

109  
25j.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETERMINACION DEL TRANSPORTE AXONAL  
DEL TRAZADOR PEROXIDASA AGLUTININA DE  
GERMEN DE TRIGO (HRP - WGA) EN LAS  
FIBRAS COMISURALES AMIGDALINAS. EN  
RATAS EPILEPTIZADAS POR KINDLING**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**MA. GUADALUPE MARTINEZ LORENZANA**



MEXICO D. F.



1994

**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION REGULAR**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**

Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) **María Guadalupe Martínez Lorenzana**

con número de cuenta 8529456-7 con el Título: Determinación del transporte axonal del trazador peroxidasa aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales amigdalinas, en ratas epileptizadas por Kindling

Ortogamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	M. en C. Martha María de la Salud León Olea		<i>Martha León Olea</i>
Director de Tesis	M. en C. Rosalva Esther Talavera Cuevas		<i>Rosalva Talavera Cuevas</i>
	Dra. María Luisa Fanjul Peña		<i>María Luisa Fanjul Peña</i>
	Dra. Hortensia Gertrudis González Gómez		<i>Hortensia Gertrudis González Gómez</i>
Suplente	Biól. Gabriela Rosas Salgado		<i>Gabriela Rosas Salgado</i>
Suplente			

**Este trabajo fue realizado en el Instituto Mexicano de Psiquiatría, en la División de Investigaciones en Neurociencias en el Departamento de Neurofisiología y Laboratorio de Histología.**

**A MIS PADRES**

**A. MIS HERMANOS**

**A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO**

**A MIS AMIGOS**

## AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Esther Talavera Cuevas y a la M. en C. Martha León Olea por su asesoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Miguel Condés-Lara por su apoyo y ayuda brindada.

Al Dr. Augusto Fernández -Guardiola por haberme permitido realizar este trabajo de tesis, en esta División.

A Raúl Cardoso por su trabajo de ilustración.

También agradezco a los integrantes del jurado:

M. en C. Martha León-Olea  
M. en C. Esther Talavera Cuevas  
Dra. María Luisa Fanjul Peña  
Dra. Hortensia González Gómez  
Biól. Gabriela Rosas Salgado

Por sus comentarios y sugerencias.

**Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo de una beca para la elaboración de tesis de la D.G.A.P.A- P. U. I. S.  
Además del apoyo parcial del Proyecto MLO1183-N9203 de CONACyT.**



# INDICE

	Pág
Resumen .....	1
Introducción .....	3
<b>CAPITULO I KINDLING</b>	
Generalidades .....	6
Características del estímulo eléctrico .....	7
Región cerebral .....	8
Aspectos filogenéticos .....	9
Cambios conductuales .....	10
Cambios fisiológicos .....	12
Ventajas .....	15
<b>CAPITULO II AMIGDALA</b>	
Generalidades .....	16
Interconexiones .....	18
<b>CAPITULO III TRANSPORTE AXONAL</b>	
Generalidades .....	21
Flujo axoplásmico .....	21
Transporte axónico:	
Anterógrado y Retrógrado .....	22
Peroxidasa de Rábano (HRP) .....	26
<b>CAPITULO IV HIPEREXCITABILIDAD Y TRANSPORTE AXONAL</b>	
<b>CAPITULO V</b>	
Planteamiento del Problema .....	29
Hipótesis .....	30
Objetivo .....	31
<b>CAPITULO VI ESTUDIO EXPERIMENTAL</b>	
Material Y Método .....	32
Resultados .....	39
<b>CAPITULO VII</b>	
Discusión .....	60
Conclusión .....	63
<b>CAPITULO VIII</b>	
Anexos .....	64
Bibliografía .....	71

## RESUMEN

Existen evidencias que indican que el estado de la actividad neuronal influye en los procesos de recaptura y transporte axonal.

Un proceso experimental en el que la excitabilidad neuronal se encuentra aumentada es durante la epileptización producida por la estimulación eléctrica repetida, subconvulsiva de baja intensidad, en algunas áreas cerebrales principalmente límbicas, proceso denominado kindling (Goddard y col, 1969).

En este trabajo se analizó si la hiperexcitabilidad neuronal producida por el kindling amigdalino, incrementa la velocidad del transporte axonal, valorada a través de un trazador retrógrado, como es el caso de la peroxidasa aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), en las fibras comisurales amigdalinas.

El estudio se realizó con ratas Wistar de 250 a 300 gr. de peso distribuidas en tres grupos: 1) kindling: ratas implantadas con un electrodo en la amígdala y sometidos al proceso de epilepsia experimental; 2) falso operado: ratas implantadas con un electrodo en la amígdala, pero sin estimulación; 3) control: ratas que no recibieron ningún tratamiento. Todos los animales de experimentación se inyectaron con HRP-WGA al 10% (10-20 nl) en el núcleo amigdalino basolateral, contralateral al núcleo estimulado (Izquierdo) y se les dió un tiempo de sobrevivencia de 12, 24 y 48 hrs. Se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se fijaron por perfusión intracardiaca. Los cortes de cerebro fueron de 40  $\mu$ m y la reacción mediante el método de Mesulam (1982). Los cortes se analizaron en el microscopio óptico.

Los resultados señalan que el grupo epileptizado presenta un incremento en el transporte axonal, medido como un aumento en la cantidad de fibras que presentaron el trazador y la localización de sitios marcados en puntos más distantes al sitio de

inyección, al ser comparados con los grupos control y falso operado que presentan menor marcaje. Este hecho sugiere que el incremento en la actividad neuronal, producida por el fenómeno kindling, se correlaciona con un incremento en la captura y el transporte del complejo HRP-WGA.

## INTRODUCCION

La epilepsia es un síndrome caracterizado por una disfunción cerebral, de carácter recurrente, y que presenta una hipersincronía en la descarga sostenida y anormal de las neuronas cerebrales. Se ha considerado, que esta alteración tiene un componente tanto en la neurotransmisión inhibitoria (por deficiencia), como en la excitatoria (por exceso) (Brailowsky y col., 1989).

La limitación natural que existe al intentar estudiar la epilepsia en humanos, mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos, ha creado la necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia en otros mamíferos (Tabla 1), que presenten características semejantes de las observadas en las epilepsias humanas.

El modelo experimental de epilepsia empleado en esta tesis es el denominado "kindling" o encendido. Goddard y col.(1969) introdujeron este término, para indicar el desarrollo progresivo de los cambios conductuales y electroencefalográficos (EEG) que culminan en crisis convulsivas generalizadas, en respuesta a la aplicación repetida de estímulos eléctricos, inicialmente subconvulsivos, en sitios específicos del cerebro.

El kindling ofrece varias ventajas sobre otros modelos de epilepsia. Este modelo es altamente reproducible, produce cambios irreversibles y permanentes, su desarrollo gradual permite el estudio de los cambios conductuales, electroencefalográficos y bioquímicos en el curso de la epileptogénesis (Goddard y col., 1969).

Existe una basta literatura que señala que durante el kindling eléctrico se producen modificaciones en distintas o en varias de las etapas de la neurotransmisión, como son: la biosíntesis, liberación, degradación y unión a los receptores postsinápticos (Kalichman, 1982; Bajorek y col., 1986; Siggins, 1986).

TABLA I

Modelos experimentales de epilepsia*	
1.	<p><i>Modelos de actividad epileptógena localizada</i> ( con posibilidades de generalización secundaria)</p> <p>1.1 Agudos: metales convulsivantes: cobalto, tungsteno, etc. congelación fármacos convulsivantes: penicilina, ouabaína, ácido kaínico, etc. estimulación eléctrica focal</p> <p>1.2 Crónicos: crema de aluminio, sales de hierro, <b>kindling</b></p>
2.	<p><i>Modelos de actividad epileptógena generalizada</i></p> <p>2.1 Modelos genéticos: gallina, gerbiles, perro beagle, ciertas ratas wistar, mandril senegalés (papio papio)</p> <p>2.2 Crisis producida por privación: barbitúricos, alcohol, bromuros, etc</p> <p>2.3 Crisis inducidas por fármacos</p> <p>2.3.1 Estimulantes de la excitación</p> <p>2.3.1.1 Inespecíficos: pentilinetetrazol, substancia P, anticolinesterásicos, fluorotil</p> <p>2.3.1.2 Específicos: glutamato, aspartato, ibotenato, ácido homocisteico, etc</p> <p>2.3.1.3 Indirectos: ácido 3-mercaptopropiónico, tiosemicarbazida</p> <p>2.3.2 Bloqueadores de la inhibición</p> <p>2.3.2.1 Acción sobre los sistemas GABAérgicos</p> <p>Bloqueadores de la síntesis: DL-alilglicina, tiosemicarbamato, antagonistas del fosfato de piridoxina, 3-mercaptopropionato</p> <p>2.3.2.2 Bloqueadores del receptor: bicuculina, penicilina, picrotoxina, B-carbolina</p> <p>2.4 Convulsivantes metabólicos: metionina sulfoximina, deoxiglucosa, etc.</p>

\* Modificada de Brailowsky y col., 1989

Sin embargo, un aspecto poco estudiado es el del transporte axonal, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar la velocidad del transporte axonal utilizando un trazador como la peroxidasa aglutinina de germen de trigo (HRP- WGA), en ratas que están sometidas al kindling eléctrico de la amígdala.

# **CAPITULO I**

# KINDLING

## GENERALIDADES

La inducción de crisis convulsivas generalizadas por medio de estimulaciones eléctricas focales en el cerebro se ha llevado a cabo por numerosos investigadores en los años 1950-1969. Delgado y Sevillano (1961) demostraron que la administración repetida de estímulos eléctricos de baja intensidad en el hipocampo, induce una intensificación progresiva de la actividad de la crisis. Sin embargo, la posible importancia de esta observación fue examinada por Goddard y col. en 1969, siendo los primeros en describir y cuantificar el efecto kindling y su importancia como un modelo de epilepsia, aprendizaje y memoria (Goddard y col., 1969)

El término kindling se refiere a los cambios conductuales y electroencefalográficos progresivos, que resultan de la estimulación eléctrica repetida en sitios específicos del cerebro (Goddard y col., 1969; Racine, 1972b). Dicha estimulación es de baja intensidad (60-150  $\mu$ A) y provoca posdescargas que inicialmente son de corta duración (1-5 seg); la frecuencia de las espigas de la posdescarga aumenta y se propagan a otras regiones del cerebro hasta generalizar la actividad epiléptica. Así mismo, los cambios conductuales que acompañan a dichas posdescargas se incrementan en número y en intensidad hasta culminar en crisis convulsivas generalizadas tónico clónicas. La actividad epiléptica así producida tiene un carácter permanente, es decir, si se interrumpen temporalmente las estimulaciones, al reanudarse, las crisis convulsivas generalizadas (CCG) se presentarán con un número menor de estimulaciones (Goddard y col., 1969). Otra característica, y posiblemente una de las más importantes del kindling como modelo experimental de epilepsia, es que las CCG pueden aparecer de manera espontánea (Goddard y col., 1969; Racine, 1972b; Talavera y col., 1989).



## ***CARACTERISTICAS DEL ESTIMULO***

El tipo de estímulo eléctrico es un determinante importante en el desarrollo del kindling. Un ejemplo comunmente utilizado consiste en la administración periódica de un tren de 1 seg de duración, constituido por pulsos bifásicos de 1 mseg a una frecuencia de 60 Hz. No obstante, estímulos a una frecuencia de 25 o 150 Hz también inducen su desarrollo; en contraste, estímulos de baja frecuencia (i.e., pulsos menores de 10 Hz) no son suficientes para su propagación (Goddard y col., 1969). Sin embargo, estudios recientes indican que estímulos de larga duración (60 seg) y baja frecuencia (menor de 0.875 Hz) pueden desarrollar el kindling requiriendo un menor número de estímulos (Cain y Corcoran, 1981).

El intervalo en la aplicación de los estímulos, es otra variable importante en el establecimiento del kindling. Estímulos (pulsos de 1 mseg a 60 Hz durante 1 seg) administrados a intervalos de 1 día o más, inducen de igual manera el kindling. Sin embargo, los animales estimulados a intervalos de 12 horas o menos (hasta 30 min) requieren de un mayor número de estímulos. Por otro lado, la administración continua de estímulos aplicados a intervalos menores de 20 min provoca una adaptación sin haber un desarrollo del kindling (Goddard y col., 1969; Racine y col., 1973).

## **REGION CEREBRAL**

El número de estímulos requeridos para presentar la primer CCG y así completar el fenómeno del kindling, no sólo depende de los parámetros de estimulación, sino también del sitio estimulado. Las áreas cerebrales en las cuales el efecto del Kindling puede ser obtenido fácilmente, se encuentran localizadas principalmente en el sistema límbico. El orden descendente de susceptibilidad de varias estructuras cerebrales, fué caracterizado por Goddard (1969) de la siguiente manera: amígdala, globo pálido, corteza piriforme, área olfatoria, neocorteza anterior, corteza entorrhinal, bulbo olfatorio, área septal, área preóptica, caudado putamen e hipocampo ( Tabla 2 ). Por otra parte, se ha mostrado que en la mayor parte del tallo cerebral, cerebelo, tálamo y sustancia nigra no es posible producir el kindling (Goddard y col., 1969).

TABLA 2

NUMERO DE ESTIMULOS REQUERIDOS PARA PRODUCIR LA PRIMERA  
CRISIS CONVULSIVA GENERALIZADA, EN DIFERENTES REGIONES  
CEREBRALES\*

No. DE ESTIMULOS	REGION CEREBRAL
15	Amígdala
22	Globo pálido
24	Corteza piriforme
29	Area olfatoria
29	Neocorteza anterior
37	Corteza entorrhinal
44	Bulbo olfatorio
55	Area septal
63	Area preóptica
74	Caudado putamen
77	Hipocampo

\*Goddard y col., 1969

## ASPECTOS FILOGENETICOS

El Kindling puede ser establecido en numerosas especies, como son: rana, reptil, ratón, rata, conejo, perro, gato, mono rhesus, gerbil y babuino ( Morrell y col., 1976; Rial y Gonzalez, 1978; Leech y McIntyre, 1976; Goddard y col., 1969; Stach y col., 1978; Wauquier y col., 1979; Wada y col., 1974; Cain y Corcoran, 1980; Wada y Osawa, 1976). Sin embargo, el tiempo requerido para establecer el Kindling en una estructura determinada varía a lo largo de la escala filogenética, estableciéndose más rápidamente en las especies menos evolucionadas (Wada, 1978). Independientemente del sitio de estimulación empleado en mamíferos, el Kindling ocurre más rápidamente en la rata, seguida por el gato, babuino y mono (Tabla 3)

TABLA 3

### TIEMPO APROXIMADO PARA EL DESARROLLO DEL KINLING\*

ESPECIES	DIAS
ESTIMULACION AMIGDALINA	
Rata	8-12
Gato	20-30
Babuino	16-70
Mono	150-200
ESTIMULACION NEOCORTICAL ANTERIOR	
Rata	35-40
Gato	60-70
Babuino	300

\* Joy, 1985

## ***CAMBIOS CONDUCTUALES***

La expresión conductual que acompaña a la actividad electroencefalográfica, durante el desarrollo del Kindling presenta etapas características que se manifiestan de una manera gradual y progresiva. Racine (1972b) ha realizado una clasificación de dichas etapas la cual es ampliamente utilizada. Sin embargo, Joy (1985) ha efectuado una clasificación más detallada de los diferentes estadios conductuales. En la Tabla 4 se presentan ambas clasificaciones, en la cual se observa que el estímulo inicial, no provoca una manifestación conductual clara de la actividad de la crisis. Sin embargo, estimulaciones subsecuentes inducen progresivamente el desarrollo de las CCG, y así mismo la complejidad de la expresión conductual y electroencefalográfica. Cuando se manifiesta la primer CCG el comportamiento que presentan los animales estimulados parece ser un resumen de todos los estadios conductuales previos, culminando con la CCG. Los animales sin estimular por un período de 12 meses pueden responder a uno de los dos primeros estímulos eléctricos con una CCG (Wada y col., 1974).

**TABLA 4**

**PATRONES CONDUCTUALES DURANTE EL DESARROLLO DEL KINDLING AMIGDALINO EN RATA**

ESTADIO	RACINE, 1972	JOY, 1985
0		No hay una respuesta clara a la estimulación
1	Clonus facial	Cierre del ojo ipsilateral, clonus facial, olfateo, masticacion
2	Balanceo de la cabeza	Movimientos vigorosos de masticación, balanceo de la cabeza, clonus del cuello
3	Clonus de las extremidades anteriores	Clonus unilateral o bilateral de las extremidades anteriores
4	Levantamiento	Levantamiento sobre las patas posteriores con una extensión casi vertical del cuerpo
5	Levantamiento y caídas	Levantamiento, seguido por la pérdida de equilibrio y caída
6		Levantamiento y caídas repetidas
7		Ataque de carrera similar al provocado por estimulación audiogénica, en la cual el sujeto corre rápidamente en círculos, dando saltos y giros violentos
8		El proceso del ataque de carrera involucra periodos de tono al inicio y término de la crisis

Nota: cada estadio conductual tiene como componente todos los estadios anteriores más el estadio en que se clasifica.

## **CAMBIOS FISIOLÓGICOS**

El Kindling provoca cambios muy importantes en el funcionamiento neuronal, los cuales se encuentran relacionados con un incremento en la susceptibilidad a la crisis convulsiva generalizada. Entre los cambios más importantes que produce la estimulación tipo Kindling se encuentran los siguientes:

### **1) Descenso del umbral para provocar la posdescarga (PD) focal:**

El umbral se reduce por la estimulación repetida, va disminuyendo durante el Kindling y alcanza un valor estable cuando alcanza la CCG. El umbral permanece reducido aún si la estimulación es interrumpida por más de una semana ( Racine, 1972a; 1980 ).

### **2) Incremento de la duración de la PD:**

Se puede observar un incremento en la PD que inicialmente dura unos cuantos segundos (1-5) y ésta se incrementa en forma uniforme o escalonada, siendo esta última más común en estructuras que desarrollan más rápidamente el Kindling (Burnham, 1976).

### **3) Propagación de la actividad de la crisis a otras áreas cerebrales:**

La propagación de la actividad de la PD a otras áreas cerebrales acompaña al fenómeno Kindling y culmina con la generalización y la CCG ( Racine, 1980).

### **4) Aumento de la frecuencia de descarga de las espigas epilépticas:**

Conforme las estimulaciones se aplican hay un incremento progresivo en la frecuencia de las espigas de origen o con características epilépticas.

El Kindling parece estar relacionado con la expresión progresiva de al menos dos propiedades neuronales: la potenciación a largo plazo y el desarrollo de respuestas en salva (Racine y col., 1981).

La potenciación a largo plazo (PLP) se refiere al aumento de las respuestas sinápticas provocadas por la estimulación repetida de un sitio específico. Los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) son activados, generando una corriente entrante de  $Ca^{++}$  que incrementa la concentración de este ión en la terminal postsináptica, disparando el PLP que es restringido en la población de sinápsis coactivas. La estrecha relación entre el óxido nítrico y los receptores a NMDA ha sido de gran interés en los últimos años. Se sabe que en el hipocampo se lleva a cabo el fenómeno de PLP, involucrado en los procesos de memoria y aprendizaje. Estos procesos neuronales se pueden deber a aumentos o disminuciones prolongados en la transmisión sináptica, después de la estimulación continua de ciertas neuronas. Así, en las neuronas del hipocampo, cuando se registra en las terminales postsinápticas la acción del transmisor presináptico, de alguna manera forma aún no muy bien conocida, en la postsinapsis se genera una señal que viaja de forma retrógrada y que estimula nuevamente la liberación del transmisor en la presinapsis. El mensaje retrógrado cierra el circuito de retroalimentación, haciendo que la respuesta neuronal sea continua. Esta señal retrógrada muy bien podría ser el óxido nítrico ( Bohme y col., 1991; Stevens, 1993).

La respuesta en salva se encuentra relacionada con un cambio en la respuesta neuronal provocada por una excitación aferente repetida, manteniendo la aparición de una salva de potenciales de acción de alta frecuencia (Joy, 1985). Registros unitarios del sitio primario o secundario en el sistema límbico, han puesto en evidencia la presencia de respuestas en salva que incrementan la frecuencia de los potenciales de

acción durante el kindling (Racine,1980).

El kindling conduce a cambios permanentes en la función neuronal de otras estructuras que son probablemente el resultado de las conexiones entre una región y otra. Se ha considerado que estos cambios pueden tener un correlato morfológico (a largo plazo) o neuroquímico (inmediato y a largo plazo). Se ha propuesto que los cambios morfológicos planteados son la generación de nuevos arreglos de circuitos neuronales, que podrían ser el resultado del crecimiento colateral y formación de nuevas sinapsis; así como, de una modificación de las sinapsis existentes quizás por el crecimiento de terminales presinápticas o por un incremento en la superficie receptiva postsináptica ó en el número de receptores (Joy, 1985).

Algunos investigadores postulan que los cambios involucrados están relacionados con un incremento en la eficacia sináptica o de la respuesta postsináptica. Por otro lado, se ha encontrado que dichos cambios pueden estar relacionados con el número o tamaño de los contactos sinápticos (ver Joy,1985).

Sin embargo, Hovorka y col. (1992) han demostrado cambios morfológicos en elementos presinápticos y postsinápticos durante el kindling.

Otro efecto importante es el denominado de transferencia, el cual indica que el desarrollo progresivo del kindling facilita el establecimiento de focos secundarios, requiriéndose menor número de estímulos en éstos para producir las crisis convulsivas generalizadas (ver Kalichman,1982).



## **VENTAJAS**

El modelo del kindling ofrece varias ventajas sobre otros modelos de epilepsia experimental.

La ventaja evidente del fenómeno del kindling radica en la ausencia de sustancias químicas extrañas al organismo en el sitio donde se observa la descarga neuronal epiléptica. El sitio anatómico del foco puede ser elegido, dependiendo del objetivo del experimento. La naturaleza del estímulo permite establecer mejores estrategias de experimentación, es decir, el estímulo se puede controlar de tal forma que se apliquen intensidades de estimulación que siempre desencadenen crisis convulsivas (estímulos supraumbrales) o intensidades que permitan provocar cambios en el tejido nervioso de manera gradual; lo cual lo hace un modelo altamente reproducible, permitiendo una gran variedad de estrategias experimentales durante el curso de la epileptogénesis (Goddard y col., 1969). Otra ventaja que ofrece el modelo experimental de epilepsia "kindling" es la de poder estudiar su evolución, su instalación y su permanencia en los fenómenos electrofisiológicos, conductuales y bioquímicos ( Vindrola y col., 1981; Cain, 1989; Talavera y col., 1989; Cain y col., 1990; Kamphuis y col., 1990; During y col., 1992; Hernández y Condés, 1992).

## **CAPITULO II**

## AMIGDALA

La amígdala cerebral es una estructura con forma de almendra, que se encuentra localizada por debajo del manto cortical del lóbulo temporal inferior. Esta región está interconectada con la región cortical, con el sistema olfatorio y con algunas regiones del tálamo e hipotálamo. La amígdala, participa en la modulación de funciones endócrinas y en patrones de integración conductual tales como: defensa, ingestión, agresión, reproducción y aprendizaje (Hamilton, 1976; De Olmos y col., 1985).

Con base en estudios morfológicos y trazado de vías neuronales por medio de métodos histoquímicos, se han descrito los siguientes grupos que conforman a la amígdala (De Olmos y col., 1985):

**OLFATORIO:** este grupo está formado por el área amigdalina anterior (AA), el núcleo del tracto olfatorio lateral (TOL), el extremo dorsal del núcleo amigdalino medial (Me), los núcleos amigdalinos cortical anterior (CoA) y posterolateral (CoPL), así como el área de transición amigdalopiriforme (APir).

**MEDIAL:** éste incluye la amígdala medial (Me), la porción posteromedial de la sustancia sublenticular inominata (SSLI), y las divisiones medial (BSTM) e intermedia (BSTI) del núcleo de la cama de la estría terminalis (BST).

**CENTRAL:** incluye el núcleo central de la amígdala (Ce) y la porción dorsolateral de la sustancia sublenticular inominata, así como las divisiones lateral y ventral del núcleo de la cama de la estría terminalis (BSTL, BSTV).

**BASOLATERAL:** el cual está constituido por los siguientes núcleos: lateral (La), basolateral (BL), basolateral ventral (BLV) y basomedial (BM).

En esta tesis se estudia en especial el núcleo basolateral (BL) ya que interconecta ambos complejos amigdalinos, este se subdivide en los núcleos basolateral anterior (BLA) y basolateral posterior (BLP). El núcleo BL alcanza los límites rostrocaudales del complejo basolateral, rostralmente se encuentra localizado cerca de los núcleos La, BM y BLV (Figura 1), se extiende hasta la región caudal a diferencia de los demás núcleos basolaterales. El núcleo BL se encuentra delineado por otras estructuras vecinas: rostralmente, por una prolongación ventral del núcleo La, el cual se interpone entre el BL y la cápsula externa. La cápsula externa separa ventral y caudalmente al BL de la corteza olfatoria. A nivel caudal, cerca de la salida de la estria terminalis de la amígdala, el núcleo BL queda casi completamente separado del resto del núcleo La, por la banda de células y fibras del núcleo LaVL orientadas medialmente, adoptando una forma de media luna antes de alcanzar su terminal caudal (De Olmos y col., 1985; Paxinos, 1982).

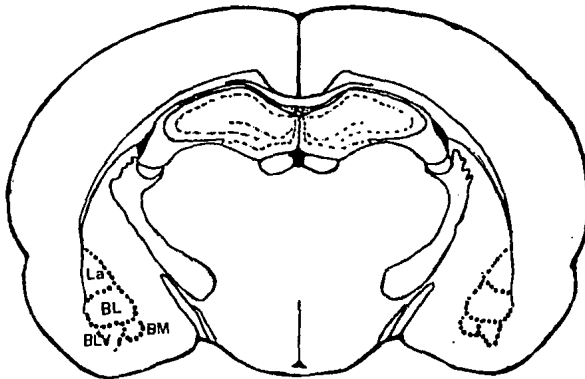


Fig. 1. Localización esquemática del complejo basolateral amigdalino a nivel de anteroposterioridad (AP 6.2) Paxinos y Watson (1982). Núcleos: lateral (La), basolateral (BL), basolateral ventral (BLV) y basomedial (BM).

## ***INTERCONEXIONES***

El grupo amigdalino no sólo recibe proyecciones de un gran número de estructuras corticales y subcorticales, sino que también envía conexiones a diferentes estructuras mediante la vía conocida como amigdalofuga (De Olmos y col., 1985; Leonard y Scott, 1971).

La vía amigdalofuga, es un sistema difuso que se caracteriza por la participación de las fibras de la estría terminalis, las cuales se originan a partir de una gran extensión del complejo basolateral (Leonard y Scott, 1971).

Estudios neuroanatómicos han demostrado que un número considerable de fibras de la estría terminalis entran a la comisura anterior, la cual se divide en tres componentes: el supracomisural, comisural y postcomisural (Leonard y Scott, 1971)

En este trabajo se estudia, el componente supracomisural, ya que las fibras eferentes provenientes del núcleo basolateral y corticomediales cursan por la estría terminalis, que asciende por la parte medial de la cola del núcleo caudado, ocupa después el surco tálamo estriado en el cuerpo del ventrículo y desciende hacia la comisura anterior por la cual gran parte de sus fibras pasan al hemisferio opuesto para seguir un trayecto inverso, hasta alcanzar el complejo amigdalino y otras estructuras (Kelley y col., 1982; Nitecka y col., 1981; Leonard y Scott, 1971).

La comisura anterior consta de dos divisiones: una anterior y otra posterior (Figura 2), formadas de fibras finamente mielinizadas.

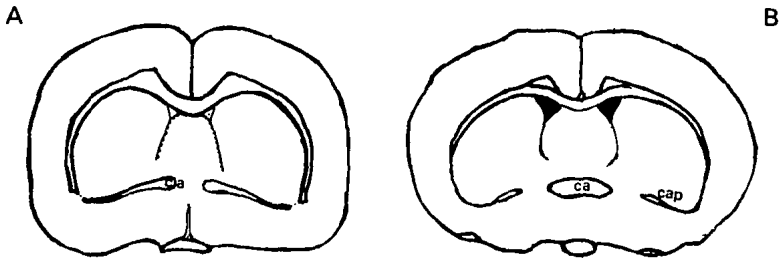


Fig. 2. Esquemas representativos de la localización de la comisura anterior. A) Comisura a nivel rostral (AP 9.2), donde se observa únicamente la división anterior. B) Comisura a nivel caudal (AP 8.7), donde se observan ambas divisiones anterior y posterior. Ca= comisura anterior, Cap= comisura anteroposterior (Paxinos y Watson, 1982).

La división anterior se deriva de las fibras comisurales del núcleo olfatorio anterior, las cuales se proyectan a los mismos núcleos del lado opuesto así como al bulbo olfatorio, bulbo accesorio olfatorio y la corteza prepiriforme. Además, cabe mencionar que algunas fibras de la estricta terminalis originadas en la amígdala también atraviesan por la comisura anterior (De Olmos y col., 1985). La división posterior conecta el área de la neocorteza temporal de cada lado (De Olmos y col., 1985).

Los estudios neuroanatómicos del sistema nervioso se han revolucionado durante las dos últimas décadas, debido al desarrollo de nuevas técnicas, una de éstas es el empleo del transporte axonal con la finalidad de encontrar conexiones en el sistema nervioso central. Anteriormente, las proyecciones neuronales eran mapeadas mediante la degeneración de los axones, localizando únicamente los cuerpos celulares afectados

(Ralston, H.J. III, 1990). Sin embargo, ahora con el empleo del marcaje por transporte axonal anterógrado ó retrógrado, se pueden localizar los axones y terminales nerviosas de cuerpos celulares específicos, como es el caso mediante el trazado autoradiográfico de proteínas, después de haber administrado aminoácidos o azúcares (precursores de glicoproteínas) marcados radioactivamente, por ejemplo prolina y leucina tritiada. Asi mismo, la localización de los cuerpos celulares pertenecientes a terminales específicas pueden ser identificados por el uso de marcadores tales como proteínas, colorantes o sustancias fluorescentes que son endocitados en las terminales nerviosas y transportados hacia el cuerpo celular. Entre estos marcadores, se encuentran el azul de Evans, la primulina y la peroxidasa de rábano (HRP), la cual ha sido ampliamente utilizada para este tipo de estudios (Enerback y col., 1980; Nennesmo y Kristensson, 1982; Mesulam, 1982).

# **CAPITULO III**



# TRANSPORTE AXONAL

## ***GENERALIDADES***

Las neuronas son células dinámicas y metabólicamente activas del Sistema Nervioso cuyos cuerpos neuronales envían sus terminales a grandes distancias. Por esta razón, las neuronas poseen mecanismos complejos de transporte para acarrear materiales desde el cuerpo celular hasta las terminales nerviosas, y para realizar el recorrido inverso, transportando sustancias desde las terminales hasta el cuerpo celular.

Existen dos tipos de transporte axonal: el lento denominado flujo axoplásmico y el rápido denominado transporte axónico.

## ***FLUJO AXOPLASMICO***

El flujo axoplásmico acarrea materiales únicamente desde el cuerpo celular hasta las terminales nerviosas, involucra el movimiento de componentes del citoesqueleto y membranas citoesqueléticas (Hoffman y Lasek, 1975; Bray y Mills, 1991) así como proteínas asociadas, incluyendo enzimas citoplásmicas de metabolismo intermedio (Brady y Lasek, 1981). La función del transporte axoplásmico en una neurona madura, consiste en renovar el axón continuamente, mientras que en un axón en desarrollo o en proceso de regeneración tiene por finalidad aportar el nuevo axoplasma. Los componentes del transporte lento viajan a una velocidad de 0.2-2.5 mm/día.

## **TRANSPORTE AXONICO**

A diferencia del flujo axoplásmico, el transporte axónico es un proceso activo que depende del aporte adecuado de energía (ATP) y oxígeno. Este puede ser anterógrado es decir, desde el cuerpo celular hacia las terminales nerviosas y retrógrado de la terminal nerviosa hacia el cuerpo celular (Fig. 3). Además, la participación de los microtúbulos es muy importante en el mecanismo del transporte.

***Transporte Anterógrado Rápido.*** En este transporte, se encuentra involucrado el movimiento de vesículas pequeñas incluyendo vesículas sinápticas y componentes de membrana (Grafstein y Forman, 1980). Los organelos transportados se mueven a una velocidad de 400 mm/día.

***Transporte Retrógrado Rápido.*** Es la manifestación del proceso de endocitosis normal visto en las células en general. Además, incluye el transporte de lisosomas. La velocidad del transporte retrógrado rápido es aproximadamente de una tercera parte del componente anterógrado.

El transporte axónico es un proceso activo que depende del aporte adecuado de energía (ATP) y oxígeno ( Adams, 1982). Los microtúbulos desempeñan un papel importante en el mecanismo del transporte, tienen la característica de ser estructuras polares dentro del axón, y están orientados con su polo positivo hacia la terminal sináptica, y su polo negativo hacia el cuerpo celular (Heideman y col., 1981; Burton y Paige, 1981). Los trabajos experimentales con los alcaloides colchicina y vinblastina

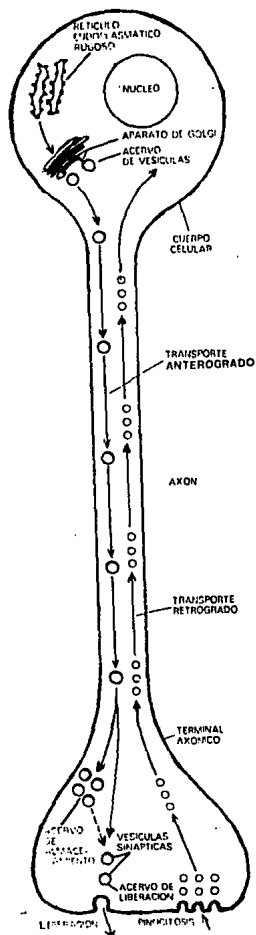


Fig. 3. Esquema representativo de una neurona en el que se puede observar el transporte anterógrado, desde el cuerpo celular hacia las terminal nerviosa, y el transporte retrógrado de la terminal nerviosa hacia el cuerpo celular (Iversen, 1981).

han demostrado que el transporte axónico está relacionado con los microtúbulos, ya que dichas sustancias actúan en la integridad de éstos inhibiendo el transporte (Fink y col.,1973; Karlsson y Sjostrand,1969; Paulson y McClure,1974). Además de los microtúbulos, en este transporte se encuentran implicadas dos moléculas con actividad de ATPasas: la Kinesina y la Dineína (MAP 1C), las cuales interactúan con los organelos y microtúbulos para generar la fuerza necesaria para la motilidad de los organelos en el axón, de la siguiente manera: 1) las proteínas pueden estar distribuidas a lo largo de la superficie exterior de los microtúbulos, y el movimiento de los organelos puede ocurrir por el paso de éstos a lo largo de una serie de moléculas (Fig. 4A). 2) la superficie de los organelos puede servir como un sitio de adhesión a la molécula, la cual puede interactuar transitoriamente con la pared de los microtúbulos durante la producción de fuerza (Fig. 4B). Esta última es la más aceptada, participando la Kinesina en el transporte anterógrado y la Dineína en el transporte retrógrado (Vallee y Bloom, 1991) (Fig. 5).

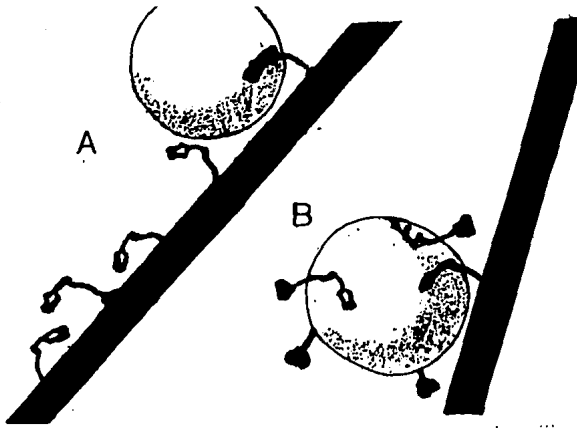


Fig. 4. Mecanismos alternativos para el movimiento de los organelos a lo largo de los microtúbulos. (A) El organelo interactúa transitoriamente con un grupo de proteínas fijas en los microtúbulos. (B) Un organelo con moléculas de la proteína ligadas en su superficie puede interactuar transitoriamente con los microtúbulos (Vallee y Bloom, 1991).

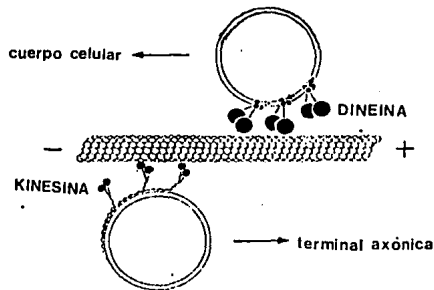


Fig. 5. Representación de un organelo utilizando la proteína Kinesina en el transporte anterógrado ó la Dineína citoplásmica en el transporte retrógrado (Vallee y Bloom, 1991).

La técnica neuroanatómica empleada en esta tesis es la detección histoquímica de la peroxidasa de rábano (HRP), la cual ha sido utilizada en el trazado de vías neuronales en el sistema nervioso central (Divac y col., 1984; Ottersen, 1982). Con esta técnica se puede localizar el cuerpo celular de una neurona en el cerebro, así como las conexiones neuronales entre una estructura y otra.

La HRP es una glicohemoproteína, con un peso molecular de 40,000 y un diámetro de 5.34 nm en estado hidratado. Esta molécula es endocitada fácilmente por las terminales sinápticas y transportada retrógradamente hacia el soma neuronal. La HRP, puede ser conjugada con la lectina aglutinina de germen de trigo (WGA), por medio de enlaces covalentes (Gonatas y col., 1979). La WGA se liga a sitios específicos de la membrana como son los residuos ácidos N-acetil-D-glucosamina y N-acetilneuraminico, los cuales son ubicuos en las membranas neuronales (Karlsson, 1979; Gonatas y col., 1979), así el complejo HRP-WGA entra a la neurona a través del proceso de endocitosis adsorptiva, siendo captada y transportada en dirección retrógrada, anterógrada, colateral y transganglionar.

# **CAPITULO IV**

## HIPEREXCITABILIDAD Y TRANSPORTE AXONAL

En diversos estudios se ha mostrado que el estado de la actividad neuronal influye en los procesos de endocitosis y exocitosis. Cuando se aplican estimulaciones eléctricas se presenta un incremento en la exocitosis así como un aumento compensatorio en la endocitosis (Ceccarelli y col., 1973; Cooke y col., 1975; Dolivo y col., 1977; Holtzman y col., 1973; Heuser y Reese, 1973; Teichberg y col., 1975).

Así mismo, en varios trabajos en los cuales se ha utilizado la peroxidasa de rábano (HRP) como trazador, se ha demostrado que la actividad neuronal también influye en la recaptura y transporte de dicha sustancia. Existe una interacción dinámica entre la actividad de la neurona y la cantidad de endocitosis y transporte axonal de ésta (Broadwell y col., 1979; Litchy, 1973; Nishino y col., 1979).

Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la hiperactividad neuronal producida por el kindling eléctrico involucra a los procesos de endocitosis, exocitosis y los mecanismos relacionados con el transporte axonal. Langmeier y col. (1980) realizaron un estudio en el cual estimularon eléctricamente la corteza cerebral somatosensorial y examinaron por medio de microscopía electrónica la región homotópica del hemisferio contralateral, encontraron un incremento significativo en el número de vesículas sinápticas en los animales estimulados. En otro estudio Langmeier y col. (1983) llevaron a cabo otro análisis cuantitativo, por medio de una evaluación planimétrica mediante microscopía electrónica en la corteza somatosensorial; observaron un incremento en el número de sinapsis que presentan signos de exocitosis, así como un aumento en el número de vesículas sinápticas en proceso de exocitosis en los animales de experimentación de 3.8% a 5.9% y de 0.7% a 11.4% respectivamente.



La cantidad de sinapsis con signos claramente demostrables de endocitosis también se incrementó de 2.8% a 7.1% y la cantidad de vesículas sinápticas pasó de 2.1% a 3.7%.

También se ha establecido que cuando se aplican inhibidores de la síntesis proteica como cicloheximida en la *Rana catesbeiana* y anisomicina en la rata, hay una supresión del kindling. Esto sugiere, que el kindling requiere de una síntesis proteica activa, la cual es muy importante para la realización de muchos eventos neuronales (Morell y col, 1979; Jonec y Wasterlain, 1979).

Además, Morrell y Morrell (1983) han demostrado la importancia que tiene el transporte axonal para que se produzca el paso de información transináptica a través de la comisura en la *Rana catesbeiana* para formar un foco epiléptico secundario, mediante una técnica que distingue el tráfico de potenciales de acción del transporte axonal, al aplicar colchicina, la cual daña el transporte axonal, pero mantiene la transmisión eléctrica intacta; y bloqueando los potenciales de acción con lidocaína y sin modificar el transporte axonal. Los animales tratados con lidocaína desarrollaron un foco epiléptico secundario, mientras que en los tratados con colchicina, este foco no se desarrolló. Esto demuestra que el kindling requiere de una síntesis de proteínas y también del transporte axonal para desarrollar un foco epiléptico secundario.

# **CAPITULO V**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias señaladas en los antecedentes indican, que la hiperactividad neuronal, produce modificaciones en los procesos de endocitosis y exocitosis, así como en el transporte axonal (Broadwell y col., 1979; Ceccarelli y col., 1973; Cooke y col., 1975; Dolivo y col., 1977; Holtzman y col., 1973; Heuser y Reese, 1973; Litchy, 1973; Nishino y col., 1979; Teichberg y col., 1975)

La hiperexcitabilidad neuronal producida por el kindling genera variaciones importantes en las concentraciones de neurotransmisores que se acompañan de alteraciones en la transmisión tanto eléctrica como química, así como en los procesos de endocitosis, exocitosis. Además es necesario el transporte axonal de ciertas moléculas para que se produzca el paso de la información transináptica para obtener un foco epiléptico secundario (Bajorek y col., 1986; Kalichman, 1982; Langmeier y col., 1980 y 1983; Morrell y Morrell, 1983; Siggins y col., 1986).

Sin embargo, no hay estudios que demuestren que los cambios, que se producen debido a la hiperexcitabilidad neuronal como consecuencia del kindling, estén asociados también con una alteración en la velocidad del transporte axonal. Por lo que el objetivo de este estudio es conocer si la velocidad del transporte axonal está modificada.

## **HIPOTESIS**

Si el estado de la actividad neuronal influye en los procesos de recaptura y transporte axonal, entonces en el kindling eléctrico amigdalino, en el cual se produce una hiperexcitabilidad neuronal, la velocidad en el transporte axonal del trazador HRP-WGA en las fibras comisurales amigdalinas puede estar alterado.

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es determinar la velocidad del transporte axonal del trazador peroxidasa-aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), en las fibras comisurales amigdalinas, en ratas sometidas al "kindling" eléctrico en el núcleo basolateral amigdalino que han presentado diez o más crisis convulsivas generalizadas, comparadas con ratas falso operado y controles.

## **MATERIAL Y METODO**

### ***ANIMALES EXPERIMENTALES***

Se utilizaron 69 ratas macho de la cepa Wistar de 280 a 310 gr de peso, las cuales fueron mantenidas en condiciones de temperatura y luz controladas ( $23 \pm 1$  °C con 12 horas de iluminación comenzando a las 6:00 hrs ) con agua y alimento *ad libitum*.

### ***GRUPOS EXPERIMENTALES***

Para su estudio los animales fueron agrupados de la siguiente manera:

- 1) Grupo Control: ratas que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) Grupo Falso Operado: ratas implantadas con un electrodo en amígdala izquierda, pero que no fueron estimuladas.
- 3) Grupo Kindling: ratas implantadas con un electrodo en amígdala izquierda y que fueron estimuladas hasta producir diez crisis convulsivas generalizadas.

### ***IMPLANTACION DEL ELECTRODO***

Las intervenciones quirúrgicas para la implantación del electrodo de estimulación y registro se llevaron a cabo en animales anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso. Una vez anestesiada la rata se colocó en el aparato estereotáxico y se le implantó en la amígdala basolateral izquierda un electrodo bipolar trenzado. Se utilizaron las coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson,1982)

# **CAPITULO VI**

(anterior 6.2; lateral 5; altura 1.5) para la colocación del electrodo que se llevó a cabo con la ayuda del registro de la actividad eléctrica bajo el criterio de la actividad espontánea y de los potenciales evocados a la estimulación olfativa y somato sensorial (Talavera y col., 1989). Los electrodos y el conector se fijaron en el cráneo por medio del pegamento super bond y acrílico dental. Una vez terminada la implantación los animales fueron sometidos a un período de recuperación post-quirúrgico de una semana.

### ***ESTIMULACION AMIGDALINA***

Una vez terminado el período de recuperación, se inició elkindling amigdalino. Los parámetros de estimulación utilizados fueron los siguientes: un tren de un segundo de duración, constituido por pulsos rectangulares de 1 mseg de duración a una frecuencia de 60 Hz. La intensidad de los estímulos se determinó a partir del umbral a la posdescarga \* y fué entre entre 70 y 150  $\mu$ A. La búsqueda de esta intensidad umbral se llevó a cabo al aplicar estímulos de intensidad creciente a intervalos de 5 minutos. La estimulación inicial fué de 70  $\mu$ A, la cual fue incrementándose de 10 en 10  $\mu$ A, hasta producir una breve posdescarga de varios segundos constituida por 5 a 10 espigas de alto voltaje y acompañada por la conducta característica de cierre del ojo ipsilateral. La actividad neuronal fué amplificada y monitoreada en el osciloscopio e impresa en papel con la ayuda de un polígrafo de un canal.

\* El umbral a la posdescarga amigdalina está definido como la intensidad mínima de estimulación, que puede provocar una posdescarga en la estructura cerebral estimulada y cambios conductuales que pueden ser: inmóvil, giro y cierre del ojo.



La estimulación amigdalina se llevó a cabo dos veces al día: a las 9:00 y a las 15:00 hrs, cinco días a la semana.

La evolución del kindling se evaluó por la duración de las posdescargas y por la conducta de los animales, tomando como referencia los criterios definidos por Racine (1972a).

La duración de la posdescarga (PD) dada en segundos, así como los diferentes estadios conductuales presentados en cada estimulación fueron promediados y graficados.

## ***INYECCION DEL COMPLEJO HRP-WGA \****

Las ratas de los grupos: control, falso operado y kindling fueron sometidas al mismo procedimiento de inyección. Se inyectaron en el núcleo amigdalino basolateral derecho de 10 a 20 nanolitros del complejo peroxidasa de rábano-aglutinina de germen de trigo HRP-WGA (sigma), disuelta al 10% con solución salina estéril, en el núcleo amigdalino basolateral derecho.

La inyección del complejo HRP-WGA se llevó a cabo anestesiando a los animales con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso. Una vez anestesiada la rata se colocó en estereotáxico para realizar la inyección del complejo HRP-WGA por medio de un electrodo de vidrio con una punta de diámetro de 10-20 micras. Este electrodo estaba unido a una jeringa Hamilton de un microlitro, montada en una torre micrométrica para estereotáxico. Se tomaron 10 nanolitros de azul de pontamina\*\* y 100 nanolitros de nugal\*\* antes de subir los 20 nanolitros del complejo HRP-WGA. La inyección se realizó en el núcleo amigdalino basolateral contralateral al sitio de estimulación, siguiendo las coordenadas estereotáxicas de Paxinos y Watson (1982) (anterior 6.2, lateral derecho 5, altura 1.5). Después de inyectar los 10- 20 nanolitros de HRP-WGA se esperó unos segundos y se sacó el electrodo, el trepano se selló con cera de hueso y se suturó la piel con hilo quirúrgico estéril. Una vez terminada la inyección, los animales fueron sometidos a un período de sobrevivencia de 12, 24 y 48 horas (Tabla 5).

\* Ver anexo I

\*\* Estas soluciones sirvieron como indicadores a la hora de inyectar los 20 nanolitros de HRWGA.

TABLA 5

**Muestra el número de animales utilizados en cada grupo experimentales a diferentes períodos de sobrevivencia**

	<i>tiempo de sobrevivencia</i>		
<i>condición experimental</i>	12 hrs	24 hrs	48 hrs
CONTROL	-----	n=10	n=16
FALSO OPERADO	n=3	n=4	n=7
KINDLING	n=7	n=7	n=15

### **FIJACION Y OBTENCION DEL CEREBRO\***

Los animales fueron anestesiados con una sobre dosis de pentobarbital sódico y se fijaron por perfusión vía intracardiaca con 250 ml de solución Ringer (pH 7.2 a 37 °C), 250 ml de solución fijadora (paraformaldehído 5%, glutaraldehído 25% en buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.2) pH 7.2 a 4 °C. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se colocaron en 50 ml de la solución fijadora. El periodo de post-fijación fue de 24 horas a 4 °C. A continuación los cerebros se colocaron en una solución de sacarosa al 10% en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.2, para su crioprotección.

\* Ver anexo II

## ***CORTES HISTOLOGICOS DEL CEREBRO***

Los cerebros fueron cortados en un microtomo de congelación. A estos se les realizó un corte posterior a nivel de puente y una muesca a lo largo del lado derecho. El cerebro se colocó en posición postero-anterior y se congeló a 20 °C. Se realizaron cortes coronales de 40 micras de espesor, recolectándose a partir de la anterioridad de 11.7 (un corte cada 80 micras) hasta 3.7 y de aquí hasta 1.2 (un corte cada 120 micras). Los cortes se colocaron en buffer fosfatos (0.1 M, pH 7.2).

## ***REACCION HISTOQUIMICA\****

Para el revelado del complejo HRP-WGA, se utilizó agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) como sustrato y tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno, la cual da un producto de reacción fácilmente visible y de color café oscuro en el sitio de actividad del complejo HRP-WGA.

Las soluciones fueron preparadas de acuerdo al método de Mesulam (1982).

**Solución A:** 92.5 ml de agua destilada, 5 ml de buffer acetatos 0.2 M (pH 3.3) y 100 mg de nitroferrocianuro de sodio (Merck).

**Solución B:** 5 mg de tetrametilbenzidina (*sigma*) disuelta en 2.5 ml de etanol absoluto.

\* Ver anexo III

Los cortes fueron lavados 3 veces por un minuto en agua destilada. Posteriormente, se realizó el período de preincubación, se mezcló la Solución A con la Solución B en los cortes de tejido flotados, los cuales fueron colocados en una plancha con movimiento y en obscuridad durante 20 min, al término de este tiempo se prosiguió a realizar la reacción enzimática, se adicionó de 2-4 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 % hasta obtener una sensibilidad máxima, durante 20 min. Después, los cortes fueron lavados 3 veces por un minuto en buffer Acetatos (0.02 M a 4 °C), y se montaron en portaobjetos gelatinados\*.

### ***CONTRATINCION***

Todos los cortes se contratificaron con Safranina al 0.01%, debido a que esta técnica ofrece un excelente contraste de color entre el producto de reacción (café de la TMB) y el color (rojo) que presentan los cuerpos neuronales después de la contratinción. Posteriormente, los cortes se deshidrataron y se montaron con resina sintética.

### ***ANALISIS HISTOLOGICO***

El análisis de los cortes se llevó a cabo por microscopía óptica. La información obtenida del número de neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA fue ilustrada en esquemas del atlas de Paxinos y Watson (1982). Se tomaron fotomicrografías a diferentes aumentos a nivel de las fibras comisurales y sitio de inyección, así como de neuronas marcadas con HRP-WGA, para cada uno de los grupos estudiados.

\* Ver anexo IV

## RESULTADOS

### ***DESARROLLO DEL KINDLING***

La evolución del kindling se evaluó por la duración de la posdescarga (PD) y por la conducta presentada, durante cada estimulación (1-30), en cada uno de los animales 12, 24 y 48 horas (n=23); así como en los animales de 48 hrs (n=6), en donde se encontró el sitio de inyección en el núcleo basolateral amigdalino (6.2). Estos valores fueron promediados y graficados (únicamente, se presentan a continuación los resultados para el grupo n=6).

La figura 6. muestra el desarrollo gradual en la duración de la PD medida en segundos, durante la evolución del kindling.

En la figura 7 se muestra la evolución de las fases conductuales\* (65 estimulaciones) durante el desarrollo del kindling, en el grupo en el cual se encontró la inyección de HRP-WGA en la anteroposterioridad 6.2. En donde se puede observar que en el estímulo 10 los animales ya han alcanzado una fase II y en el estímulo 40 presentan la primera crisis convulsiva generalizada. Es importante señalar que el retraso que presenta este grupo no tiene nada que ver con la inyección de HRP-WGA ya que es un grupo homogéneo en cuanto a que presentó 10 o más crisis convulsivas.

\* En esta descripción se representa con números romanos, cada estadio conductual presentado por los animales estimulados (Tabla 4)

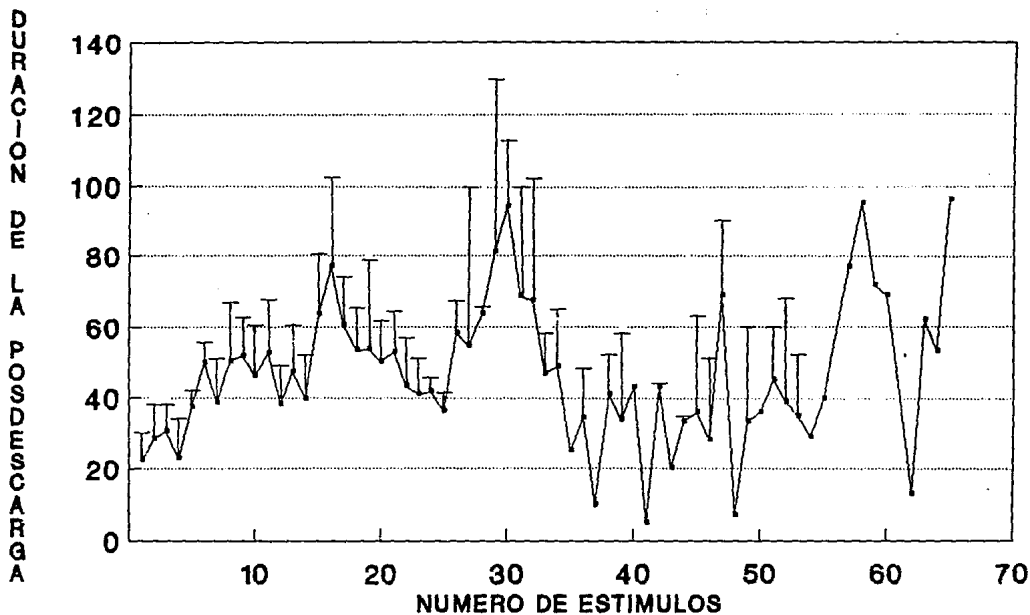


Fig. 6. Duración de la posdescarga medida en segundos, durante el desarrollo del kindling, en el grupo (48 hrs) en donde el sitio de inyección de la HRP-WGA se encontró en la AP de 6.2 (n=6). Cada punto representa el promedio +/- el error estándar para cada estimulación.

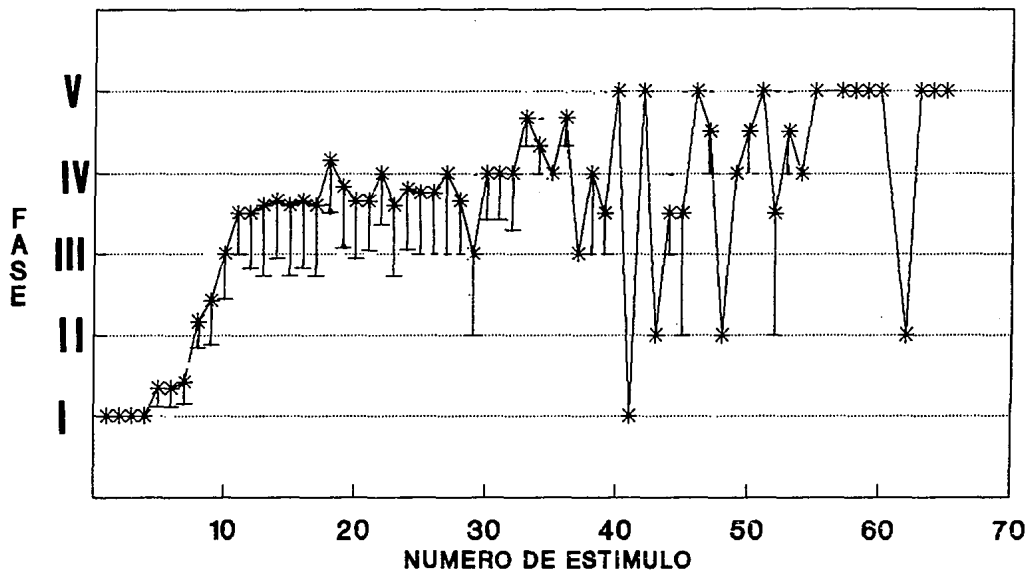


Fig. 7. Evolución de las etapas conductuales durante el desarrollo del kindling, en el grupo (48 hrs) en donde el sitio de inyección de la HRP-WGA se encontró en la AP de 6.2 (n=6). Cada punto representa el promedio +/- el error estándar para cada estimulación.



El análisis histológico de los sitios de estimulación, no mostró una gran variabilidad, es decir, en general el sitio estimulado se localizó en el grupo amigdalino basolateral (Fig. 8).

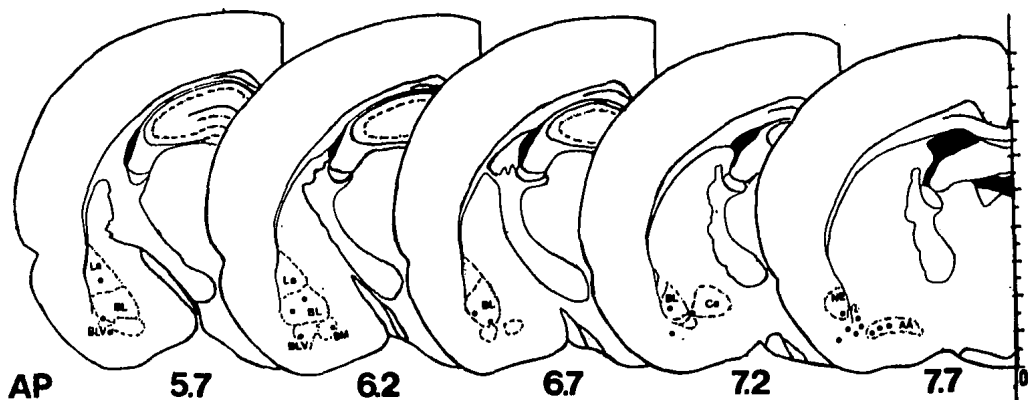


Fig. 8. Análisis histológico de algunos de los sitios de estimulación (n=21), en donde se observa que la mayoría de éstos se encuentran situados en el grupo de la amígdala basolateral (los círculos llenos, indican el sitio del electrodo).

La expresión conductual, que acompaña a la actividad electroencefalográfica durante el desarrollo del kindling, se encuentra representada (en números romanos) en la figura 9. Se observa que existe un aumento en la duración de la posdescarga, así como en la frecuencia de las espigas al ir evolucionando el kindling, hasta alcanzar una fase V en la cual se ha llegado a la crisis convulsiva generalizada.

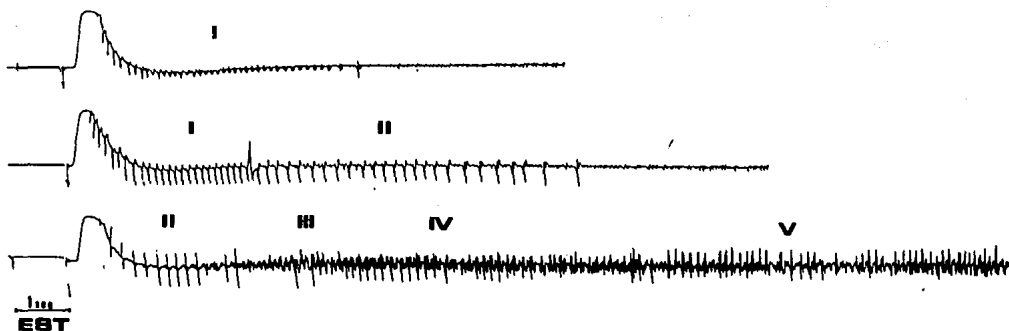


Fig. 9. Registro de la actividad eléctrica cerebral en una rata, inducida por la estimulación eléctrica en el núcleo basolateral amigdalino izquierdo, en el cual quedó establecido el fenómeno del Kindling (Fase V).

## ***ANALISIS HISTOLOGICO***

La distribución de la HRP-WGA en el tejido nervioso se detectó mediante el producto de su reacción, el cual se manifiesta por la presencia de gránulos café oscuros, que se encuentran dentro de las fibras y los cuerpos neuronales. Este resultado se ilustra en la figura 10.

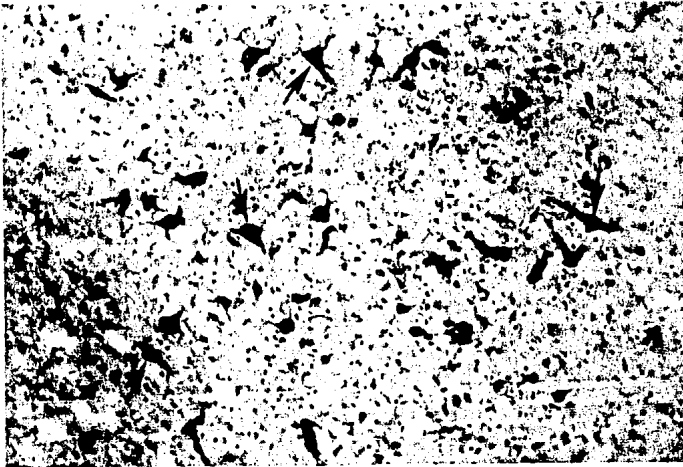


Fig. 10. Fotomicrografía donde se muestra el producto de la reacción de la HRP-WGA. Nótense los gránulos café oscuros presentes en los cuerpos neuronales ( ↑ ). Corte coronal de 40  $\mu$ m, contrateñido con safranina al 0.01%, (250X).

Para cada grupo experimental, sólo se tomaron en cuenta los animales experimentales en los cuales se localizó el centro del sitio de inyección en el núcleo basolateral amigdalino (AP 6.2), que se encontró claramente marcado por el producto de reacción de la HRP-WGA, como se observa en la figura 11.

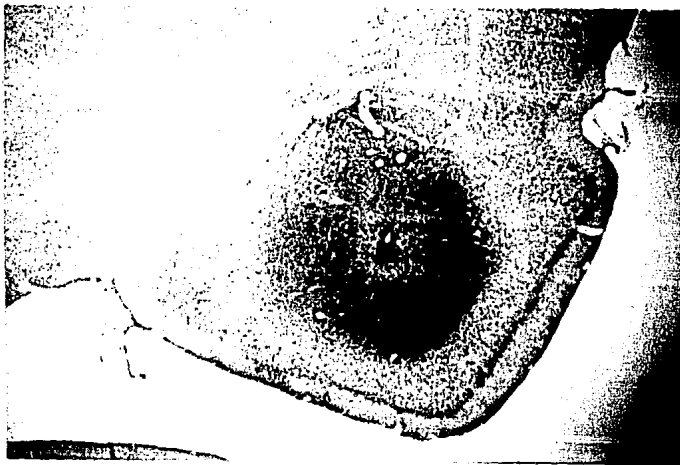


Fig. 11. Fotomicrografía del sitio de inyección de la HRP-WGA, en el núcleo basolateral amigdalino (BL).  
Corte coronal de 40  $\mu$ m, contrateñido con safranina al 0.01% (16X).

La distribución de las neuronas y las fibras marcadas con HRP-WGA, desde el sitio de inyección (AP 6.2) hasta la comisura anterior (AP 9.2), se esquematizaron en el atlas de Paxinos y Watson (1982). Se representaron cualitativamente el número de células de la siguiente manera: 1-5 (★), 6-10 (■), 11- 20 (●), 21-30 (□), 31-40 (▲), más de 41 (⊗) y fibras (≈).

En este trabajo se presentan esquemas y fotomicrografías de los grupos experimentales con un tiempo de sobrevivencia de 48 horas. Ya que en este tiempo se detectó la sensibilidad máxima del transporte axonal del trazador HRP-WGA. Se muestran únicamente para cada grupo experimental ( control, falso operado y kindling) dos esquemas representativos de dos animales en los que se esquematiza la localización, el número de células y las fibras encontradas con marcaje de HRP-WGA. Así mismo, para cada grupo se presentan fotomicrografías de las regiones comisurales en donde se pueden observar fibras y células marcadas por la HRP- WGA.

Los esquemas y las fotomicrografías de las fibras comisurales a nivel rostral (AP 9.2) y caudal (AP 8.7) se muestran para cada uno de los grupos experimentales con la finalidad de poder hacer un análisis comparativo, que el lector podrá realizar de manera visual.

## ***Abreviaturas***

(De las figuras 12, 15 y 18)

AA	Area amigdalina anterior
AV	Núcleo anteroventral talámico
BL	Núcleo amigdalino basolateral
BM	Núcleo amigdalino basomedial
BLV	N. amigdalino basolateral ventral
Ca	Comisura anterior
Cap	Comisura anterior posterior
Ce	N. central de la amígdala
CL	N. centrolateral talámico
Cl	Claustro
CM	N. medial central talámico
CoA	N. amigdalino cortical anterior
CPu	Caudado putamen
CzA	Zona de transición corteza-amígdala
CzIA	Corteza insular agranular
CzOp	Corteza olfatoria primaria
FrPa	Corteza frontoparietal
FStr	Fundus striatis
GP	Globo Pálido
HDB	N. de la banda horizontal límbica
I	N. amigdalino intercalado
La	N. amigdalino lateral
LD	N. laterodorsal talámico
Me	N. amigdalino medial
MD	N. medio dorsal talámico
MDL	N. medio dorsal lateral talámico
NE	N. endopiriforme
PC	N. paracentral talámico
PLCo	N. amigdalino posterolateral cortical
PT	N. paratenial talámico
PV	Palio ventral
PAV	N. paraventricular anterior talámico
Re	N. reuniens talámico
Rt	N. reticular talámico
St	Estria terminalis
Stl	N. de la estria terminalis lateral
Stm	N. de la estria terminalis medial
TOL	N. del tracto olfatorio lateral
TOLD	N. del tracto olfatorio lateral dorsal
VL	N. ventrolateral talámico
VMH	N. ventromedial talámico
VPL	N. ventral posterior lateral talámico

**CONTROL**

La distribución y número de neuronas encontradas fueron similares para todas las ratas control. Se observaron neuronas marcadas con HRP-WGA ipsilateralmente al sitio de inyección en las siguientes regiones: en corteza olfatoria primaria (CzOp), estria terminalis (St), núcleos tálamicos, globo pálido (GP), fundus striatis (FStr). En ambos lados ipsilateral y contralateral, se encontraron neuronas positivas a la reacción en los núcleos amigdalinos, corteza frontoparietal (FrPa) y corteza insular agranular (CzIA) como se representa en la figura 12.

La densidad de la marca de HRP-WGA en las fibras comisurales en este grupo fue escasa.

A nivel rostral (AP 9.2) se encontró poca marca alrededor de las fibras comisurales del lado ipsilateral al sitio de inyección. Sin embargo, del lado contralateral el marcaje fue muy tenue (casi nada) en comparación al grupo kindling (Fig. 13).

A nivel caudal (AP 8.7) de las fibras comisurales se presentó únicamente marca de HRP-WGA alrededor de ésta (Fig. 14).



un nivel anterior a los niveles de corte coronal de los niveles 9.2 a 6.2, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA para dos animales del **Grupo Control**; los cuales presentan la misma distribución. La localización de las neuronas se representa en cada esquema con \* :1-5 neuronas, ■:6-10 neuronas, ●:11-20 neuronas, □ :21-30 neuronas, ▲ :31-40 neuronas, ⊕ :más neuronas. Las líneas discontinuas representan fibras marcadas (⊖).

**Fig. 12.** Esquemas de cortes coronales a diferentes niveles de anteroposterioridad desde 9.2 a 6.2, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA para dos animales del **Grupo Control**; los cuales presentan la misma distribución. La localización de las neuronas se representa en cada esquema con \* :1-5 neuronas, ■:6-10 neuronas, ●:11-20 neuronas, □ :21-30 neuronas, ▲ :31-40 neuronas, ⊕ :más neuronas. Las líneas discontinuas representan fibras marcadas (⊖).

CONTROL

No.1

No.2

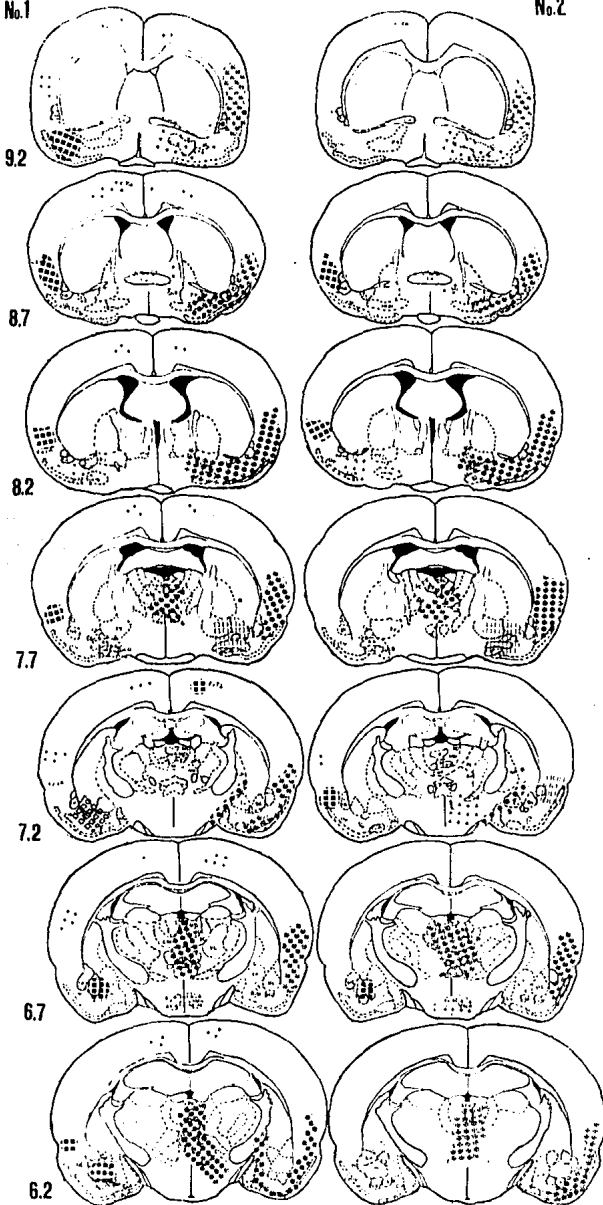
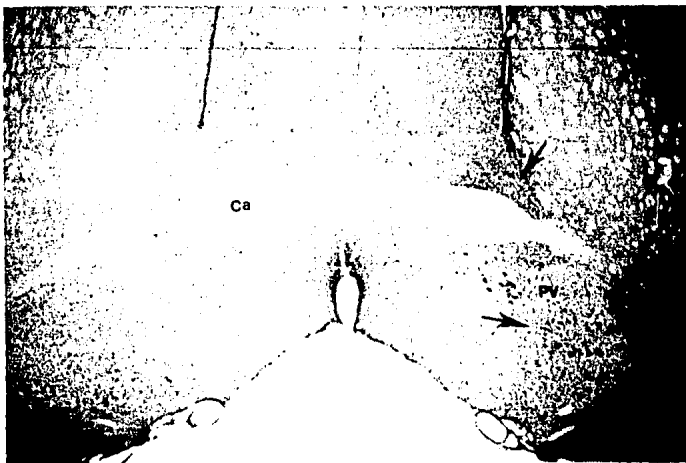
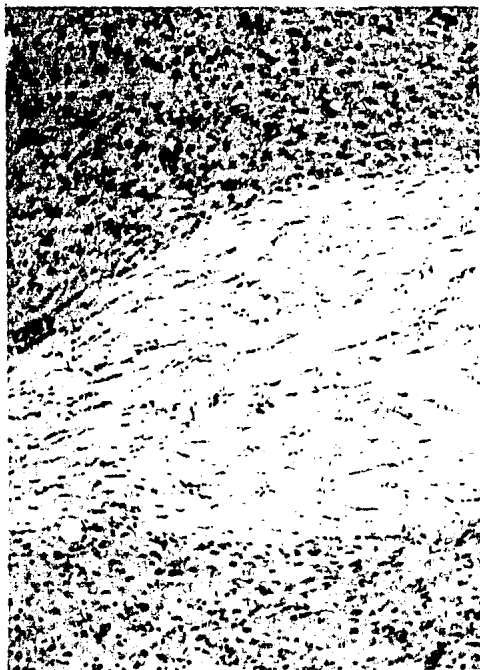


Fig. 13. Fotomicrografías del *Grupo Control* a nivel rostral de la comisura anterior (AP 9.2).  
A, muestra la comisura anterior (Ca) a nivel rostral, donde se observa del lado derecho marca de la HRP-WGA alrededor de la comisura (↑) y células (↑) en la zona del fundus striatis (FStr) y palio ventral (PV), (16X).  
B y C, Ca lado izquierdo y derecho respectivamente(100X). Observe la marca en C (↑).  
Cortes coronales de 40µm, contrateñidos con safranina al 0.01%.

**A**



**B**



**C**

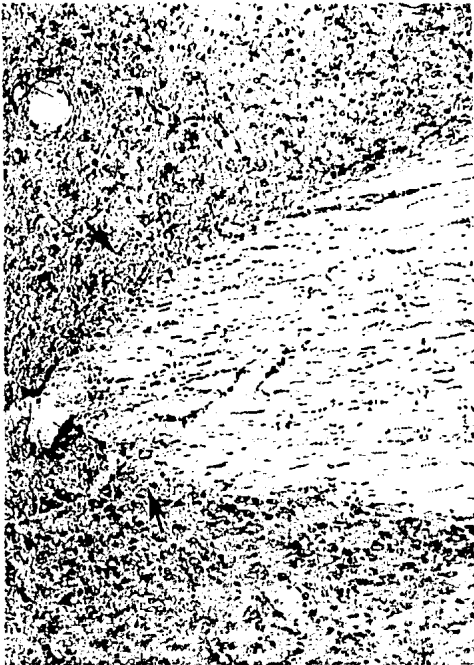


**Fig. 14. Fotomicrografías del *Grupo Control* a nivel caudal de la comisura anterior (AP 8.7). En A se muestra la comisura anterior (Ca) a nivel caudal, en donde se observa ligera marca alrededor de ésta (↑), (16X). B y C muestran los extremos del lado izquierdo y derecho respectivamente de la Ca (100X). Obsérvese la marca alrededor de la comisura (↑). Cortes coronales de 40µm, contrateñidos con safranina al 0.01%.**

**A**



**B**



**C**



**FALSO OPERADO**

El grupo falso operado presentó una distribución similar de las neuronas marcadas con HRP-WGA, a las del grupo control: ipsilateralmente al sitio de inyección se observaron en corteza olfatoria primaria (CzOp), estria terminalis, núcleos tálamicos, globo pálido (GP), fundus striatis (FStr), núcleos amigdalinos. En el lado contralateral al sitio de inyección, se presentó una variación en la cantidad de neuronas marcadas, en los núcleos amigdalinos, corteza frontoparietal (FrPa) y corteza insular agranular (CzIA) (Fig. 15).

De la misma manera, la densidad de la marca en las fibras comisurales a nivel rostral (Fig. 16) y caudal (Fig. 17) fue muy pobre en comparación al grupo kindling.



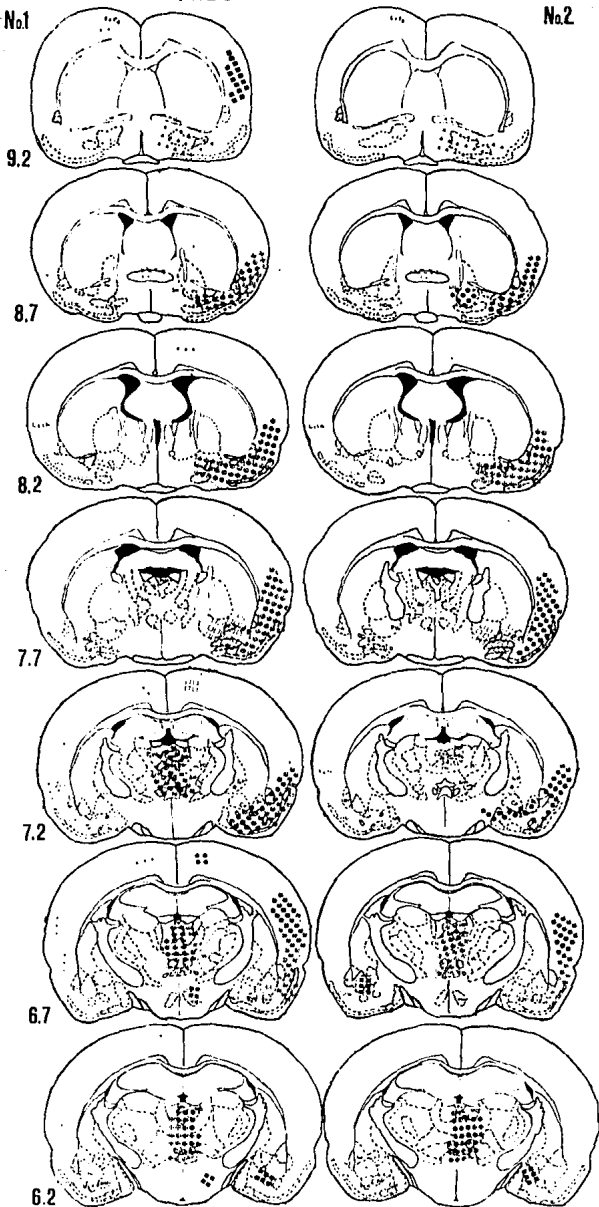
coroneales a diferentes niveles de anteroposterioridad desde 6.2 a 9.2, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA para dos animales del **Grupo Falso Operado**; los cuales presentan distribución similar. La localización de las neuronas se representa en cada esquema con ✕:1-5 neuronas, ■:6-10 neuronas, ●:11-20 neuronas, □:21-30 neuronas, ▲:31-40 neuronas y ⊗:más neuronas. Las líneas discontinuas representan fibras marcadas (⊗)

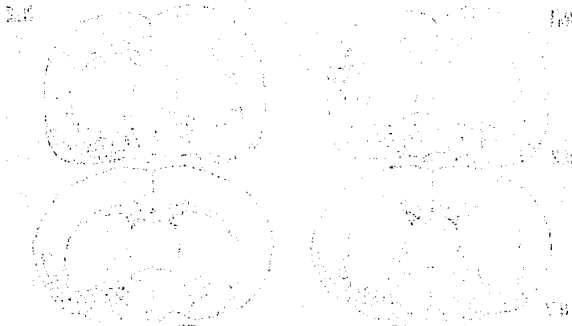
**Fig. 15. Esquemas de cortes coroneales a diferentes niveles de anteroposterioridad desde 6.2 a 9.2, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA para dos animales del *Grupo Falso Operado*; los cuales presentan distribución similar. La localización de las neuronas se representa en cada esquema con ✕:1-5 neuronas, ■:6-10 neuronas, ●:11-20 neuronas, □:21-30 neuronas, ▲:31-40 neuronas y ⊗:más neuronas. Las líneas discontinuas representan fibras marcadas (⊗)**

FALSO OPERADO

No.1

No.2





**Fig. 16.** Fotomicrografías del **Grupo Falso Operado** a nivel rostral de la comisura anterior (AP 9.2).

En **A**, se observa ligera marca en la **Ca** (↑) del lado derecho y células en **FStr** y **PV**. (16X).

En **B** y **C**, **Ca** lado izquierdo y derecho respectivamente.

Observese ligera marca alrededor de la comisura en **C** (↑).

Cortes coronales de 40 μm, contrateñidos con safranina al 0.01%.



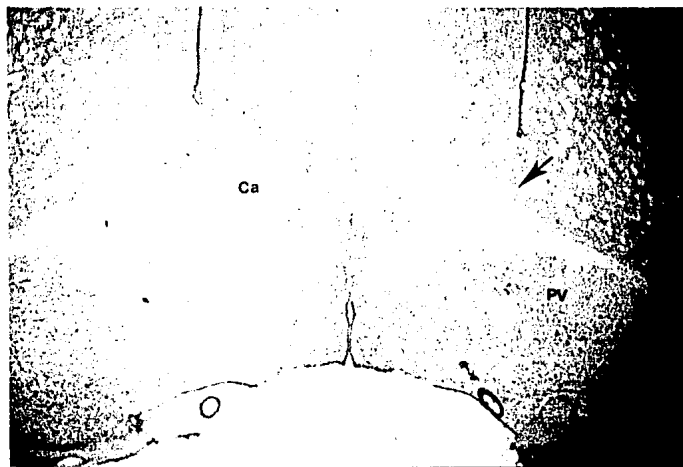
**A****B****C**

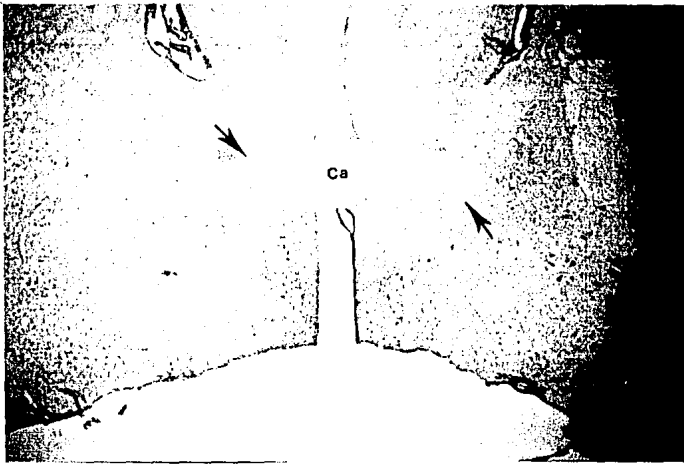
Fig. 17. Fotomicrografías del *Grupo Falso Operado* a nivel caudal de la comisura anterior (AP 8.7).

En **A**, se observa marca ligera alrededor de la Ca (↑) (16X).

En **B** y **C**, observese marca ligera en ambos extremos de la Ca (↑) (100X).

Cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$ , contrateñidos con safranina al 0.01%.

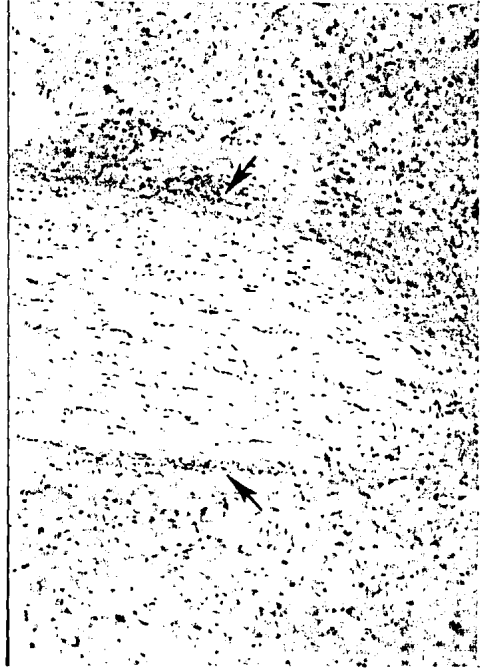
**A**



**B**



**C**



# **KINDLING**

Las neuronas marcadas con HRP-WGA en este grupo experimental se encontraron, al igual que en el grupo control, en las siguientes regiones: corteza olfatoria primaria (CzOp), estría terminalis (st), núcleos talámicos, globo pálido (GP), fundus striatis (FStr). También en ambos lados ipsilateral y contralateral al sitio de inyección en los núcleos amigdalinos, corteza frontoparietal (FrPa) y corteza insular agranular (CzIA). Sin embargo, se observa que existe un aumento en el número de las neuronas marcadas en la región contralateral al sitio de inyección en los núcleos amigdalinos (Fig. 18).

Además en este grupo se observó un incremento en la densidad del marcaje en las fibras comisurales.

A nivel rostral (AP 9.2) se encontró un aumento en la densidad de la marca a lo largo de las fibras comisurales de ambos lados ipsilateral y contralateral al sitio de inyección como se muestra en la figura 19.

A nivel caudal (AP 8.7) de las fibras comisurales se presentó marca de HRP-WGA, a lo largo de la parte superior de ésta, así como en las fibras de la estría terminalis y comisura posterior del lado ipsilateral y contralateral al sitio de inyección (Fig.20).



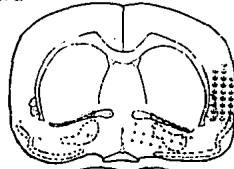
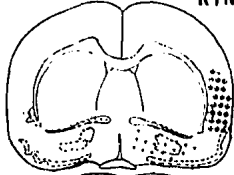
18. El presente capítulo muestra los resultados de los estudios de autoradiografía realizados en los  
 animales de la serie Kindling, los cuales presentan la misma distribución de las neuronas y  
 fibras positivas a la HRP-WGA. En cada esquema se muestra la distribución de las neuronas y  
 fibras marcadas en cada nivel de corte coronal. La localización de las neuronas se representa en  
 cada esquema con los siguientes símbolos: ☆: 1-5 neuronas, ■: 6-10 neuronas, ●: 11-20  
 neuronas, □: 21-30 neuronas, ▲: 31-40 neuronas y ⊗: más neuronas. Las líneas discontinuas  
 representan fibras marcadas.

**Fig. 18. Esquemas de cortes coronales a diferentes niveles de anteroposterioridad desde 6.2 hasta 9.2, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras positivas a la HRP-WGA para dos animales del Grupo Kindling, los cuales presentan la misma distribución. La localización de las neuronas se representa en cada esquema con ☆: 1-5 neuronas, ■: 6-10 neuronas, ●: 11-20 neuronas, □: 21-30 neuronas, ▲: 31-40 neuronas y ⊗: más neuronas. Las líneas discontinuas representan fibras marcadas (±).**

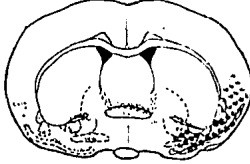
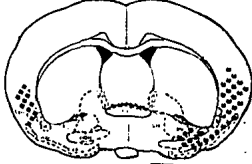
# KINDLING

No.1

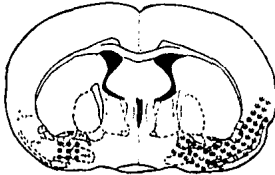
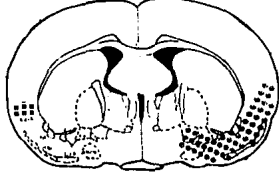
No.2



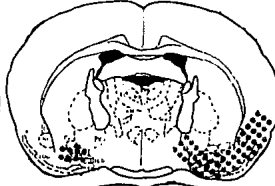
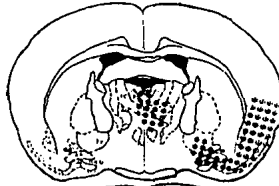
9.2



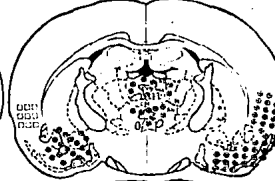
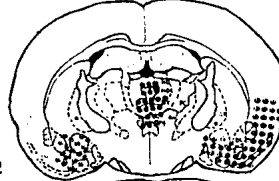
8.7



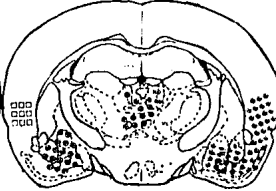
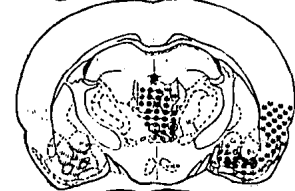
8.2



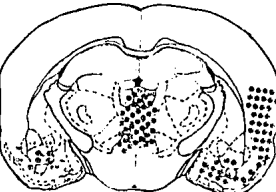
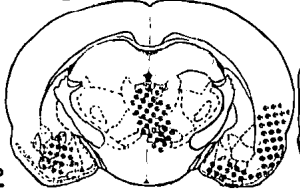
7.7



7.2



6.7



6.2

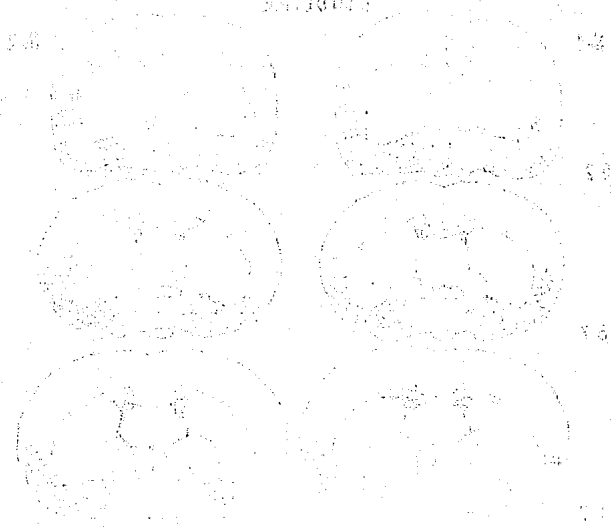
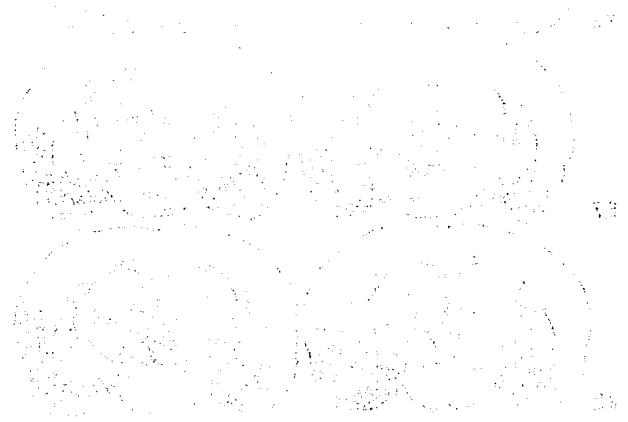
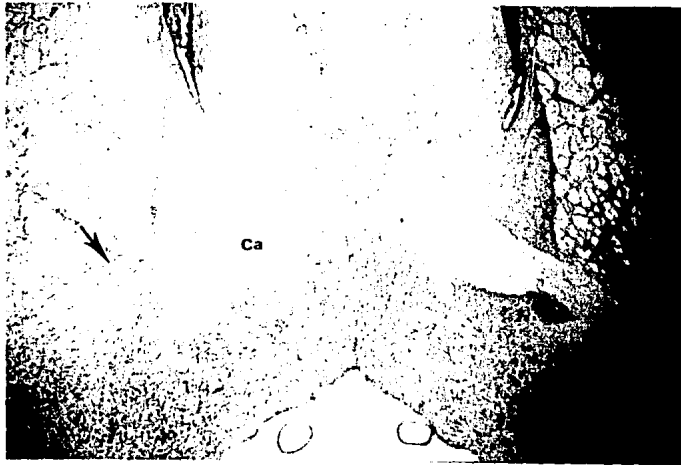


Fig. 19. Fotomicrografías del *Grupo Kindling* a nivel rostral de la comisura anterior (AP 9.2). En **A**, se muestran ambos lados de las fibras comisurales marcadas con HRP-WGA (↑), (16X).

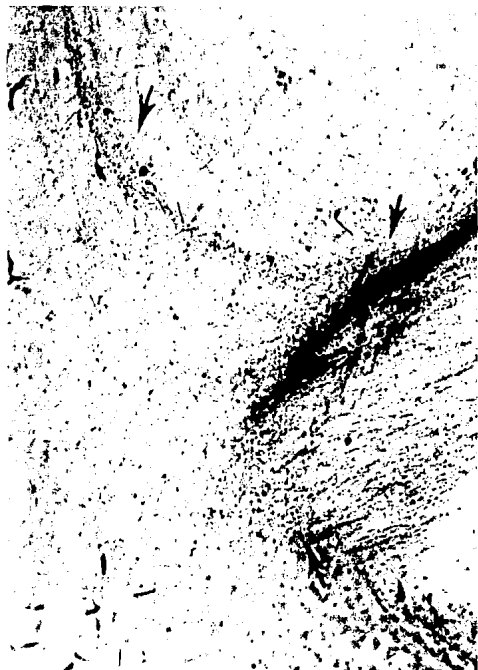
Como se puede observar en **B** y **C**, la marca es muy densa en ambos lados a lo largo de las fibras comisurales (↑) (100X).

Cortes coronales de 40 μm, contrateñidos con safranina al 0.01%.



**A****B****C**

**Fig. 20. Fotomicrografías del *Grupo Kindling* a nivel caudal de la comisura anterior (AP 8.7). En A se muestra la Ca densamente marcada con HRP-WGA, así como las fibras de la stría terminalis (St) de ambos lados (16X). En B y C, se observan las fibras (↑) de St (100X). Cortes coronales de 40 μm, contrateñidos con safranina al 0.01%.**

**A****B****C**

En la figura 22 se muestran, en forma resumida, los resultados obtenidos sobre la marca detectada a nivel rostral y caudal de las fibras comisurales anteriores, en cada uno de los grupos estudiados: control, falso operado y kindling. Se observa que existe un incremento en la densidad del marcaje en las fibras comisurales en el grupo kindling.

**CONTROL**

**FALSO OPERADO**

**KINDLING**

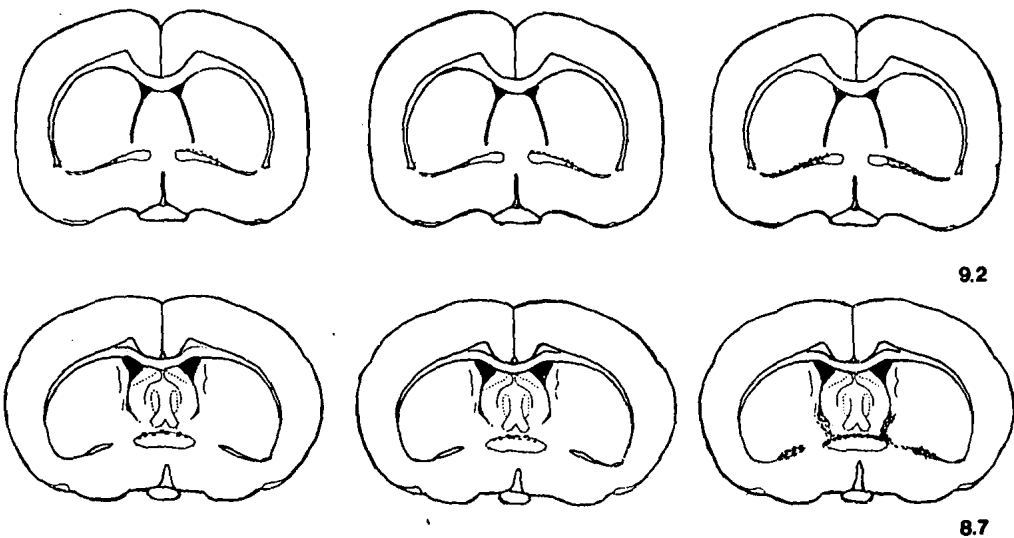


Fig.21. Esquemas de cortes coronales a nivel rostral (9.2) y caudal (8.7) de las fibras comisurales donde se muestra el transporte axonal de la HRP-WGA en los tres grupos experimentales. (Paxinos y Watson, 1982).

# **CAPITULO VII**



## DISCUSION

Una de las ventajas que hace favorable al "kindling" como un modelo experimental de epilepsia, es el de poder estudiar su evolución, su instalación y su permanencia en los fenómenos electrofisiológicos, conductuales y bioquímicos (Vindrola y col., 1981; Cain, 1989; Talavera y col., 1989; Cain y col., 1990; Kamphuis y col., 1990; During y col., 1992; Hernández y Condés, 1992).

En este trabajo se utilizó el kindling eléctrico amigdalino para evaluar los cambios conductuales y electroencefalográficos durante su evolución e instalación al aplicar estímulos de baja intensidad determinados a partir del umbral a la posdescarga que fué entre los 70 y 150  $\mu$ A. La intensidad del estímulo varió para cada uno de los animales experimentales; sin embargo, todos llegaron a desarrollar el fenómeno del kindling al presentar inicialmente posdescargas de corta duración, la cual aumentó durante el desarrollo del kindling ( Figs. 6 ), así como la frecuencia de las espigas de la posdescarga como se muestra en la figura 9; propagándose a otras regiones del cerebro hasta generalizar la actividad epiléptica.

Asi mismo, estos cambios en la duración y la frecuencia de la posdescarga estuvieron acompañados de cambios conductuales durante el desarrollo del kindling como lo describe Racine, 1972b y Joy, 1985 ( Tabla 4 ). Al considerar que cada estadio conductual tiene como componente todos los estadios anteriores hasta culminar en crisis convulsivas generalizadas. Sin embargo, una característica muy notoria, a la cual no se hace énfasis en estas clasificaciones, y nosotros observamos durante la instalación del kindling, fue que después de haber presentado más de 3 crisis convulsivas generalizadas los animales entraron a un período de tónico total músculo esquelético, el cual se manifestó mediante un clonus de patas posteriores.

El número de estímulos requeridos para producir la primera crisis convulsiva generalizada varió para cada uno de los animales experimentales, esto pudo explicarse al verificar los sitios de implantación del electrodo en los animales estimulados ( Fig. 8 ); Se observó que se estimuló el complejo amigdalino, pero no sólo un núcleo en particular, sino diferentes núcleos de este complejo, en algunos de los cuales se desarrolla más rápido el fenómeno del kindling que en otros (Le Gal y La Salle, 1981). Por lo cual, se decidió uniformar el grupo experimental, se tomó en cuenta como criterio diez o más crisis convulsivas generalizadas a partir de la primera.

Con respecto a los tiempos de sobrevivencia utilizados después de haber inyectado el complejo HRP-WGA, se puede decir lo siguiente. En este trabajo de tesis, se mostraron los resultados de los grupos experimentales con un tiempo de sobrevivencia de 48 horas. Ya que en este tiempo se detectó la sensibilidad máxima del transporte axonal del trazador HRP-WGA hacia el lado contralateral al sitio de inyección, lo cual no se observó en los grupos de 12 y 24 horas ya que estos únicamente presentaron marcaje del trazador en distancias más pequeñas, como fué únicamente del lado ipsilateral al sitio de inyección. Lo cual nos indica que el tiempo de sobrevivencia 48 horas es el ideal para que haya paso del trazador hacia el lado contralateral al sitio de inyección.

Los sitios de inyección también fueron verificados. Tomando en cuenta únicamente los animales experimentales en los cuales se localizó el centro del sitio de inyección en el núcleo basolateral amigdalino AP 6.2 (Fig. 11), que es en donde este núcleo alcanza su máxima dimensión.

En resumen, se puede decir que la técnica histoquímica de la peroxidasa de rábano conjugada a la aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), empleada para el

marcaje de la vía neuronal de interés que ha sido utilizada en este trabajo de tesis, al igual que en otros estudios neuroanatómicos, no es sólo una herramienta para el estudio de las conexiones de neuronas y fibras entre sitios distantes, sino también es útil para el estudio de la actividad neuronal ( Nishino y col.,1979; Broadwell y col.,1979; Litchy, 1973). De esta manera nuestros resultados muestran, que en el grupo experimental kindling existe un incremento en el transporte axonal del trazador a nivel de las fibras comisurales (Figs. 19 y 20). Así mismo existe un aumento en el número de neuronas marcadas en la región contralateral al sitio de inyección en los núcleos amigdalinos ( Fig. 18), lo cual no se observó en los grupos control (Figs. 12, 13 y 14) y falso operado ( Figs. 15,16 y 17).

## CONCLUSION

El Kindling es un buen modelo experimental de epilepsia.

Se corroboró que los núcleos amigdalinos están interconectados entre sí, ya que el producto de reacción de la HRP-WGA se encontró en neuronas del lado contralateral al sitio de inyección de dicho complejo, así como en las fibras que pasan por la comisura anterior e interconectan estos núcleos, lo que hace posible su medición.

Los resultados señalan que el grupo epileptizado presenta un incremento en el transporte axonal; medido como un aumento en la cantidad de fibras que muestran el trazador y la localización de cuerpos neuronales en puntos más distantes al sitio de inyección, al compararse con los grupos control y falso operado que manifiestan menor marcaje. Este hecho sugiere que el incremento en la actividad neuronal, producida por el fenómeno kindling, se correlaciona con un incremento en la captura y transporte axonal del trazador HRP-WGA.

Este trabajo, deja un campo de investigación abierto para seguir explorando dicho proceso.

# **CAPITULO VIII**

## **ANEXOS**

### ***ANEXO I***

#### ***INYECCION DEL COMPLEJO HRP-WGA***

##### **Material:**

Jeringa Hamilton de 1 microlitro

electrodos de vidrio con un diámetro en la punta de 10 micras

lacre ó cera dental (dental sticks)

mechero

jeringa con cánula

estereotáxico

torre micrométrica

material de cirugía

##### ***Reactivos:***

Nugol

Sol. de azul de pontamina

Sol. de peroxidasa de rábano conjugada con aglutinina de germen

de trigo al 10% SIGMA No. de Cat. L.7017

##### ***Electrodos:***

1) Se preparan electrodos de vidrio los cuales deberán tener una punta de 1 cm de

largo como mínimo y una punta de 10 a 20 micras de diámetro.

- 2) Colocar tanto en la jeringa como en el electrodo el nugol necesario.
- 3) Sellar con lacre, cuidando de que no queden burbujas y que el sellado sea perfecto.
- 4) Colocar la jeringa en la torre.

*Método:*

- 1) Calibrar el electrodo en "cero"
- 2) Colocar a la rata y checar de nuevo el cero estereotáxico
- 3) Hacer un trépano, de acuerdo a las coordenadas para el núcleo basolateral amigdalino señaladas en el atlas de Paxinos y Watson.
- 4) Tomar 10 nanolitros de azul de pontamina
- 5) Tomar 100 nanolitros de nugol
- 6) Cortar meninges
- 7) Tomar de 10 a 20 nanolitros de peroxidasa
- 8) Colocar el electrodo en el núcleo basolateral amigdalino
- 9) Inyectar la peroxidasa
- 10) Esperar unos segundos
- 11) Sacar electrodo
- 12) Sellar con cera de hueso el cráneo
- 13) Coser y vigilar que la rata permanezca en buen estado en el período post-operatorio.

*Características de la peroxidasa:*

Lectin from *triticum vulgare* (Wheat germe) Peroxidase Labeled

SIGMA. No. L-7017.

*Preparación:*

Peroxidasa al 10%. La sustancia se disuelve en el frasco que la contiene en 10 microlitros de solución salina.

Posteriormente se preparan alícuotas de 2 microlitros y se guardan en congelación.

**ANEXO II**

*PERFUSION:*

Se lleva a cabo por vía intracardiaca y se utilizan las siguientes soluciones:

- a) Ringer pH 7.2 a 37 °C
- b) Fijadora pH 7.2 - 7.4, a 4 °C
- c) Sacarosa al 10% en buffer fosfatos pH 7.4, a 4 °C

*Preparación Sol. Ringer:*

Se prepara inicialmente una solución stock concentrada, de la cual para cada experimento se toma una alícuota que se diluye.



### **Solución Stock**

NaCl..... 90 gr

KCl..... 4.2 gr

CaCl<sub>2</sub> ..... 2.4 gr

agua destilada hasta completar 1000 ml.

### **Solución Ringer para perfundir (300 ml/rata)**

Sol. Stock..... 100 ml

Agua destilada..... 900 ml

NaHCO<sub>3</sub> ..... 0.15 gr

Checar el pH 7.2 - 7.4 y calentar a 40 °C (perfundir a 37 °C). Adicionar 1 ml de anticoagulante Heparth sol. inyectable 5000 U.I./ml.

### **Solución Fijadora (400 ml/rata)**

Para preparar esta solución se necesita buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.2.

PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>Na H<sub>2</sub>O ..... 5.38 gr/lt

PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> Na anhídrido ..... 8.66 gr/lt

Medir el pH, éste normalmente es de 6.8 y hay que llevarlo a 7.2 con NaOH al 10%.

Con este buffer se prepara una solución al 5% de paraformaldehído. Esta se calienta hasta 60 °C en agitación constante, para disolver el paraformaldehído (no debe de pasar de dicha temperatura). Inmediatamente después, se enfría la solución en agua corriente y se filtra. Para cada 400 ml de la solución fijadora es necesario preparar 40 ml de esta solución.

### **Solución Fijadora**

buffer fosfatos..... 327 ml

Sol. de paraformaldehído (filtrada)..... 40 ml

glutaraldehído al 25%..... 33.3 ml

Para la perfusión se utilizan 300 ml, los 100 ml restantes se utilizan para la post-fijación.

### **Solución de lavado (300 ml/rata)**

Es una solución de sacarosa al 10% en buffer fosfatos, de esta solución se utilizan en la perfusión 250 ml. Los otros 50 ml restantes se ocupan para la incubación posterior a la post-fijación (25 gr. de sacarosa Merck ó J.T Baker en 250 ml de buffer).

Después de perfundida la rata, se obtiene el cerebro y se coloca en 100 ml de sol. fijadora durante 24 hrs, posteriormente se cambia a la solución de sacarosa al 10% .

### ***ANEXO III***

Para llevar a cabo la reacción enzimática es necesario tener un stock de los siguientes reactivos y materiales:

**Buffer Acetatos 0.2M, pH 3.3**

Preparar 100 ml de A y 50 ml de B

A) Sol. 0.2 M de ac. acético

B) Sol. de acetato de sodio 0.2 M 16.40 gr de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  en 1000 ml.

Para 100 ml de buffer:

Tomar 46.3 de A y 3.7 de B, medir el pH y llevarlo a 3.3 con ácido acético diluído.

**Agua oxigenada al 0.3 %**

Tomar 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (Merck) y aforar a 100 ml de agua destilada. Preparar en el momento.

***ANEXO IV***

**Portaobjetos Gelatinados**

Preparación de la sol. de gelatina:

Gelatina 1.25 g

Alúmina de cromo 0.125 g

Agua bidestilada 250 ml

Disolver la gelatina (60 °C), agregar el alúmina y filtrar

## **Gelatinización de Portaobjetos**

- lavar las láminas con ác. nítrico 5 a 10 min
- lavar con agua corriente
- dos baños con alcohol 95 °C
- colocar las láminas en un porta láminas
- sumergirlas en un recipiente con agua destilada
- escurrir bien
- meterlas en la sol. de gelatina durante 3 min
- escurrirlas y ponerlas a secar durante una noche a 40 °C
- guardarlas a temperatura ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

Adams R J: Organelle movement in axons depends on ATP. *Nature*. 297:327-329,1982.

Bajorek J G, Lee R J, Lomax P: Neuropeptides: Anticonvulsant and Convulsant Mechanisms in Epileptic Model Systems and in Humans. In A.V. Delgado-Escueta, A.A. Ward Jr. D.M. Woodbury, and R.J Porter (eds.), *Advances in Neurology*, Raven Press, New York. 489-500,1986.

Bohme G A, Stutzman J M, Doblea A, Blanchard J C: " Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J. Pharmacol.* 199: 379-381, 1991.

Brady S T, Lasek R J, Nerve specific enolase and creatine phosphokinase in axonal transport: soluble proteins and the axoplasmic matrix. *Cell*. 23:515-523, 1981.

Brailowsky S, Silva-Barrat C, Naquet R: Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*. 12:53-62, 1989.

Bray J J, Mills R G: Transport complexes associated with slow axonal flow. *Neurochemical Research*. 16:645-649,1991.

Broadwell R D, Brightman M W: Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein in vivo. *J. Comp. Neurol.* 185:31-74,1979.

Burnham W M: Primary and "transfer" seizure development in the kindled rat. In: Kindling (J.A. Wada, ed.) Raven Press, New York. 61-83,1976.

Burton P R, Paige J L: Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3269-3273,1981.

Cain D P: Excitatory neurotransmitters in Kindling: excitatory amino acid, cholinergic and opiate mechanisms. *Neurosci. Behav. Rev.* 13:269-276,1989.

Cain D P, Boon F, Corcoran M E: Involvement of multiple opiate receptors in opioid Kindling. *Brain Research*. 517:236-244,1990.

Cain D P, Corcoran M E: Kindling in the seizure-prone and seizure-resistant mongolian gerbil. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 49:360-365,1980.

- Cain D P, Corcoran M E: Kindling with low-frequency stimulation: Generality transfer and recruiting effects. *Exp. Neurol.* 73:219-232, 1981.
- Ceccarelli B, Hurlbut W P, Mauro A: Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.* 57:499-524, 1973.
- Cooke C T, Cameron P U, Jones D G: Stimulation-induced uptake of horseradish peroxidase by rat cortical synapses. *Neurosci. Lett.* 1:15-18, 1975.
- Delgado J M R, Sevillano M: Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroenceph. clin. Neurophys.* 13:722-733, 1961.
- De Olmos J, Alheid G F, Beltramino C A: Amygdala. The Rat Nervous System 1 (G. Paxinos, ed.) Academic Press, Australia. 223-317, 1985.
- Divac I, Petrovic-Minic B, Mogensen J: Focal cortical seizures prevent HRP-WGA labeling only in neurons bidirectionally connected to the cortex. *Brain Research*, 311: 189-193, 1984.
- Dolivo M, Meurant C, Verdan C I: The retrograde axonal flow depends on neuronal activity. *Experimentia.* 33:778, 1977.
- During M J, Craig J S, Hernández, Anderson G M, Gallager D W: Effect of amygdala Kindling on the in vivo release of GABA and 5-TH in the dorsal raphe nucleus in freely moving rats. *Brain Research.* 584:36-44, 1992.
- Enerback L, Kristensson K, Olsson T: Cytophotometric quantification of retrograde axonal transport of a fluorescent tracer (primuline) in mouse facial neurons. *Brain Research.* 186:21-32, 1980.
- Fink B R, Byers M R, Middaugh M E: Dynamics of colchicine effects on rapid axonal transport and axonal morphology. *Brain Research.* 56:299-311, 1973.
- Goddard G V, McIntyre D C, Leech C K: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25:295-330, 1969.
- Gonatas N K, Harper C, Mizutani T, Gonatas J O: Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *J. Histochem. Cytochem.* 27:728-734, 1979.
- Grafstein B, Forman D S: Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* 60:1167-1183, 1980.

Hamilton L W: Basic Limbic System Anatomy of the Rat. New York and London: Plenum, 1976.

Heideman S R, Landers J M, Hamburg M A: Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 91:661-665,1981.

Hernández R J, Condés L M: Brain Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and kindled rats. *Brain Research.* 593:239-244,1992.

Heuser J E, Reese T S: Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.* 57:315-344,1973.

Hoffman P N, Lasek R J: The slow component of axonal transport: identification of major structural polypeptides and their generality among mammalian neurons. *J. Cell. Biol.* 66:351-366, 1975.

Holtzman E, Teichberg S, Abrahams S J, Citkowitz E, Crain S M, Kawai N, Peterson E R: Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla. *J. Histochem. Cytochem.* 21:349-385,1973.

Hovorka J, Langmeier P, Mares: Morphological changes of the presynaptic and postsynaptic element in excitatory synapses during Kindling. *Physiol. Res.* 41:351-357,1992.

Jonec V, Wasterlain G C: Effect of inhibitors of protein synthesis on the development of kindled seizures in rats. *Exp. Neurol.* 66:524-532,1979.

Joy R M: The effects of neurotoxicants on Kindling and Kindled seizures. *Fundamental and Applied Toxicology.* 5:41-65, 1985.

Kalichman M W: Neurochemical correlates of the kindling model of epilepsy, *Neurosci. Behav. Rev.* 6:165-181,1982.

Kamphuis W, Huisman E, Dreijer A M, Ghijsen W E, Verhage M, Lopes da Silva F H: Kindling increases the K<sup>(+)</sup>-evoked Ca<sup>2</sup> (+)-dependent release of endogenous GABA in area CA1 of rat hippocampus. *Brain Research.* 511:63-70,1990.

Karlsson J O: Proteins of axonal transport: interaction of rapidly transported proteins with lectins. *J. Neurochem.* 32:491-494,1979.

Karlsson J O, Sjostrand J: The effect of colchicine on the axonal transport of protein in the optic nerve and tract of the rabbit. *Brain Research.* 13:617-619,1969.

- Kelley A E, Domesick V B, Nauta W J H: The amygdalostriatal projection in the rat an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience*. 7:615-630, 1982.
- Langmeier M, Fisher J, Mares J: Number of synaptic vesicles in the rat somatosensory cortex after repetitive electrical stimulation prolonging self-sustained after-discharges. *Epilepsia*. 21:255-260,1980.
- Langmeier M, Fischer J, Mares J: Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained after discharge during Kindling. *Epilepsia*. 24:616-627,1983.
- Le Gal, La Salle: Amigdaloid Kindling in the rat: regional differences and general properties. In: Kindling (J.A.Wada,ed.) Raven Press, New York. 31-47,1981.
- Leech C K, McIntyre D C: Kindling rates in inbred mice: Ananalogy to learning?. *Behav. Biol.* 16:439-452, 1976.
- Leonard C M, Scott J W: Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. *J. Comp. Neurol.* 141:313-330, 1971.
- Litchy W J: Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase of frog sartorius nerve in vitro. *Brain Research*. 56:377-381,1973.
- Mesulam M: Tracing Neuronal Connections with Horseradish Peroxidase. John Wiley & Sons, New York, 1982.
- Morrell F; Morrell L T: Kindling as a model of neural plasticity. In: Kindling 3 (J. A. Wada, ed.) Raven Press, New York. 17-35,1983.
- Morrell F T N, Tsuru T J, Hoepfner T J, Morgan D, Harrison W H: Secondary epileptogenesis in frog forebrain: Effect of inhibition of protein synthesis. In: Kindling (J. A. Wada, ed.) Raven Press, New York. 41-60, 1979.
- Morrell F T N, Tsuru N: Kindling in the frog: Development of spontaneous epileptiform activity. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 40:1-11, 1976.
- Nennesmo I, Kristensson K: Somatopetal axonal transport of fluorescent lectins: distribution pattern and cytophotometric quantification in mouse peripheral neurons. *Neurosci. Lett.* 27:243-248, 1982
- Nishino H, Ono T, Sasaki K, Nishino A, Muramoto K: Retrograde transport of horseradish peroxidase in sciatic nerve of rats and dystrophy mice. *Neurosci. Lett.*



14:1-6,1979.

Nitecka L, Amerski L, Narkiewicz O: Interamygdaloid connections in the rat studied by the horseradish peroxidase method. *Neurosci. Lett.* 26:1-4, 1981.

Ottersen, O P: Connections of the amygdala of the rat. IV: corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. 205: 30-48, 1982.

Paulson J C, McClure W O: Microtubules and axoplasmic transport. *Brain Research.* 73:333-337,1974.

Paxinos G, Watson C H: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Sydney. 1982.

Racine R J: Modification of seizure activity by electrical stimulation-I. After-discharge threshold. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 32:269-279, 1972a.

Racine R J: Modification of seizure activity by electrical stimulation-II Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 32:281-294, 1972b.

Racine R J: Kindling: The first decade. *Neurosurgery.* 3:234-252, 1980.

Racine R J, Burnham W M, Gartner J G, Levitan D: Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: Strain and interstimulation interval effects. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 35:553-556, 1973.

Racine R, Kairiss E, Smith G: Kindling mechanisms: The evolution of the burst response versus enhancement. In: Kindling 2 (J. A. Wada, ed.) Raven Press, New York. 15-37,1981.

Ralston H J III: Analysis of neuronal networks: a review of techniques for labeling axonal projections. *J. Elec. Microsc. Tech.* 15:322-331, 1990.

Rial R V, González J: Kindling effect in the reptilian brain: Motor and electrographic manifestations. *Epilepsia.* 19:581-589, 1978.

Siggins G R, Henriksen S J, Chavkin C H and Gruol D: Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system: Cellular mechanisms. In A.V. Delgado-Escueta, A.A. Ward Jr, D.M Woodbury, and R.J. Porter (eds.), Advances in Neurology, Raven Press, New York. 501-512,1986.

Stach R, Lazarova M B, Kacz D: Kindles seizures from rabbits amygdala: An electroencephalographic and behavioral study. *Acta Neurobiol. Exp.* 38:227-232, 1978.

Stevens C F: Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell.* 72: 55-63, 1993.

Talavera E, Omaña Z I, Asai M, Condés L M: Regional brain IR-Met, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. *Brain Research.* 485:141-148, 1989.

Teichberg S, Holtzman E, Crain S M, Peterson E R: Circulation and turnover of synaptic vesicle membrane in cultured fetal mammalian spinal cord neurons. *J. Cell. Biol.* 67:215-230, 1975.

Vallee R B, Bloom G S: Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:59-92, 1991.

Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández A: Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 21:39-43, 1981.

Wada J A: The clinical relevance of Kindling: Species, brain sites and seizure susceptibility. In: Limbic Mechanisms (K. E. Livingston and O. Hornykewicz, eds.) Plenum, New York. pp.369-388, 1978.

Wada J A, Osawa T: Spontaneous recurrent seizure state induced by daily electric amygdaloid stimulation in Senegalese baboons (*papio papio*). *Neurology.* 26:273-286, 1976.

Wada J A, Sato M, Corcoran M E: Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia.* 15:465-478, 1974.

Wuaquier A, Ashton D, Melis W: Behavioral analysis os amygdaloid kindling in beagle dogs and the effects of clonazepam, diazapam, phenobarbital, diphenylhydantoin and flunarizine on seizure manifestation. *Exp. Neurol.* 64:579-586, 1979.