejo médico de estos pacientes, se cuenta con fármacos que ayudan a suprimir los estados convulsivos; el esquema farmacológico contra la epilepsia en humanos, involucra principalmente más de 20 fármacos como la fenitoína, la carbamazepina y el

valproato disódico (Tortora *et al.*, 2006; Sosa, 2008), estos se denominan fármacos antiepilépticos (FAE), los cuales no presentan eficacia en el 30% al 40% de los casos de epilepsia en pacientes humanos (Brodie *et al.*, 1997; Kwan *et al.*, 2000) y de 25% a 30% de los pacientes en veterinaria (De Risio *et al.*, 2014).

Pero no solamente los fármacos resultan un tratamiento viable para los epilépticos, ya que existen alternativas terapéuticas que han demostrado ser de utilidad en diversos casos, tales como la estimulación vagal, la estimulación holocraneal, la dieta cetogénica, la cirugía, entre otros (Ekmekci *et al.*, 2017; Frausche *et al.*, 2017).

Por otra parte, el pronóstico de cada paciente dependerá de los hallazgos y el criterio de los médicos especialistas, así como de las respuestas a los tratamientos por parte del paciente, ya sean fármacos o alternativas (De Risio *et al.*, 2014).

## **Modelos de epilepsia**

Antes de indagar en los modelos de estudio de este padecimiento, es importante definir el concepto de modelo animal; el cual se refiere a una especie animal que se estudia de forma exhaustiva en el laboratorio para comprender un fenómeno biológico concreto con el objetivo de que los hallazgos en esta especie sirvan para explicar cómo funciona este mismo proceso en otros seres vivos.

Dentro de los modelos animales, el ratón (*mus musculus*) es el mamífero más conocido, caracterizado genéticamente y por lo tanto el mayormente utilizado. Para muchos investigadores constituye un modelo idóneo, debido a que se conoce perfectamente su genoma, por su tamaño, es fácilmente manejable, es de fácil y económico mantenimiento y además tiene un corto período gestacional, camadas grandes y alcanza la madurez sexual muy pronto, por lo cual se tienen en poco tiempo varias generaciones. Es una especie que cuenta con muchas cepas tanto consanguíneas como no consanguíneas de forma tal, que existen gran cantidad de modelos a partir de esta disponibilidad, además de contar con la ventaja de poder realizar manipulación genética, brindando alternativas para distintos estudios. La rata (*rattus norvegicus*), por su parte, es el segundo mamífero más utilizado para fines de investigación (Navarro *et al.*, 2012).

Para estudiar los mecanismos y posibles tratamientos en la epilepsia, se utilizan modelos animales de estimulación química con agentes farmacológicos que producen sobreexcitación o bloqueo de la inhibición neuronal, o por estimulación eléctrica directa sobre una región específica o bien por electroshock, así como modelos genéticos epileptogénicos espontáneos y transgénicos (García *et al.*, 2010).

En la actualidad, el empleo de modelos experimentales animales permite estudiar mejor la epilepsia y diseñar esquemas más racionales de tratamiento del paciente con este padecimiento, para ofrecerle una mejor calidad de vida (Velasco *et al.*, 2005). Además, se han utilizado numerosas especies a lo largo de los años, las más conocidas son: mosca de la fruta, gusano, pez cebra, rata, ratón, jerbo, cuyo, conejo, gato, perro y hasta primates no humanos (Cody *et al.*, 2009). Sin embargo, depende en gran medida de las metas impuestas por los investigadores, para lograr estructurar un protocolo correctamente y de esta forma, poder elegir qué modelo, ya sea *in vivo* o *in vitro*, le conviene más para llegar a la resolución del problema en cuestión.

A pesar de los numerosos avances en el campo de la epilepsia en los últimos años, todavía quedan grandes incógnitas por aclarar. Desde este punto de vista, los modelos experimentales en animales pueden representar una herramienta muy útil tanto para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos de la epilepsia como para identificar tratamientos. Cabe destacar, que son necesarias nuevas investigaciones en epilepsia y la utilización de modelos experimentales válidos, no sólo por la alta prevalencia e incidencia de esta enfermedad, sino también por la carencia de tratamientos eficaces y por las devastadoras consecuencias que puede llegar a tener en el paciente (García *et al.*, 2010).

## **Modelos químicos**

Estos modelos de epilepsia se caracterizan por producir convulsiones continuas y recurrentes, generadas por la administración sistémica o local de agentes convulsivantes (Sampieri *et al.*, 2011; Kandratavicius *et al.*, 2014), destacándose el inducido por la administración de ácido kaínico, agonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, así como el modelo de *status epilepticus* (SE) inducido por pilocarpina, agente

parasimpáticomimético, agonista no selectivo de receptores muscarínicos (Curia *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2010).

Es importante considerar que, la susceptibilidad convulsiva aumentada de manera permanente inducida por la estimulación farmacológica repetida en ocasiones produce un efecto denominado kindling químico y puede lograrse mediante una variedad de agentes con diversos mecanismos de acción, como: carbacol, acetilcolina, bicuculina, lidocaína, cocaína y PTZ (Javela *et al.*, 2011).

Se tiene conocimiento de que, los modelos químicos poseen la ventaja de ser más fáciles de regular que otros, esto es respecto a la duración del estado antes de la convulsión, severidad de la crisis, duración de convulsión, tipo de ataque y duración del período de recuperación. Las desventajas son que, en muchos casos sus resultados son poco extrapolables con los pacientes humanos, además, de ser poco útiles para estudiar nuevas alternativas farmacológicas contra la epilepsia, puesto que, los químicos adicionados para obtener los modelos, tienden a provocar interferencia con los fármacos a probar. Además, los fármacos, toxinas o químicos aplicados, tienden a mostrar respuestas variadas entre cepas o especies (Seta *et al.*, 1992).

## **Modelos eléctricos**

Los modelos animales de convulsiones inducidas por estimulación eléctrica, tienen la ventaja de replicar características epileptogénicas similares a lo que ocurre en pacientes humanos (Kandratavicius *et al.*, 2014), como el modelo de convulsiones producidas por la aplicación de corriente eléctrica elevada, que genera descargas de electroshock. En este modelo la estimulación eléctrica del cerebro se produce por electrodos colocados en la córnea o en las orejas, lo cual induce convulsiones motoras cuya magnitud depende de la intensidad de la estimulación (Rubio *et al.*, 2010). Otros ejemplos de este tipo de modelos, son aquellos de estimulación eléctrica local y el de estimulación de 6 Hz (Alonso *et al.*, 2004; Pitkanen *et al.*, 2017).

En el modelo *kindling* (“encendido”) eléctrico, la estimulación se aplica por electrodos implantados en regiones como amígdala cerebral, corteza e hipocampo. El modelo fue



propuesto y desarrollado por Graham Goddard en 1969, quien al estudiar el efecto de la estimulación eléctrica repetitiva sobre el aprendizaje, observó que se generaba progresivamente una crisis que eventualmente desembocaba en convulsiones generalizadas (Delgado *et al.*, 2014; Hendelman, 2016; Sampieri *et al.*, 2011). Es importante considerar, que kindling ha sido ampliamente estudiado, como el modelo mayormente utilizado para el estudio de epilepsia del lóbulo temporal, (Pitkanen *et al.*, 2017) además de resultar ser particularmente el más eficaz para inducir farmacoresistencia (FR) a fármacos antiepilépticos (FAE) y útil para comparar epileptogenicidad entre especies. El kindling actúa por estimulación repetida eléctrica subumbral, pero suficiente para producir una posdescarga (PD: picos epilépticos con descargas repetitivas sincronizadas de la red neuronal), la cual no es, al inicio, lo suficientemente fuerte para provocar una convulsión; comienza en circuitos neurales limitados; produce convulsiones de duración creciente y cambios en el desempeño cerebral y se caracteriza por presentar crisis focales, secundariamente generalizadas a partir de un estímulo eléctrico subumbral en estructuras del sistema límbico (en especial amígdala, corteza o hipocampo), Aunque los umbrales para el kindling no han sido bien determinados, con la estimulación repetida a la misma intensidad, la respuesta crece y puede desarrollar una convulsión generalizada y convulsiones bilaterales con pérdida de la postura. La región del sistema límbico cerebral más susceptible a desarrollar kindling es la amígdala; este *kindling amigdalino* se utiliza en diversas especies de mamíferos. La interpretación de la eficacia de este método para inducir estados epilépticos, bajo la suposición de que tal respuesta difiere entre especies debido a la escala filogenética y al peso del cerebro es una "causa" ambigua y controvertida, ya que se ha realizado exitosamente en reptiles, anfibios, lagomorfos, roedores, felinos, caninos y primates, aunque existe tendencia a "desplegar" convulsiones más severas y complejas conforme el cerebro es más complejo (Buckmaster, 2017).

Durante el kindling, se pueden observar diferentes estados convulsivos. La graduación de la manifestación de epilepsia propuesta por Racine se basa en la estimulación eléctrica de la amígdala e incluye cinco estados o niveles. Los estados 1 y 2, están asociados primariamente con manifestaciones faciales y orales que incluyen cierre ocular ipsilateral

y parpadeo seguido de balanceo de la cabeza y escurrimiento salival. Eventualmente, en el estado 3, aparece clono de miembros anteriores. En el estado 4, se generalizan las convulsiones con clono más fuerte y enderezamiento corporal. Después, en el estado 5 (K-5), se observa una conducta de enderezamiento dramático y caída del animal, lo que se considera como crisis tónico clónica secundariamente generalizada (CTCG). En la mayoría de los estudios de kindling, se continúa estimulando al animal hasta el desarrollo de convulsiones en el K-5. En un examen cuidadoso, se observa que las convulsiones inducidas de la amígdala por el K-5, no son sólo clónicas, sino tónico-clónicas e involucran a los cuatro miembros. Así, se considera que un animal está plenamente en kindling si alcanza el desarrollo del K-5, efecto que puede perdurar por toda la vida del animal (Kumar *et al.*, 2016; Bertram, 2007). Una vez que un animal alcanza la primera convulsión K-5, la mayoría de las estimulaciones siguientes continúan evocando convulsiones de este tipo, siendo poco común el retroceso a estados anteriores (Chan *et al.*, 2016).

Desde la primera convulsión inducida por kindling se puede observar en ratas adultas, un aumento en los niveles de NMDA, así como pérdida neuronal progresiva debido a apoptosis. Por otro lado, se presenta proliferación celular, es decir, neurogénesis y gliosis. El área focal afectada, reorganiza sus proyecciones generando una reestructuración del cerebro y conforme las crisis inducidas van aumentando, se va haciendo evidente el daño tanto en el área primaria, como en regiones secundarias, tal es el caso del daño inducido en hipocampo, acompañado de pérdida de memoria. Cuando se llega a un número de entre 90 y 100 crisis inducidas en K-5, se hace notoria la pérdida de interneuronas y la aparición de crisis convulsivas espontáneas. Con el fin de resumir y entender mejor, en el **Esquema 1**, se señalan los cambios producidos a consecuencia del modelo kindling, además, se muestra la secuencia de alteraciones estructurales y funcionales inducidas por convulsiones repetidas en ratas adultas, comenzando con la crisis inicial, y progresando a la etapa de convulsiones espontáneas, observadas después de 90-100 convulsiones provocadas, que representan epilepsia completamente desarrollada (Pitkanen *et al.*, 2017; Sayin *et al.*, 2003),

A pesar de que, la inducción del modelo kindling, es practicada generalmente en animales adultos, las diferencias dependientes de la edad en la inducción, reflejan variantes de

complejos metabólicos y de desarrollo en circuitos neuronales (Grecksch *et al.*, 1997). Experimentos realizados en ratas de 26 meses de edad, demostraron retrasos significativos en la progresión de los estados convulsivos (más del 50% de aumento en el número de estimulaciones para alcanzar K-5), en comparación con las ratas de 3 meses de edad (de Toledo - Morrell *et al.*, 1984).

Como un enfoque alternativo para entender cambios moleculares e influencias genéticas en kindling, se han desarrollado, cepas de ratas, denominadas "rápidas" o "lentas", dependiendo su susceptibilidad a reproducir el modelo. Estos animales, han proporcionado evidencia de que los antecedentes genéticos ejercen una profunda influencia en la susceptibilidad, o resistencia, a kindling. Este enfoque ha involucrado la cría de ratas seleccionadas, poniendo como base, la velocidad del avance de los estados del kindling, a través de la estimulación de la amígdala en ratas Long-Evans con Wistar como cepa de fondo, o mediante estimulación de la trayectoria perforante en ratas Sprague-Dawley. En estos estudios, el fenotipo de "rápido" o "lento" se observó en descendientes de animales que nunca habían recibido estimulación, sugiriendo que en el trasfondo genético y en los mecanismos epigenéticos subyacen la susceptibilidad o resistencia a la plasticidad inducida por convulsiones evocadas por kindling. (Langberg *et al.*, 2016; Pitkanen *et al.*, 2017).

El curso de tiempo prolongado para la inducción de crisis espontáneas por medio del kindling, además de la controversia que existe sobre su relevancia para el estudio de la epilepsia humana, en ocasiones, se han considerado como desventajas de este modelo, en comparación con los modelos experimentales crónicos que tienden a evolucionar más rápidamente a convulsiones espontáneas. Otros aspectos negativos son, los procedimientos de estimulación laboriosos, la elaboración o adquisición de electrodos, los costos y el prolongado tiempo invertido. Además, el curso de inducción elevado, contribuye al uso infrecuente de kindling en la etapa avanzada de convulsiones espontáneas. Las dificultades en el mantenimiento de electrodos implantados en etapas de desarrollo de animales debido a la fragilidad del cráneo y el crecimiento es una de las principales razones por las cuales el kindling generalmente, se realiza más frecuentemente en ratas adultas, en lugar de ratas en desarrollo o ratones. La dificultad que presenta el realizar la

técnica en ratones es una desventaja potencial, dadas las oportunidades para el estudio de la epileptogénesis en cepas de ratones transgénicos. A pesar de estas desventajas, el kindling cuenta con aspectos importantes a su favor, debido a que a diferencia de otros modelos, la inducción de epilepsia por medio del método kindling, puede ser realizada de manera controlada, confiable y con menor mortalidad de animales. Esto permite, utilizar al kindling, como un modelo experimental, donde conocer el número de estimulaciones por las cuales, un determinado grupo de animales llega a K-5, puede ser una variable importante; además, permite el estudio de cambios moleculares y celulares durante su proceso, así como, la evaluación de las consecuencias de las convulsiones dentro de neuronas, circuitos neuronales y funciones de orden mayor. Además, ofrece una excelente opción para estudios de nuevas alternativas farmacológicas, empleadas con el fin de modificar la enfermedad, disminuyendo sus aspectos negativos (Pitkanen *et al.*, 2017).

### **Modelos de crisis espontáneas generados por selección genética**

El término selección genética, hace referencia al cruzamiento selectivo de individuos con el fin de transferir los caracteres deseados en la descendencia, dicho método ha sido ampliamente utilizado por el hombre a lo largo de la historia, para satisfacer necesidades de diversos aspectos (Felmer. 2004). Se debe tomar en cuenta, que este tipo de modelo se obtiene primero identificando el locus donde está la anomalía, posteriormente, se exploran los genes contiguos y se identifica el gen en que está la mutación y la mutación misma (García *et al.*, 2010).

En este rubro, destacan los modelos audiogénicos, producidos en organismos genéticamente propensos a presentar crisis epilépticas por estimulación acústica.

En el caso de las ratas, un claro ejemplo, es la cepa Sprague Dawley, en la cual, se demostró que por lo menos en un 4% de la población, existe actividad convulsiva luego de un estímulo de sonido, por lo que se fueron buscando los miembros que reaccionaban a dichos estímulos para generar descendencia con esta característica, y poco a poco, se formó una nueva cepa de ratas genéticamente predispuestas a padecer convulsiones, que son conocidas como GEPR y sus respectivas subcepas. Estos animales en particular muestran un importante defecto genético, que provoca deficiencia en el neurotransmisor

GABA, lo cual produce el evidente estado propenso a las convulsiones que padecen (Schwartzkroin *et al.*, 2006).

Características muy semejantes a las identificadas en las crisis de ausencias en humanos, fueron halladas en una colonia de ratas Wistar criadas en Francia, las cuales fueron evaluadas, encontrando que aproximadamente el 38% de dicha población, presentaba descargas en forma de picos y ondas espontáneas en el registro electroencefalográfico, con estos hallazgos se realizaron los cruzamientos pertinentes para obtener sujetos que compartieran dichas características, con lo cual se logró formar la cepa llamada GAER y sus derivadas (Schwartzkroin *et al.*, 2006).

Se han descrito cepas homocigotas, para estudios de diferentes tipos de crisis epilépticas, como la rata tremor (TRM), en la cual se estudia degeneración esponjiforme, temblores, esterilidad y crisis de ausencia. La rata espontáneamente epiléptica (SER), presenta crisis de ausencia, crisis tónicas y tónico-clónicas; la rata epiléptica de Wakayama (WER), donde se observan crisis de ausencia y tónico-clónicas; y las ratas groggy (GRY), que presentan crisis de ausencia y ataxia (Tokuda *et al.*, 2007). Del mismo modo, en una subcepa de ratas Wistar, llamadas WAG / Rij que había sido endogámica durante más de 100 generaciones, se ha utilizado como uno de los mejores modelos para el estudio de crisis de ausencia, debido a sus características electroencefalográficas (Pitkanen *et al.*, 2017).

Por otra parte, diversas cepas de ratones están predispuestas a padecer convulsiones; dicho fenómeno, se manifiesta como convulsiones espontáneas o inducidas por el medio ambiente; estas son inducidas por la entrada sensorial, tal como estimulación auditiva, estimulación vestibular o manejo. El ejemplo más destacado de un modelo de ratón que experimenta ataques audiogénicos, es el ratón DBA / 2, otro ejemplo, es el ratón conocido como *el*, en el cual, las convulsiones inducidas por estimulación vestibular se hacen evidentes, y la cepa de ratón denominado quaking reacciona a la manipulación, mostrando crisis convulsivas (Schwartzkroin *et al.*, 2006). Otros ejemplos son el ratón stargazer, que posee una alteración en el gen CACNG2, y es utilizado como modelo de ausencias, el ratón lethargic, con mutación en el gen CACNB1, se manifiesta con reacciones de parada, el ratón tottering con una mutación en el gen CACNA1A produce crisis de ausencias y

convulsiones, el ratón GABRG2, es un modelo de crisis típicas de ausencia, entre otros (García *et al.*, 2009).

## Modelos transgénicos

En general, la transgénesis consiste en la introducción de un cambio genético en la línea germinal, heredable por todas las células de un organismo, con la finalidad de hacerlo más eficiente y competitivo (Felmer. 2004; Nowakowsky *et al.*, 2010).

Desde hace varias décadas, los animales transgénicos representan una de las herramientas más potentes y emocionantes de la investigación científica, hecho que se atribuye, a su función como modelos únicos, adaptados a la medida, para abordar preguntas biológicas específicas (Pinkert *et al.*, 1994).

La secuenciación del genoma del ratón permitió producir ratones genéticamente modificados (RGM), capaces de sobreexpresar genes (*knock-in*) o de suprimir su expresión (*knock-out*), como la de aquellos capaces de expresar una proteína humana o de otra especie (humanizados o recombinantes) y ratones con expresión condicionada (tet-Off, tet-ON, recombinasa Cre) (Jackson, 2017).

Para el estudio de la epilepsia, en este rubro se circunscriben mutaciones inducidas, cuyos blancos moleculares son canales iónicos de sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y receptores  $\text{GABA}_A/\text{GABA}_B$  (Pitkanen, 2006). Estos modelos permiten investigar mecanismos cerebrales fundamentales de la epilepsia: implicar o excluir moléculas, sinapsis o ejes neuronales específicos involucrados en la epileptogénesis, además de ser útiles para estudiar la eficacia de diversos anticonvulsivantes específicos (Pitkanen, 2006; Zavala *et al.*, 2011).

En el caso de la epilepsia, los estudios realizados para conocer cuáles eran los genes involucrados en la producción de esta enfermedad, se iniciaron alrededor de 1960. Sin embargo, a mediados de la década de 1990, la tecnología de la ingeniería genética, añadió una dimensión completamente nueva al descubrimiento de genes responsables de la epilepsia y la construcción de modelos. Esta estrategia heteróloga de "genética inversa",

se construyó en torno a la premisa de que si un gen preseleccionado fuera inactivado en ratones dando como resultado un fenotipo de epilepsia, ese gen serviría como un excelente candidato para estudiar la enfermedad en humanos. La primera deleción de un gen seleccionado productor de epilepsia, fue realizada en el protooncogén BMI-1, el cual, describió convulsiones incidentales en el ratón, con estos avances, fue que poco a poco se fueron generando más animales útiles que mostraran diferentes tipos de crisis convulsivas (Pitkanen *et al.*, 2017).

Para el estudio de crisis generalizadas, por ejemplo, se utilizan ratones knock-out, en los que se elimina un gen conocido por su intervención en la excitabilidad neuronal. Algunos de estos modelos son: ratones knock-out para el gen KCAN1 (codifica para un canal de potasio (K<sup>+</sup>) y su ausencia impide la repolarización; produce crisis espontáneas e hiperexcitabilidad en el hipocampo), ratones con mutación en el gen *GABRB3* (afecta a subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>) o el modelo de ratón knock-out para el gen *KCNQ2*, que intenta reproducir la epilepsia benigna neonatal tipo 1 (García *et al.*, 2009).

Muchos de esos genes involucrados, fueron encontrados por mutaciones accidentales, sin embargo, el descubrimiento de fenotipos mutantes epilépticos, en ocasiones, depende de tasas de mutación espontánea relativamente infrecuentes, por esta razón, se han empleado estrategias auxiliares para acelerar el ritmo, que son otras formas de generar RGM. Las mutaciones puntuales inducidas (pero no focalizadas) se han obtenido mediante la mutagénesis de etilnitrosourea (ENU) en ratones, seguidas de un examen fenotípico de las variantes de excitabilidad. La aceleración de la tasa de mutación mediante la introducción de cambios aleatorios de pares de bases únicas es una estrategia valiosa para generar nuevos fenotipos. Sin embargo, el fenotipo de la epilepsia o el umbral convulsivo alterado aún debe determinarse en los nuevos RGM (Pitkanen *et al.*, 2017).

Una alternativa eficiente para estudiar la epilepsia mediante RGM, es utilizando animales que muestran enfermedades donde se presentan crisis convulsivas, en otras palabras, existen RGM útiles como modelos de epilepsia, que no fueron creados específicamente con esa finalidad; por ejemplo, los ratones R6/1 y R6/2 que sirven para estudiar la enfermedad de Huntington, los cuales, tienden a presentar crisis tónico-clónicas, parciales y generalizadas (Zucatto *et al.*, 2010). Otros ejemplos, son los RGM para investigación de

espasmos infantiles, como el ratón ARX y sus subcepas, también, el ratón knock out APC, que carece de la proteína de poliposis coli adenomatosa, los cuales, tienden a presentar crisis convulsivas. Por su parte, el RGM Ts65Dn, que se utiliza para investigación del síndrome de Down, además de haber demostrado presentar espasmos infantiles (que es un signo característico en los pacientes humanos que padecen este síndrome), muestra convulsiones, cuando es administrado con gamma butirrolactona (Pitkanen *et al.*, 2017). El problema con los modelos transgénicos es que, por un lado, los resultados obtenidos en el laboratorio pueden dar lugar a fenotipos que presentan ciertas diferencias con la epilepsia en los humanos, lo que indica que la intervención de otros genes (el fondo genético) interviene en el fenotipo final, y por otro, que mutaciones diferentes den lugar al mismo fenotipo epiléptico (García *et al.*, 2010). Otra cuestión que es importante señalar en relación a los RGM, es que en ocasiones, a pesar de que una alteración en algún gen no demuestre manifestaciones de epilepsia en los animales, eso no descarta la relación que puede existir entre el gen y la enfermedad. Del mismo modo, si la manifestación de epilepsia nos puede indicar lo que sucede en el RGM, eso no asegura que el mecanismo de acción sea exactamente igual en humanos (Pitkanen *et al.*, 2017). Estos aspectos, son los que se deben considerar antes de realizar un RGM o bien, antes de seleccionarlo para su inclusión en algún protocolo, dependiendo de los objetivos planteados por el investigador.

### **Modelo condicionado PV-Cre (B6.129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J)**

La PV pertenece a una extensa familia de proteínas denominada “EF-hand”, las cuales funcionan como búfferes fisiológicos (Lewey-Bentley *et al.*, 2000; Arteaga *et al.*, 2004), ha sido aislada de diferentes tejidos incluyendo el SNC, testículo, riñón y varias glándulas endocrinas (Permyakov 2007). En mamíferos está presente en diversas subpoblaciones celulares del SNC (Chard *et al.*, 1993), incluyendo interneuronas en el cerebro (Celio, 1986) y neuronas sensoriales aferentes propioceptivas en los ganglios de la raíz dorsal (Jackson 2017), pero principalmente se encuentra en células de canasta y de Purkinje, las cuales contienen el neurotransmisor inhibitor GABA (Vig *et al.*, 1998). Las células que expresan PV han sido clasificadas como de punteo rápido, basándose en su capacidad de



disparo (Kawaguchi *et al.*, 2002; Nakazawa *et al.*, 2011), debido a que muestran disparos repetitivos por activación sináptica, poseen arborizaciones axonales que son más densas cerca de su soma y están orientadas horizontalmente, por lo cual presentan mayor inervación en esta dirección (Kawaguchi *et al.*, 1993).

La PV ha sido utilizada como marcador de tipo celular (Chard *et al.*, 1993), es considerada como reflejo del disparo de las neuronas y se ha propuesto que su concentración corresponde al nivel de actividad de las mismas (Baurle *et al.*, 1997; Baurle *et al.*, 1998), debido a su influencia en las propiedades eléctricas y enzimáticas para modular la actividad y excitabilidad neuronal (Celio, 1986); además, se ha comprobado que tiene la capacidad de aumentar como respuesta ante la pérdida de células de Purkinje (Dove *et al.*, 2000), en las cuales puede actuar como buffer de  $Ca^{2+}$  intracelular (Baurle *et al.*, 1998; Dove *et al.*, 2000), de igual manera, su aumento puede ser una respuesta de rescate cuando se presenta algún traumatismo en el núcleo coclear. La disfunción de las células PV+, también ha sido implicada en alteraciones cognitivas y síntomas psiquiátricos (Cates *et al.*, 1999), incluyendo el autismo y la esquizofrenia (Verret *et al.*, 2012), en este caso, se ha encontrado disminución de su expresión en las interneuronas GABAérgicas (Hashimoto *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2012). También, se encuentra involucrada en déficits cognitivos relacionados con la edad y algunas formas de cáncer (Cates *et al.*, 1999), además de ser reconocida como molécula productora de alergia al pescado (Swoboden *et al.* 2002).

Los ratones knock-in PV-Cre son aptos para estudiar la diferenciación neuronal, ya que son capaces de expresar la recombinasa Cre, gracias a que poseen neuronas e interneuronas que contienen parvalbúmina (PV) (células PV+), la cual puede ser utilizada de forma diferencial como marcador de células positivas a ella (Hippenmeyer *et al.*, 2005; Jackson, 2017). Algunas interneuronas PV+ presentan actividad inhibitoria, por lo que, la expresión selectiva de PV, permite identificar estos grupos celulares para realizar registros *in vivo* de su actividad electrográfica por medio de la técnica *patch clamp* (Hippenmeyer *et al.*, 2005).

El sistema Cre/loxP fue descrito por primera vez en 1978 por Stenberg y colaboradores (Hartung *et al.*, 1998), es utilizado con el objetivo de lograr mutaciones condicionales y/o

específicas de ciertos tejidos o bien, restringidas temporalmente. (Lomelí *et al.*, 2007). La recombinasa Cre del bacteriófago P1 tiene 38 kDa y pertenece a la familia de recombinasas de reconocimiento específico del sitio de acción, esta se encarga de catalizar la recombinación entre dos sitios de reconocimiento *loxP*, de esta manera, permite suprimir, insertar, translocar e invertir sitios en el ADN celular (Nowakowsky *et al.*, 2010).

El alelo knock in PV-Cre tiene los elementos promotores y potenciadores de la PV endógena que dirigen la expresión de la recombinasa Cre a células que expresan PV. La expresión endógena de PV permanece intacta en los animales durante toda su vida, y el marcador se expresa, hasta que se completa la secuencia genética; esta acción puede llevarse a cabo, ya sea, por cruzamiento o por adición de un adenoasociado. Cuando se cruzan los animales PV-Cre, con una cepa que contiene la secuencia flanqueada del sitio *loxP* de interés, la recombinación mediada por Cre da lugar a la delección específica del tejido blanco. La secuencia se completa y la recombinación se produce en más del 90% de las células que expresan PV, como las interneuronas en el cerebro y las neuronas sensoriales aferentes propioceptivas en los ganglios de la raíz dorsal. En otras palabras, al cruzar los animales, se está dando pauta a que la PV se marque en todas las células PV+ dentro del organismo del ratón. Por otra parte, al agregar el adenoasociado, este se inserta únicamente en una región específica, dando lugar a la expresión de células PV+ en uno o varios sitios únicos que se deseen estudiar (Hofker *et al.*, 2003; Jackson, 2017) Para dar origen a los ratones PV-Cre se insertó un cassette de direccionamiento (IRES-Cre-pA) que contenía la secuencia de codificación Cre, el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y la secuencia del sitio de poliadenilación en la UTR 3' del exón 5. El promotor de la PV endógeno impulsó la expresión de la recombinasa Cre. El cassette construido fue electroporado en células embrionarias (ES) en el estadio 14 del desarrollo (E14), dichas células, provenían de ratones 129P2 / OlaHsd, estas fueron inyectadas en blastocistos receptores. De estas acciones, se obtuvieron animales quiméricos, que posteriormente, se cruzaron con ratones C57BL/6, dando como resultado, animales heterocigotos, que finalmente, se entrecruzaron para producir homocigotos (Hippenmeyer *et al.*, 2005; Jackson, 2017) (**Esquema 2**). Al mantener una colonia, estos ratones deben

ser criados como homocigotos, debido a que la PV se expresa en los espermatozoides, por lo cual la utilización de ratones PV-Cre machos heterocigotos puede resultar en recombinación de la línea germinal no deseada y recombinación global (Jackson, 2017). Antes de incluir este tipo de ratón en los protocolos, es necesario establecer el posible efecto de insertar el *transgén* en el comportamiento de modelos como el kindling, ya que pueden ocurrir modificaciones genéticas que aceleren o retarden los parámetros del modelo: cambios conductuales o el tiempo de duración de las crisis (Kojima *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Estos animales condicionados ayudan a comprender patologías neurológicas como epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, síndrome de Down, meningiomas y neurofibromatosis, en los que está involucrada la alteración de la PV (Heizmann, 1998; Vig *et al.*, 2000; Cates *et al.*, 2002; Nakazawa *et al.*, 2011), así como entender el fenómeno de FR, para el diseño de nuevos FAE.

Independientemente, de la clasificación de modelos de epilepsia, anteriormente mencionada, existen otras formas de generación de modelos útiles, por ejemplo, los modelos de hipertermia, o los modelos generados mediante desórdenes metabólicos, tales como la hiperglucemia e hipoglucemia (Pitkanen *et al.*, 2017).

## JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de estrategias farmacológicas terapéuticas para la epilepsia presenta varios desafíos, uno de los más importantes consiste en resolver el fenómeno de farmacorresistencia (FR). La FR es la condición en la cual no se logra el manejo satisfactorio de las convulsiones epilépticas por la medicación anticonvulsiva con un primero o un segundo fármaco en un régimen de dosificación terapéutica diaria. La FR constituye un problema crucial para el manejo clínico eficaz de pacientes con epilepsia, ya que más del 40% de ellos confirman mostrar FR en el curso de su condición de por vida (Kumar *et al.*, 2016). La epilepsia fármacorresistente o refractaria (EFR) se atribuye a múltiples causas: anormalidades en la maduración cerebral, daño cerebral severo con cambios irreversibles de la organización de la neuroglia y la función inhibitoria neuronal, alteraciones del abastecimiento de oxígeno neuronal inducidas por convulsiones y cambios adquiridos o heredados que determinan la sobreexpresión de proteínas asociadas a la resistencia a multifármacos (MRF) o de proteínas de la barrera hematoencefálica (BHE) transportadoras de multifármacos (glucoproteínas-P, P-gp) las cuales favorecen o incrementan el eflujo de fármacos antiepilépticos (FAE) o limitan su penetración al cerebro, y de manera sobresaliente, al fenómeno kindling. El propósito final en este campo es obtener fármacos eficaces como alternativa al fenómeno de FR. Para ello, es indispensable disponer, oportunamente, de células vivas PV+ que posean proteínas transportadoras de FAE, procedentes de ratones epilépticos, menores de 65 días de edad, libres de la influencia de condiciones o agentes químicos que puedan interferir con el mecanismo transportador de los FAE. Esto no se ha logrado con los modelos experimentales utilizados hasta ahora, debido principalmente, a que estos no permiten diferenciar correcta y oportunamente las células necesarias. En cambio, a diferencia del modelo convencional C67BL/6, utilizado hasta la fecha, el modelo PV-Cre propuesto en el presente estudio resulta óptimo para este fin, pues el condicionamiento genético del modelo, con la posterior inserción de un adenoasociado, permite diferenciar correctamente las neuronas PV+ y, por otra parte, el kindling eléctrico (nivel o estado 5: K-5) induce la epilepsia de forma eficaz, oportuna, no química; así, ambas condiciones

favorecen la obtención del material biológico apropiado, necesario para estudiar la eficacia de nuevos FAE y su efecto sobre la FR.

## **HIPÓTESIS**

La cepa de ratón condicionado PV-Cre alcanzará el estado 5 (K5) de la escala Racine, inducido por el método kindling eléctrico amigdalino, antes de los 65 días de edad, con menor número de estímulos que la cepa de fondo C57BL/6.

## **OBJETIVO**

Obtener ratones con crisis convulsivas en estado 5 (K5) de la escala Racine, antes de los 65 días de edad, por medio del método kindling eléctrico amigdalino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio consistió en un diseño cuasi-experimental (Complete Dissertations, 2018; Navarro *et al* 2012) de una sola medición cuyo protocolo, aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del INNN, incluye los procedimientos que se realizaron en la etapa inicial del proyecto: “Efecto en las corrientes activadas por receptores de tipo NMDA en células endoteliales posterior a la inhibición de transportadores ABC” con No. Reg. 18/16. El estudio fue realizado en y financiado por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” (INNN), con el apoyo de Médicos Veterinarios y Técnicos de los Departamentos de Bioterio y de Neurofisiología del mismo INNN. Los animales destinados al estudio, previamente genotipificados por PCR, procedentes de una colonia producida en sistema monogámico con apareamientos exogámicos, fueron donados por el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM y estuvieron mantenidos y manejados en apego a las condiciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron alojados en cajas

esterilizadas de polisulfonato, alimentados con Lab Diet Specially Formulated Autoclavable Laboratory Animal Diet® y se les proporcionó agua *ad libitum*, purificada por ozonificación en bebederos estériles de polisulfonato con tapones de neopreno y pipetas de acero inoxidable. El ambiente al interior del Bioterio es controlado mediante inyección automatizada de aire con presión positiva para asegurar de 15 a 18 cambios de aire totales por hora, con temperatura en un rango constante de  $22 \pm 2$  °C durante todo el año y 40 a 60% de humedad relativa. El sistema de iluminación es controlado por interruptores automáticos con ciclo luz/oscuridad de 12:12 horas. Para este estudio se utilizaron dos grupos de ratones macho de 27 días de edad: C57BL/6 (de 14-16 g de peso corporal) y PV-Cre (de 19-21 g de peso corporal), clínicamente sanos a partir de 7 días posteriores a la cirugía de implantación de electrodos y antes del proceso de estimulación, a los cuales se aplicó el método kindling hasta que alcanzaron el estado 5 de la escala Racine en tres episodios sucesivos (etapa 5: K-5). El número necesario de animales, se determinó estableciendo la diferencia mínima de  $\delta = 3$  estímulos ( $\pm 1$  desviación estándar) entre los promedios de los dos grupos, con nivel de significación:  $\alpha = 0.05$  y poder:  $1 - \beta = 0.9$  para el contraste estadístico, resultando ser de 4 individuos por grupo (JMP® 13.2.0. 2016. SAS. Institute Inc).

*Criterios de eliminación de la muestra:* los animales que durante el proceso de estimulación para la inducción de crisis convulsivas por el modelo K-5 manifestaron una o más de las siguientes condiciones, fueron eliminados de la muestra: i) auto-desprendimiento de los electrodos, ii) enfermar sin posibilidad de recuperación en el corto plazo, iii) muerte.

### **Preparación, aplicación y evaluación del Modelo kindling.**

Para aplicar el método kindling, previamente a la cirugía, cada animal fue anestesiado con isoflurano al 3% para la inducción (**Figura 1**) y al 2% para el mantenimiento del plano anestésico. Una vez anestesiado el sujeto, se procedió a implantar quirúrgicamente y con la ayuda de un instrumento estereotáxico un electrodo intracraneal en la región de la amígdala cerebral izquierda (**Figura 2 y Figura 3**) (coordenadas: - 2.86 mm antero-posterior, + 2.8 mm mediolateral desde bregma y + 1.0 mm ventrodorsal desde duramadre). Además, se colocó el electrodo de tierra isoelectrónica que fue puesto del lado

contrario al electrodo activo; los electrodos fueron fijados al cráneo de los animales, utilizando acrílico dental (**Figura 4**). Los electrodos se elaboraron de cable aislado bipolar de acero inoxidable de 0.005 pulgadas de diámetro, recubierto con teflón a excepción de las puntas, cortado y soldado a un *pin* en cada extremo y trenzado con las puntas separadas para construir el extremo que va dirigido a la amígdala y el extremo de la tierra isoeléctrica, donde finalmente se colocó un tornillo y se fijó al cráneo; para evitar el desprendimiento de electrodos, se colocó un tornillo de fijación, el cual únicamente actúa logrando un acoplamiento adecuado en el cráneo y no tiene ninguna relación con el electrodo activo, ni con la tierra isoeléctrica. Una vez terminada la cirugía, en el período posoperatorio se administró a cada sujeto: antimicrobiano (amoxicilina + ácido clavulánico: 15 mg•kg<sup>-1</sup> PO) y analgésico (meloxicam: 5 mg•kg<sup>-1</sup> IP) como dosis única. Siete días posteriores a la cirugía, el modelo fue ensayado aplicando en los electrodos implantados un estímulo eléctrico de 5V, 60Hz y 1 ms de duración cada 24 horas por medio de un estimulador GRASS 788, a partir de lo cual se observaron y registraron las reacciones y las conductas de cada sujeto hasta alcanzar el nivel (estado) máximo de la escala propuesta (K5) en tres ocasiones sucesivas, con las cuales fue evaluado el modelo.

### **Evaluación del modelo**

Las reacciones y conductas de cada animal estimulado fueron calificadas con base en la escala Racine (Racine *et al*, 1972) mismas que posteriormente se analizaron estadísticamente y se muestran en el **Cuadro 1**.

### **Punto final del ensayo:**

El punto final del estudio se alcanzó cuando cada individuo manifestó el estado 5 de la escala Racine (K-5) o bien, cuando al aplicar hasta 10 estímulos el individuo no hubiera manifestado respuesta alguna a la estimulación. Una vez logrado este propósito, los animales fueron destinados a la siguiente etapa de la misma línea de investigación para estudios electrográficos de *patch clamp*.

## RESULTADOS

El **Cuadro 2** muestra el número de estímulos necesarios con los que cada sujeto en cada grupo alcanzó cada estado o nivel (K) de la escala Racine por la estimulación cerebral por el método kindling amigdalino eléctrico.

El **Cuadro 3** describe el comportamiento del promedio y el intervalo del 95% de confianza, del número de estímulos necesarios para alcanzar cada estado (K) de la escala Racine en las dos cepas de ratones, por el método kindling amigdalino eléctrico.

El **Cuadro 4** muestra el análisis de las diferencias entre los promedios del número de estímulos necesarios para inducir cada estado (K) de la escala Racine de dos cepas de ratones, por medio de la estimulación cerebral con el método kindling amigdalino eléctrico.

Para el análisis estadístico de los resultados, se comprobó la normalidad distribucional del número de estímulos necesarios para alcanzar cada estado (K) y se realizó el correspondiente contraste *t de student* para muestras independientes de la diferencia entre los promedios de las dos cepas, con nivel de significación estadística de  $\alpha = 0.05$ . Con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar que no se encontró evidencia suficiente (significativa) de que los ratones de la cepa condicionada PV-Cre requieran, en promedio, menor número de estímulos para inducir cada estado de la escala Racine (K2, K3, K4 o K5) por el método kindling eléctrico amigdalino ( $P > 0.05$ ) (**Figura 5**).



## DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio y contrariamente a lo postulado en la hipótesis, se puede afirmar que los ratones de la cepa condicionada PV-Cre y la C57BL/6, menores de 65 días de edad, manifiestan comportamiento equivalente en respuesta a la estimulación eléctrica kindling para alcanzar cada estado K de la escala Racine; es decir, que la diferencia media del número de estímulos necesarios para inducir cada estado conductual epiléptico por la estimulación kindling eléctrica, no es significativa entre las cepas de ratón, con esto se puede afirmar que responden de manera similar a la estimulación eléctrica. Sin embargo, un aspecto relevante del estudio fue que la cepa condicionada PV-Cre, alcanzó el estado K-5 antes de los 65 días de edad, lo cual significa, que es una fuente única de material biológico, ya que posee características que son de gran utilidad para estudiar el fenómeno de FR en la etapa siguiente de la línea de investigación, de la cual fue parte el presente estudio.

## CONCLUSIONES

1. El modelo murino es útil y apropiado para estudiar la inducción de epilepsia por medio del método kindling amigdalino.
2. La cepa de ratones genéticamente condicionada PV-Cre, reacciona de forma equivalente a la cepa no condicionada C57BL/6, sin manifestar diferencia significativa en su comportamiento por la estimulación kindling eléctrico amigdalino para inducir estados epilépticos.
3. A diferencia de la cepa C57BL/6, la cepa genéticamente condicionada PV-Cre, después de la estimulación con el método kindling amigdalino, aporta material biológico útil para estudios sucesivos de farmacorresistencia, debido a que permite la clara identificación de células PV + durante la realización de la técnica de *patch clamp*.

## REFERENCIAS

- 1) Narvaiza I, Mazzolini G, Qian C, Prieto J, Melero I. 2003. Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología*. Vol. 22 (2): 225-242.
- 2) Tortora H, Derrickson J. 2006. Principios de anatomía y fisiología. Editorial médica panamericana.
- 3) Fisher L, Cross HJ, D'Souza C, French J, Haut S. 2017. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 58(4):531–542. doi:10.1111/epi.13671.
- 4) Pitkanen A, Buckmaster P, Galanoupoulo A, Moshé S. 2017. *Models of seizures and epilepsy*. London, United Kingdom.
- 5) Hedrich HJ, Bullock G. 2004. The laboratory mouse. Elsevier Academic Press. Hannover (Germany).
- 6) Heizmann C. 1998. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol. Exp*. 53: 15-23.
- 7) Vig P, Subramony S, Burrig P, Fratkin M, McDaniel P, Desai D, Qin Z. 2000. Reduced immunoreactivity to calcium binding proteins in Purkinje cells precedes onset of ataxia in spinocerebellar ataxia-1 transgenic mice. *Neurology*; 50: 106-113.
- 8) Radesca D. 2009. Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. *Núcleo de ingeniería biomédica*.
- 9) The Jackson Laboratory. [Internet]. [Citado: 11 feb 2017]. Disponible en: <https://www.jax.org/strain/008069>
- 10) Delgado M. 2014. *Modelos experimentales de kindling para el estudio de la epilepsia* (tesis de licenciatura). Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid.
- 11) Lomelí H, Torres L. 2007. ¿Qué nos enseñan los ratones transgénicos? *Biotecnología*; 14(3): 189-199.
- 12) Ramos FR, Correa J, Saavedra M, Acosta ME, Gasca E, PPérez A, Trujillo J. 2012. Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con

- actividad anticonvulsivante. Archivos de Neurociencias. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 17(1): 45-48.
- 13) Martínez CL. 2009. Aproximación por escalamiento dinámico de electroencefalogramas: un modelo animal (tesis de doctorado). CDMX, México. Instituto Politécnico Nacional.
  - 14) AGE. Asociación Gipuzcoana de Epilepsia. 2017. Disponible en: <https://epilepsiagipuzkoa.eus/asociacion-gipuzkoana-de-epilepsia>
  - 15) Brailowsky S, Silva C, Naquet R. 1989. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportes recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*. 12:53-62.
  - 16) Espinoza J. 2010. Manual de epilepsia. Perú. Universidad Nacional San Juan Bautista.
  - 17) Blume W, Luders H, Mizrahi E, Tassinari C, Van Emde W, Engel J. 2001. Glossary of descriptive terminology for Ictal Semiology: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*; 42(9): 1212-1218.
  - 18) García ME, García I, Matías J. Modelos experimentales en epilepsia. *Elsevier* [Internet]. 2010 [citado: 5 jun 2017]; 25(3):181-188. Disponible en: [http://www.academia.edu/10533106/Modelos\\_experimentales\\_en\\_epilepsia](http://www.academia.edu/10533106/Modelos_experimentales_en_epilepsia)
  - 19) World Health Organization (WHO). Media Centre. Epilepsy. Fact sheet. February 2018. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>
  - 20) Hernán G, Hernán R. 2007. Manual de epilepsia. Buenos aires (Argentina): Nobuko.
  - 21) Brailowsky S, Silva C, Naquet R. 1989. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportes recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*; 12:53-62.
  - 22) Kawaguchi Y, Kondo S. 2002. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of Neurocytology*; 31; 277–287.
  - 23) Schwaller B, Tetko IV, Tandon P, Silveira DC, Vreugdenhil M, Henzi T, Potier MC, Celio MR, Villa AE. 2004. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol. Cell. Neurosci*; 25: 650– 663.

- 24) Reynolds H, Shorvon D, Martínez J. 2016. ¿Monoterapia o politerapia en epilepsia? *Revista de medicina de la Universidad de Navarra*. 100-105.
- 25) Maldonado J. 2008. La dieta cetogénica en el manejo de la epilepsia refractaria. *Rev Mex Ped*; 75(6): 284-88.
- 26) World Health Organization (WHO). Atlas Epilepsy care in the world: 2005.
- 27) Velasco A, Osorio S. 2005. La epilepsia: como conocerla más, para tratarla mejor. *Revista Ciencia*. 14-24.
- 28) Organización Mundial de la Salud (OMS). [Internet]. [Actualización: 7 feb 2017]. [Citado: 10 jul 2017]. Disponible en: <http://www.who.int>
- 29) Hernández A. 2007. Estatus epiléptico, fisiopatología y manejo clínico. *RECVET*; 2(10): 1-7.
- 30) De Lahunta A, Glass E. 2009. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. Missouri (United States of America). Saunders Elsevier
- 31) De Risio L, Platt S. 2014. *Canine and feline epilepsy: Diagnosis and management* CABI. (United Kingdom).
- 32) Flores MB, Santoscoy C, Hernández I. 2018. Estudio retrospectivo de 40 pacientes caninos con diagnóstico presuntivo de epilepsia idiopática, atendidos en el Servicio de Neurología del Hospital Veterinario de Especialidades, UNAM (HVE-UNAM) *Revista de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies*. 29 (1-2): 6-17.
- 33) Gorostidi A, Pérez J. 2006. Caracterización funcional del gen responsable de la Epilepsia Autosómica Dominante Lateral Temporal, LGI1, en modelos animales vertebrados. Universidad del país Vasco. España.
- 34) Tatum W, Kaplan P, Jallon P. 2009. *Epilepsy A to Z*. 2nd edition. Demos medical. New York (United States of America).
- 35) Imirizaldu J. 2003. Concepto de epilepsia, crisis epilépticas y estado de mal epiléptico. clasificación de crisis y síndromes epilépticos. *Revista de Neurología*. Hospital de Cruces, Vizcaya.

- 36) Salas Puig J, Rodríguez S. 2007. Manifestaciones clínicas de las crisis y síndromes epilépticos. Epilepsia en situaciones especiales (en la mujer y el anciano). Técnicas diagnósticas. Diagnóstico diferencial. *Medicine*. 2007;9(75):4814-4819.
- 37) Sosa J. 2008. La dieta cetogénica en el manejo de la epilepsia refractaria. *Rev Mex Ped*. 75;(6):284-288.
- 38) Brodie MJ, Shorvon SD, Canger R, Halasz P, Johannessen S, Thompson P, Wieser HG, Wolf P. 1997. Commission on European Affairs: appropriate standards of epilepsy care across Europe. ILEA. *Epilepsia*. 1;38:1245-50.
- 39) Kwan P, Brodie MJ. 2000. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 3;342:314-9.
- 40) Ekmekci H, Kaptan H. 2017. Vagus Nerve Stimulation. Open Access Maced. *J Med Sci*. 5[3]:391-394.
- 41) Frausche B, Bartolomei F, Kobayashi K, Cimbalnik J, van 't Klooster MA, Rampp S, Otsubo H, Höller Y, Wu JY, Asano E, Engel J, Kahane P, Jacobs J, Gotman J. 2017. High-frequency oscillations: The state of clinical research. *Epilepsia*. doi: 10.1111/epi.13829.
- 42) Navarro HJA, Ramírez RA, Villagrán VC. 2012. Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. SAMSARA Editorial. Primera edición, octubre 2012. México.
- 43) Cody S. 2009. Animal Models of Epilepsy. Methods and Innovations. Saskatoon, Canadá.
- 44) Sampieri A, Rivera L, Zavala C, Carmona L. 2011. Modelos experimentales de la epilepsia del lóbulo temporal. *Acta Pediatr Méx*, 32(5): 311-12.
- 45) Kandratavicius L, Alves P, Lopes C, Naime R, Umeoka E, García N, Soares L, Pereira J. 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *DovePress*; 10: 1693-1705.
- 46) Curia G, Longo D, Biagini G, Jones R, Avoli M. 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*; 172(2-4): 143–157.

- 47) Rubio C, Rubio M, Retana S, Lopez M, Custodio V, Paz C. 2010. In vivo Experimental models of epilepsy. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*; 10(4): 298-309.
- 48) Javela JJ. 2011. Modulación serotoninérgica de las crisis epilépticas temporales en un modelo de kindling químico. Universidad Complutense de Madrid. España.
- 49) Seta K. 1992. Animals models of neurological disease II. New Jersey, (United States of America).
- 50) Alonso M, Bramasco A, Moreno S. 2004. Bioquímica de la epilepsia y modelos experimentales de epilepsia. *Revista de Especialidades Médico quirúrgicas*. 9(3): 15-20.
- 51) Hendelman WJ. 2016. Atlas of functional neuroanatomy. Third edition. Ottawa (Canada): Press Editorial.
- 52) Buckmaster P. 2017. Comparative Biology and Species Effects on Expression of Epilepsy. Models of Seizures and Epilepsy. Second edition. Elsevier Inc.
- 53) Kumar A, Sharma N, Bhardwaj M, Singh S. 2016. A Review on Chemical Induced Kindling Models of Epilepsy. *J Vet Med Res*; 3(3): 1050,
- 54) Bertram E. 2007. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*; 48(2): 65-74. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01068. x.
- 55) Chan S, Wang Y, Liang S, Shaw F. Rapid amígdala kindling causes motor seizures and comorbidity of anxiety and depression like behaviors in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*; 10(129): 1-12.
- 56) Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T. 2003. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J. Neurosci*. 23(7), 2759–2768.
- 57) Grecksch G, Becker A, Rauca C. 1997. Effect of age on pentylentetrazol-kindling and kindling-induced impairments of learning performance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56(4), 595–601.
- 58) de Toledo-Morrell L, Morrell F, Fleming S. 1984. Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling. *Behav. Neurosci*. 98 (5), 902–907.

- 59) Langberg T, Dashek R, Mulvey B, Miller KA, Osting S, Stafstrom CE, Sutula TP. 2016. Distinct behavioral phenotypes in novel “fast” kindling susceptible and “slow” kindling-resistant rat strains selected by stimulation of the hippocampal perforant path. *Neurobiol. Dis.* 85, 122–129.
- 60) Felmer R. 2004. Animales transgénicos: pasado, presente y futuro. *Arch. Med. Vet.* 34 (2); 105-117.
- 61) Schwortzkroin P. 2006. Epilepsy. Models, mechanism and concepts. University Press. Wasington (United States of America).
- 62) Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka K, Kaneko S, Takeuchi I.K, Sasa M, Serikawa T. 2007. The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res.* 1133, 168–177.
- 63) Nowakowsky A. 2010. Generación de ratones transgénicos con expresión específica de recombinasa Cre en megacariocitos. Universidad Complutense de Madrid. España.
- 64) Pinkert AC. 1994. Transgenic animal technology. Academic Press Inc. Alabama (United States of America).
- 65) Pitkanen A, Schwartzkroin P, Moshé S. 2006. Models of seizures and epilepsy. Academic Press. California (United States of America).
- 66) Zavala C, López M. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Neurobiología* [Internet]. 2011. [citado: 17 jul 2017]. Disponible en: <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Zavala-et al/HTML.html>
- 67) Zucatto C, Valenza M, Cattaneo E. 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington’s disease. *Physiol Rev* 90: 905-981.
- 68) Lewit-Bentley A, Réty S. 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 10: 637-643. Disponible en: [http://csl.johnshopkins.edu/academics/580427/rsc/580427\\_4\\_efhandreview\\_032106](http://csl.johnshopkins.edu/academics/580427/rsc/580427_4_efhandreview_032106) [consulta: 13 sep 2018].

- 69) Arteaga G, Pimienta H, Escobar MI. 2004. Neuronas inmunoreactivas a parvalbúmina y calbindina en la corteza prefrontal dorsolateral de sujetos humanos. *Acta Neurol Colomb*; 20 (3):105-118.
- 70) Permyakov A. 2007. Parvalbumin. Nova Science Publishers Inc. New York (United States of America).
- 71) Chard PS, Bleakman D, Christakost S, Fullmer CS, Miller RJ. 1993. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *Journal of Physiology* 472: 341-357. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1160490/pdf/jphysiol00414-0343.pdf> [consulta: 30 ago 2018].
- 72) Celio M. 1986. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231: 995-997. Disponible en: <http://thirdworld.nl/parvalbumin-in-most-gamma-aminobutyric-acid-containing-neurons-of-the-rat-cerebral-cortex> [consulta: 17 sep 2018].
- 73) Vig PJS, Subramony SH, Burrig EN, Fratkin JD, McDaniel DO, Desai D, Qin Z. 1998. Reduced immunoreactivity to calcium-binding proteins in Purkinje cells precedes onset of ataxia in spinocerebellar ataxia-1 transgenic mice. *Neurology* 50:106-113.
- 74) Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. 2011. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* 62 (3): 1574-1583. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090452/> [consulta: 18 sep 2018].
- 75) Kawaguchi Y, Kubota Y. 1993. Correlation of Physiological Subgroupings of Nonpyramidal Cells With Parvalbumin- and Calbindin D28K-Immunoreactive Neurons in Layer V of Rat Frontal Cortex. *Journal of Neurophysiology* 70 (1): 387-396. Disponible en: <http://jn.physiology.org/content/70/1/> [consulta: 17 sep 2018].
- 76) Bäurle J, Helmchen C, Grüsser-Cornhels U. 1997. Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in Purkinje cell degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism. *The Journal of Comparative Neurology* 384:580–596.

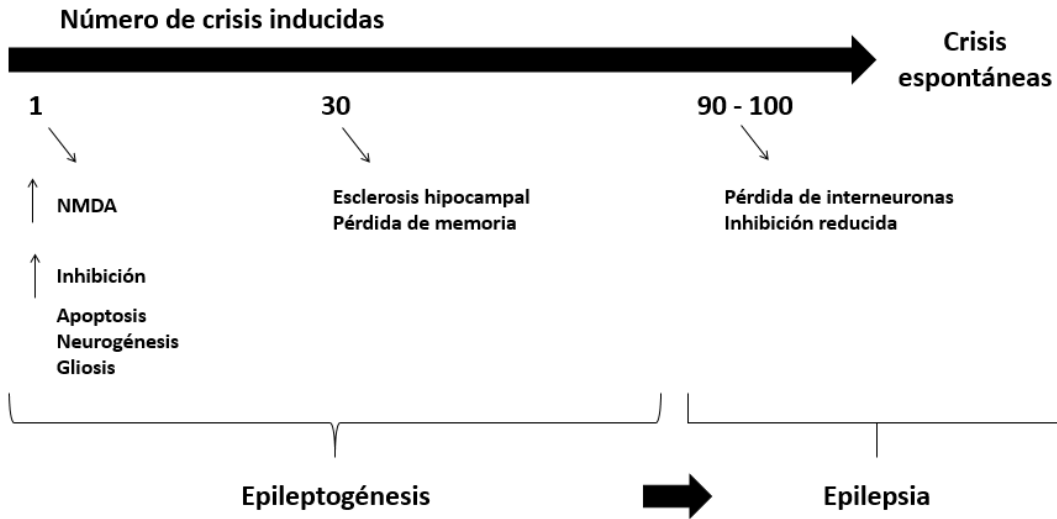


- 77) Bährle J, Hoshi M, Grüsser-Cornhels U. 1998. Dependence of parvalbumin expression on Purkinje cell input in the deep cerebellar nuclei. *The Journal of Comparative Neurology* 392:499–514.
- 78) Dove LS, Nahm S, Murchison D, Abbott LC, Griffith WH. 2000. Altered calcium homeostasis in cerebellar Purkinje cells of leaner mutant mice. *J Neurophysiol* 84: 513–524.
- 79) Cates MS, Berry MB, Ho EL, Li Q, Potter JD, Phillips GN. 1999. Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. *Structure* 7: 1269–1278. Disponible en: [http://www.cell.com/structure/pdf/S0969-2126\(00\)80060-X.pdf](http://www.cell.com/structure/pdf/S0969-2126(00)80060-X.pdf) [consulta: 14 sep 2018].
- 80) Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ. 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model. *Cell* 149(3): 708–721. DOI:10.1016/j.cell.2012.02.046. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375906/> [consulta: 15 sep 2018].
- 81) Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. 2003. Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *The Journal of Neuroscience* 23 (15): 6315–6326. Disponible en: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/15/6315.full.pdf> [consulta: 17 sep 2018].
- 82) Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, Valenta R, Spitzauer S. 2002. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *The Journal of Immunology* 168:4576-4584. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4576. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/168/9/4576.full.pdf> [consulta: 18 sep 2018].
- 83) Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle D, Arber S. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *Plos Biol*; 3(5): e159.

- 84) Hartung M, Kisters-Woike B .1998 .Cre mutants with altered DNA binding properties. *J Biol Chem* 273(36):22884-91. <http://www.jbc.org/content/273/36/22884.long>
- 85) Hofker MH, Deursen J. 2003. The transgenic mouse. Methods and protocols. Humana Press. New Jersey (United States of America).
- 86) Kojima N, Borlikova G, Sakamoto T, Yamada K, Ikeda T, Itohara S, Niki H, Endo S. 2008. Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. *The Journal of Neuroscience*; 28(25):6459–6472. doi:10.1523/JNEUROSCI.0412-08
- 87) Chan J, Jones NC, Bush AI, O'Brien TJ, Kwan P. 2015. A mouse model of Alzheimer's disease displays increased susceptibility to kindling and seizure-associated death. *Epilepsia*; 56(6): e73–e77. doi: 10.1111/epi.12993.
- 88) Liu S, Shen Y, Shultz SR, Nguyen A, Hovens C, Adlard PA, Bush AI, Chan J, Kwan P, O'Brien TJ, Jones NC. 2017. Accelerated kindling epileptogenesis in Tg4510 tau transgenic mice, but not in tau knockout mice. *Epilepsia*; 1-6.
- 89) Cates MS, Teodoro ML, Phillips GN. Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Bioph Jour* [Internet]. 2002. [citado: 31 jul 2017]; 82: 1133–1146. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301919/pdf/11867433.pdf>
- 90) Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* [Internet]. 2011. [citado: 18 jul 2017]; 62 (3): 1574-1583. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090452/>
- 91) Complete Dissertation. 2018. Quasi-experimental Research Designs <https://www.statisticssolutions.com/quasi-experimental-research-designs>
- 92) JMP® 10.0.0. 2012. SAS. Institute Inc.
- 93) Racine, R. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizure. *Elsevier*, 32: 281-294.

## FIGURAS

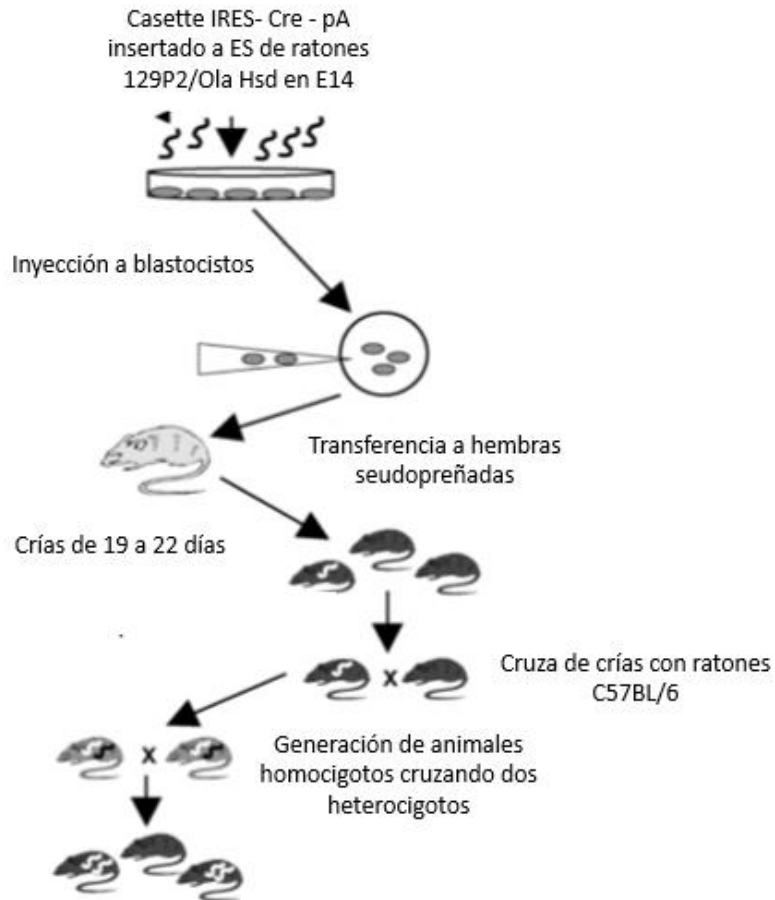
## ESQUEMA 1



Cambios producidos a consecuencia del modelo kindling, además, se muestra la secuencia de alteraciones estructurales y funcionales inducidas por convulsiones repetidas en ratas adultas, comenzando con la crisis inicial, y progresando a la etapa de convulsiones espontáneas, observadas después de 90-100 convulsiones provocadas (Modificado de Pitkanen et al., 2017).

## ESQUEMA 2

### Origen de los ratones PV-Cre (B6.129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J)



Para dar origen a los ratones PV-Cre se insertó un cassette de direccionamiento (IRES-Cre-pA), el cual fue electroporado en células embrionarias (ES) en el estadio 14 del desarrollo (E14), dichas células, provenían de ratones 129P2 / OlaHsd, estas fueron inyectadas en blastocistos receptores. De estas acciones, se obtuvieron animales quiméricos, que posteriormente, se cruzaron con ratones C57BL/6, dando como resultado, animales heterocigotos, que finalmente, se entrecruzaron para producir homocigotos (Hippenmeyer et al., 2005; Jackson, 2017; Modificado de Nowakowsky 2010).

**FIGURA 1**



Muestra la inducción de anestesia con isoflurano.

**FIGURA 2**



Muestra la colocación del aparato estereotáxico.

**FIGURA 3**

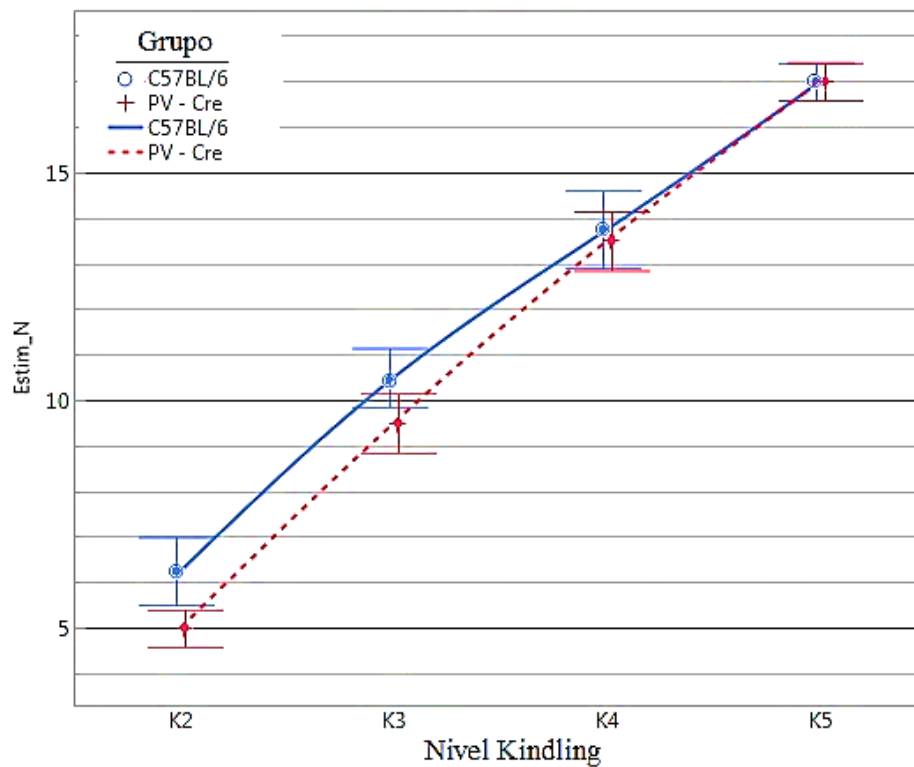
Muestra la implantación del electrodo intracraneal con ayuda del aparato estereotáxico.

**FIGURA 4**

Muestra la fijación del electrodo al cráneo, utilizando acrílico dental.



FIGURA 5



Las barras representan 1 error estándar de la media

Representación gráfica del comportamiento medio del número de estímulos necesarios para inducir distintos estados de la escala Racine por el método kindling eléctrico amigdalino en dos cepas de ratones.

## CUADROS

### CUADRO 1

Estado (K) (Escala Racine)	Características
<i>K0</i>	Sin respuesta convulsiva.
<i>K1</i>	Movimientos masticatorios y de vibrizas, guiño de uno o ambos ojos.
<i>K2</i>	Movimientos de cabeceo.
<i>K3</i>	Mioclonia de miembros torácicos.
<i>K4</i>	Mioclonia de los miembros pélvicos, sin pérdida de equilibrio.
<i>K5</i>	Presencia de convulsiones tónico-clónicas generalizadas que involucran las cuatro extremidades con levantamiento dramático y caída.

Descripción conductual de la evolución del modelo kindling, de acuerdo con la escala de evaluación propuesta por Racine.

### CUADRO 2

Grupo	Ratón	Estado (nivel) de la escala Racine (método <i>Kindling</i> eléctrico)			
		K - 2	K - 3	K - 4	K - 5
C57BL/6	1	5	9	12	17
	2	8	12	16	18
	3	7	11	14	16
	4	5	10	13	17
PV - Cre	1	5	11	14	17
	2	6	10	15	18
	3	5	8	13	17
	4	4	9	12	16

Los valores del cuadro se refieren al número de estímulos necesarios para inducir cada estado (K) de la escala Racine por el método kindling eléctrico amigdalino en ratones.

**CUADRO 3**

Grupo	Estado (Racine)	n	Promedio $\pm$ Desviación Estándar	Error estándar de la media	IC 95%
C57BL/6	K2	4	6.25 $\pm$ 1.5	0.75	(3.86, 8.63)
	K3		10.5 $\pm$ 1.29	0.65	(8.45, 12.6)
	K4		13.75 $\pm$ 1.71	0.85	(11.03, 16.47)
	K5		17 $\pm$ 0.82	0.41	(15.7, 18.3)
PV - Cre	K2	4	5 $\pm$ 0.82	0.41	(3.7, 6.3)
	K3		9.5 $\pm$ 1.29	0.65	(7.45, 11.6)
	K4		13.5 $\pm$ 1.29	0.65	(11.45, 15.55)
	K5		17 $\pm$ 0.82	0.41	(15.7, 18.3)

n: Tamaño del grupo.

IC 95%: Intervalo del 95% de confianza para el promedio.

Resumen estadístico del número de estímulos necesarios para alcanzar cada estado de la escala Racine por el método kindling eléctrico amigdalino en dos cepas de ratones.

**CUADRO 4**

Grupo	Estado K	n	Promedio	Dif: PVCre – C57BL/6	IC95% dif	$t_6$	P
C57BL/6	K2	4	6.25	- 1.25	(- 3.34, 0.83)	- 1.46	0.0968 <sup>NS</sup>
PVCre			5				
C57BL/6	K3		10.5	-1	(- 3.23, 1.23)	- 1.095	
PVCre			9.5				
C57BL/6	K4		13.75	- 0.25	(- 2.87, 2.37)	- 0.233	
PVCre			13.5				
C57BL/6	K5		17	0	(- 1.41, 1.41)	0	
PVCre			17				

n: Número de ratones por grupo.

Promedio: Promedio aritmético del número de estímulos para cada estado K.

Dif: Diferencia entre promedios de los grupos.

IC95% dif: Intervalo del 95% de confianza para la diferencia entre los dos promedios.

t: Estadístico de prueba para la diferencia entre los dos promedios.

P: Valor P del estadístico de prueba.

NS: Diferencias no significativas entre promedios de grupos ( $P > 0.05$ ).

Diferencias de promedios de estímulos necesarios para inducir cada estado de la escala Racine (K) por el método kindling eléctrico amigdalino entre dos cepas de ratones.