

03068

5

2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO  
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA  
Campus UNAM-UAQ**

**DETERMINACION DEL TRANSPORTE AXONAL EN LAS FIBRAS COMISURALES  
AMIGDALINAS, DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MA. GUADALUPE MARTINEZ LORENZANA**

Director  
Dr. Miguel Condés y Lara

Juriquilla, Querétaro, Qro.

1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

257411



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neurofisiología y en el Laboratorio de Histología de la División de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría, y en el Laboratorio de Epilepsia y Dolor del Centro de Neurobiología, Campus Juriquilla UNAM-UAQ; bajo la Dirección del Dr. Miguel Condés y Lara.

Durante su realización se contó con el apoyo de los proyectos: CONACyT 0660P-M9506 y 3458P-M9607; DGAPA-IN202196 y IMP-3220.

Durante los estudios de Maestría y la realización de esta tesis, se contó con el apoyo de las becas de CONACyT y DGAPA.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Jurado por sus comentarios y sugerencias:

Dra. Martha León Olea

Dra. Esther Talavera Cuevas

Dr. Raúl Paredes Guerrero

Dr. Jorge Larriva Sahd

Dr. Miguel Condés y Lara

A la Dra. Esther Talavera Cuevas y al Dr. Miguel Condés-Lara, por su amistad y ayuda brindada; además de su confianza y paciencia que han tenido conmigo durante todo este tiempo.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo:

A los Doc Martha, Francisco y Miguel, Marce, Sheila, Esther, Ariel, Edy-Edy...

A mis cuates del UNIVERSUM:

Liz, Caro, Vicky, Elsa, Susana I, Susana II, Eyra, Norma, Sergio, Alex, Jorge, Toño y Armando.

A la memoria de mi padre Fausto Martínez

A mi madre Esther Lorenzana

A mis Hermanos: Carmen, Esther, Silvia, Fausto y Araceli

Por su cariño, confianza y apoyo en todas mis decisiones.

A mi esposo Marco

Por su ayuda, comprensión y cariño en todo el tiempo que hemos compartido.

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
Amígdala.....	9
Interconexiones.....	11
Planteamiento de Problema.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivos Generales.....	17
Objetivos Específicos.....	18
Material y Método.....	19
grupos experimentales.....	19
implantación del electrodo.....	20
estimulación amigdalina.....	21
inyección del complejo HRP-WGA.....	22
fijación y obtención del cerebro.....	23
cortes histológicos del cerebro.....	23
reacción histoquímica.....	24
contratinción.....	24
análisis histológicos.....	25
análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
desarrollo del kindling.....	26
análisis histológico.....	26
comisura anterior y estría terminalis.....	31
amígdala.....	39
corteza del cíngulo.....	43
Discusión.....	47
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	55

## RESUMEN

Un proceso experimental en el que la excitabilidad neuronal se encuentra aumentada es durante la epilepsia producida por la estimulación eléctrica repetida, subconvulsiva de baja intensidad, en algunas áreas cerebrales principalmente límbicas, este proceso se denomina kindling.

Se ha observado que este proceso requiere tanto de síntesis de proteínas como del transporte axonal para que se desarrolle un foco epiléptico secundario. Siendo éste un paso fundamental en la propagación y la generalización de la actividad epiléptica, es decir para su desarrollo.

En este trabajo se analizó si la hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza a la epilepsia, producida por el kindling amigdalino, incrementa la velocidad del transporte axonal, valorada a través de un trazador neuronal como es la peroxidasa de rábano conjugada con la lectina aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), en las fibras comisurales amigdalinas y en otras estructuras cerebrales; durante el desarrollo del kindling.

El estudio se realizó con ratas Wistar de 280 a 310 g de peso distribuidas en siete grupos: 1) Control: ratas que no recibieron ningún tratamiento; 2) Falso Operado: ratas implantadas con un electrodo en amígdala izquierda, pero que no fueron estimuladas; Grupos experimentales: ratas implantadas con un electrodo en la amígdala y fueron estimuladas hasta producir la fase conductual deseada: 3) ratas en Fase 1: cierre de ojo ipsilateral, olfateo, masticación; 4) ratas en Fase 2-3: balanceo de la cabeza y clonus de las extremidades anteriores; 5) ratas en Fase 4: levantamiento sobre las patas posteriores; 6) ratas en Fase 5: levantamiento y caídas; 7) ratas con 10 CCG: los animales presentaron al menos diez crisis convulsivas generalizadas (CCG). Todos estos cambios conductuales fueron correlacionados con la actividad electroencefalográfica de la amígdala estimulada; además, se cuantificó tanto la duración como la frecuencia de las posdescargas. Todos los animales se inyectaron con HRP-WGA al 10% (15 nl) en el núcleo amigdalino basolateral derecho, contralateral al núcleo estimulado (izquierdo) y se les dió un tiempo de sobrevivencia de 48 hrs. Se realizaron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  y se analizaron en el microscopio óptico y mediante un sistema de análisis de imágenes.

Los resultados señalan que existe un incremento en el transporte axonal, valorado como un aumento en la densidad de fibras que presentaron el trazador y en el número de neuronas localizadas en puntos más distantes al sitio de inyección, estos resultados tienen estrecha relación con la evolución del kindling eléctrico amigdalino. Los resultados de este trabajo se discuten con base en que el aumento en la actividad neuronal, producida por el fenómeno kindling, se correlaciona con un incremento en la captura y el transporte del complejo HRP-WGA. Además, estos cambios en la

velocidad se relaciona con un aumento en la excitabilidad celular, juzgada a partir del incremento en la frecuencia y la duración de las posdescargas. Todo ello sugiere un cambio en los procesos metabólicos celulares que culminan con una exacerbación de la actividad celular y se acompaña de las crisis convulsivas generalizadas. Estos resultados podrían formar parte de los cambios en la concentración de neurotransmisores como resultado del proceso de epileptización.

## INTRODUCCION

La epilepsia es un desorden del sistema nervioso que se caracteriza por la hipersincronía anormal de la actividad neuronal (Aird et al, 1984). Se ha propuesto, que este desorden puede ser debido a alteraciones en los mecanismos excitadores e inhibidores de la neurotransmisión neuronal; ya sea por una disminución en el componente inhibitorio o por un aumento en el excitatorio o una combinación de ambos (Jackson, 1889).

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, que presenten características semejantes a las observadas en la epilepsia en humanos. Uno de estos modelos es el denominado "kindling" o encendido. Goddard et al (1969) introdujeron este término, para indicar el desarrollo progresivo de los cambios conductuales y electroencefalográficos (EEG) que culminan en crisis convulsivas generalizadas (CCG), en respuesta a la aplicación repetida de estímulos eléctricos, inicialmente subconvulsivos, en sitios específicos del cerebro.

El modelo del kindling ofrece varias ventajas sobre otros modelos de epilepsia experimental. Algunas de las ventajas del kindling son las siguientes: no se utilizan sustancias químicas extrañas al organismo; el sitio anatómico del lugar que se estimula puede ser elegido, dependiendo del objetivo del experimento; la naturaleza del estímulo permite establecer diferentes 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 forma gradual y progresiva, de manera que refleje los cambios que se observan en el hombre. Estas características hacen del kindling un modelo altamente reproducible, permitiendo una gran variedad de estrategias experimentales durante el curso de la epileptogénesis (Goddard et al,1969). Otra ventaja que ofrece el kindling como modelo experimental de epilepsia es la de poder estudiar su evolución, su instalación y su permanencia en los fenómenos electrofisiológicos, conductuales y bioquímicos (Vindrola et al,1981; Cain,1989; Talavera et al,1989; Cain et al,1990; Kamphius et al,1990; During et al,1992; Hernández y Condés-Lara,1989 y 1992; Rocha, 1995).

Existe una vasta literatura que sugiere que durante el kindling eléctrico se producen modificaciones en las concentraciones de diferentes neurotransmisores así como en distintas etapas de la neurotransmisión, como lo son: la biosíntesis, la liberación, la degradación y la unión a receptores postsinápticos (Kalichman,1982; Bajorek et al,1986; Siggins,1986; McNamara et al, 1987; Kamphius et al, 1991). Sin embargo, un aspecto poco estudiado es el del transporte axonal, el cual podría también estar implicado en las alteraciones en las concentraciones de neurotransmisores que se han encontrado como consecuencia del proceso de epileptización.

Entre los trabajos que demuestran cambios metabólicos neuronales que ocurren concomitantemente con el desarrollo y con la instalación de la actividad epiléptica: está el estudio realizado por Talavera et al, (1989) en el cual se muestran incrementos en la concentración de Met y Leu-encefalinas en diferentes áreas cerebrales. También, se han descrito las alteraciones en la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa dependiente de la serotonina y de la noradrenalina tanto en tejido neuronal como glial (Hernández y Condés-Lara, 1989 y 1992). Por otro lado, se ha demostrado también que la actividad epiléptica produce un aumento en la expresión del gen c-fos (White y

Price, 1993; McNamara, 1995; Hosford et al, 1995). Estos cambios en el contenido de neurotransmisores cerebrales, no son los únicos que se han descrito como consecuencia de la epilepsia experimental, pero ponen de manifiesto la importancia del sistema de transporte axonal, que es el responsable de proveer a las terminales sinápticas de todos los elementos necesarios para que se efectúe la neurotransmisión y en esta situación se podrían explicar en parte los incrementos en las concentraciones de diferentes neurotransmisores como resultado de la epilepsia experimental.

## ANTECEDENTES

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 et al,1973; Cooke et al,1975; Dolivo et al,1977; Holtman et al,1973; Heuser y Reese,1973; Teichberg et al,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 influye en la recaptura (Cooke et al, 1975; Turner, 1977) y el transporte ( Litchy, 1973; Teichberg et al, 1975) de dicha sustancia. Esto indica la existencia de una interacción dinámica entre la actividad de la neurona, la cantidad de endocitosis y el transporte axonal de HRP (Broadwell et al,1979; Nishino et al,1979).

En este sentido, existen evidencias que sugieren que la hiperactividad neuronal producida por el kindling eléctrico involucra procesos de endocitosis, exocitosis y los mecanismos relacionados con el transporte axonal. Langmeier et al, (1980) realizaron un estudio en el cual estimularon eléctricamente la corteza cerebral somatosensorial y examinaron por medio de microscopía electrónica la región homotópica contralateral. Estos autores encontraron un incremento significativo del número de vesículas sinápticas, diez minutos después de la estimulación en los animales experimentales. Estos mismos autores (1983) llevaron a cabo otro estudio de microscopía electrónica en el que cuantificaron el número de sinapsis y de vesículas en la corteza sensorial motora, en ratas a las que se les produjo una posdescarga automantenida durante el kindling. Estos autores observaron un incremento en el porcentaje de las sinapsis con

signos de excitosis, de 0.7% (en controles) a 11.4% (en ratas kindling), así como como un incremento en las sinapsis con endocitosis, de 2.8 a 7.1%.

Por otro lado, Morrell y Morrell (1983) demostraron la importancia del transporte axonal en el paso de la información transináptica, para formar un foco epiléptico secundario, a través de la comisura cerebral en la *Rana catesbeiana*. Estos autores utilizaron una combinación de técnicas que distinguen entre el tráfico de potenciales de acción y el transporte axonal, al aplicar por un lado colchicina, la cual suprime el transporte axonal, pero mantiene la transmisión eléctrica intacta, y por otro lado, bloqueando los potenciales de acción con lidocaína sin modificar el transporte axonal. En animales tratados con lidocaína se desarrolló un foco epiléptico secundario, mientras que en los tratados con colchicina, el foco no se desarrolló. Estos resultados sugieren que el kindling requiere tanto de una síntesis de proteínas como del transporte axonal para que se desarrolle un foco epiléptico secundario. Siendo éste un paso fundamental en la propagación y generalización de la actividad epiléptica, es decir en su desarrollo.

También se ha establecido que cuando se aplican inhibidores de la síntesis proteínica como cicloheximida, en la rata y en la *Rana catesbeiana*, así como anisomicina, en la rata y el ratón, hay una supresión del kindling. Esto sugiere que el kindling requiere de una síntesis proteínica activa, la cual es importante para la realización de muchos eventos neuronales (Morell et al, 1975; Jonec y Wasterlain, 1979; Cain et al, 1980).

Además, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los cambios que se producen debido a la hiperexcitabilidad neuronal como consecuencia del kindling están asociados a un incremento en el transporte axonal (Martínez-Lorenzana G, 1994). En

este estudio se analizó el transporte axonal del trazador peroxidasa de rábano conjugada a la lectina de germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales amigdalinas en ratas íntegras y epileptizadas. Nuestros resultados mostraron que el grupo epileptizado (ratas que presentaron diez crisis convulsivas generalizadas) presentó un incremento en la velocidad del transporte axonal; medido como un aumento en la densidad de fibras comisurales que muestran el trazador a un tiempo similar (48 h), al ser comparado con los grupos control y falso operado. Estos resultados sugieren 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. No obstante, no tenemos información sobre el proceso de propagación, es decir, si los cambios en el transporte empiezan desde las primeras etapas del kindling o una vez que ya ha sido establecido.

En otro trabajo, Engel et al, (1978) mostraron, mediante la técnica de autoradiografía de <sup>14</sup>C-2-deoxiglucosa, un incremento en la captura de glucosa en diferentes estructuras cerebrales, durante las diferentes fases del kindling amigdalino en ratas. Estos resultados indican la participación de diferentes sistemas anatómicos en la generación de las crisis epilépticas. Así mismo, los trabajos sobre la síntesis de proteínas (Morell et al, 1975; Jonec y Wasterlain, 1979; Cain et al, 1980) aunados a nuestros resultados sobre el incremento en el transporte axonal señalan que ambos procesos son fundamentales para el establecimiento del kindling.

## 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 el sistema estriatal, así como con algunas regiones del tálamo e hipotálamo (De Olmos et al, 1985). 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 et al, 1985); así como en procesos de codificación sensorial como es el caso de estímulos nociceptivos ( Bernard et al, 1992; Guilbaud et al, 1994).

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

OLFATORIO: este grupo está formado por el área amígdala 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 substancia 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 estria 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 particular, el núcleo basolateral (BL) ya que interconecta ambos complejos amigdalinos y a la corteza prefrontal medial (Krettek y Price, 1977; Niteka et al, 1981; Ottersen, 1982; McDonald, 1991a); éste 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 La orientadas medialmente, adoptando una forma de media luna antes de alcanzar su terminal caudal (Paxinos, 1982; De Olmos et al, 1985).

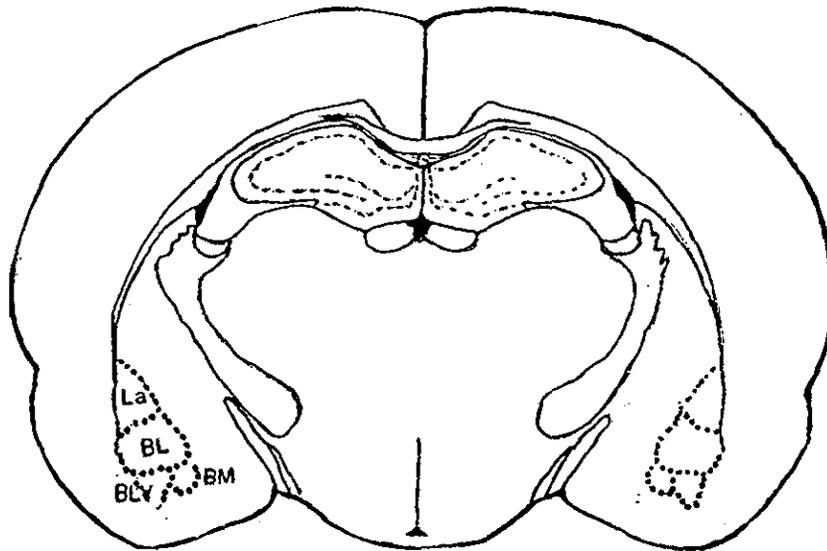


Fig. 1. Localización esquemática del complejo basolateral amigdalino a nivel de anteroposterioridad (AP 6.2 mm, línea interaural). Núcleos: lateral (La), basolateral (BL), basolateral ventral (BLV) y basomedial (BM). Paxinos y Watson (1982)

## 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 estría terminalis y la vía conocida como amigdalofuga (Leonard y Scott, 1971; Hamilton, 1976).

La vía amigdalofuga, es un sistema difuso que se caracteriza por la participación de fibras que se originan en una gran extensión de los núcleos basolateral, basomedial y medial (Leonard y Scott, 1971).

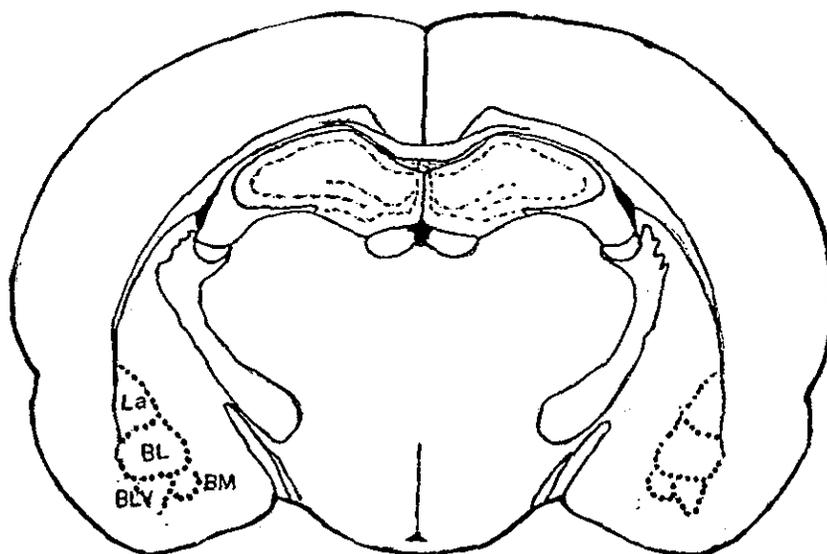


Fig. 1. Localización esquemática del complejo basolateral amigdalino a nivel de anteroposterioridad (AP 6.2 mm, línea interaural). Núcleos: lateral (La), basolateral (BL), basolateral ventral (BLV) y basomedial (BM). Paxinos y Watson (1982)

## 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 estría terminalis y la vía conocida como amigdalofuga (Leonard y Scott, 1971; Hamilton, 1976).

La vía amigdalofuga, es un sistema difuso que se caracteriza por la participación de fibras que se originan en una gran extensión de los núcleos basolateral, basomedial y medial (Leonard y Scott, 1971).

Estudios neuroanatómicos han demostrado que las fibras de la estría terminalis se originan de los complejos basolateral y corticomedial. Además, la estría terminalis ha sido dividida en tres componentes: el supracomisural, comisural y postcomisural (Leonard y Scott, 1971).

En este trabajo se estudia, el componente comisural, ya que las fibras eferentes provenientes del núcleo basolateral y corticomedial cursan por la estría terminalis que ascienden por la parte medial de la cola del núcleo caudado, ocupan después el surco tálamo-estriado y descienden hacia la comisura anterior por la cual gran parte de ellas pasan al hemisferio opuesto para seguir un trayecto inverso, hasta alcanzar el complejo amigdalino y otras estructuras (Leonard y Scott, 1971; Hamilton, 1976; Krettek y Price, 1977; Kelley et al, 1982; McDonald, 1991).

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

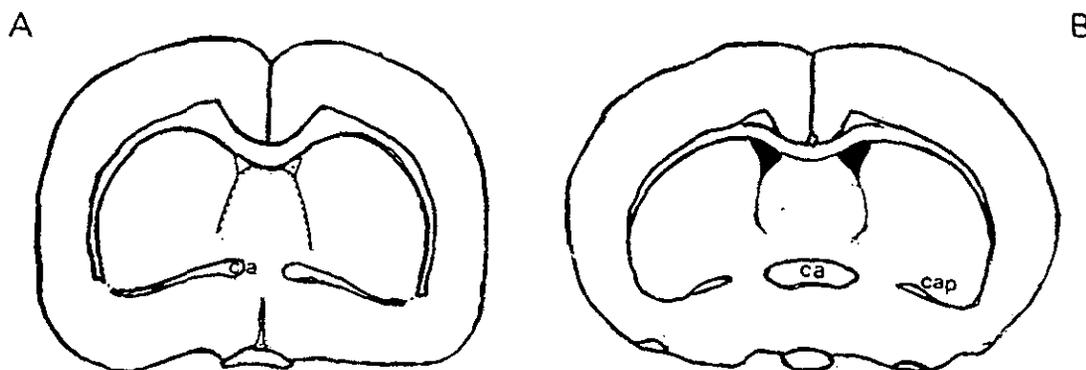


Fig. 2. Esquemas representativos de la localización de la comisura anterior. A) Comisura a nivel rostral (AP 9.2 mm, línea interaural), donde se observa únicamente la división anterior. B) Comisura a nivel caudal (AP 8.7 mm, línea interaural), donde se observan ambas divisiones anterior y posterior. 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, al bulbo accesorio olfatorio y a la corteza prepiriforme. Además, cabe mencionar que algunas fibras de la estría terminalis originadas en la amígdala también atraviesan por la comisura anterior (De Olmos et al, 1985). La división posterior conecta el área de la neocorteza temporal de cada lado (De Olmos et al, 1985).

Los estudios neuroanatómicos del sistema nervioso han avanzado 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 y retrógrado, se pueden localizar los axones y las terminales nerviosas de cuerpos celulares específicos, como es el caso mediante el trazado autorradiográfico de proteínas, después de haber administrado aminoácidos o azúcares (precursores de glicoproteínas) marcados radioactivamente, por ejemplo prolina y leucina tritiada. Así 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 et al, 1980; Nennesmo y Kristensson, 1982; Mesulam, 1982).

La HRP es una glicohemoproteína, con un peso molecular de 40,000 daltons 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 et al, 1979). La WGA se liga a sitios específicos de la membrana como son los residuos ácidos N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-neuramínico, los cuales son ubicuos en las membranas neuronales (Karlsson, 1979; Gonatas et al, 1979), así el complejo HRP-WGA entra a la neurona a través del proceso de endocitosis y al ser captada se transporta en dirección retrógrada, anterógrada, por las colaterales y de manera transganglionar.

La detección histoquímica de la HRP, se utiliza como una técnica neuroanatómica en el trazado de vías neuronales en el sistema nervioso central (Divac et al, 1984; Ottersen, 1982). Con esta técnica se puede localizar el cuerpo celular de una neurona en una cierta estructura nerviosa, así como las conexiones neuronales entre una estructura y otra.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

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 y velocidad del transporte axonal. Además, es necesario el transporte axonal de ciertas moléculas para que se produzca el paso de información transináptica para obtener un foco epiléptico secundario (Morrell y Morrell, 1983). Siendo éste un suceso esencial en la propagación y generalización de la actividad epiléptica. También se ha demostrado, mediante la técnica de autorradiografía de la 2-deoxiglucosa, la participación de diferentes estructuras cerebrales en las crisis parciales (fase 1 y 2) y en las crisis generalizadas (fase 3,4 y 5) ( Engel et al. 1978).

Sin embargo, no hay estudios que muestren la existencia de cambios en la velocidad del transporte axonal en cada una de las fases conductuales características del kindling. El kindling amigdalino presenta una evolución característica en sus fases y esto permite el estudio gradual de la propagación e instalación del fenómeno epiléptico desde el punto de vista conductual y electroencefalográfico. Es por esta razón que se decidió estudiar el transporte axonal utilizando el trazador HRP-WGA, durante la evolución de la epilepsia experimental producida por este modelo.

## HIPOTESIS

La epilepsia experimental producida por el kindling implica cambios en la excitabilidad neuronal y una hiperactividad sincrónica que lleva a las crisis convulsivas generalizadas (CCG), con cambios concomitantes en las concentraciones de neurotransmisores; así como, un incremento en el transporte axonal observado en animales con 10 CCG, tomando en cuenta todos estos cambios que ocurren asumimos que la velocidad en el transporte axonal, durante las diferentes fases del kindling (fase 1, 2-3, 4 y 5), podría incrementarse de manera progresiva como resultado de la propagación y generalización de la actividad epiléptica.

## OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este trabajo son determinar la velocidad del transporte axonal del trazador peroxidasa de rábano conjugado con la lectina aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), en las fibras comisurales amigdalinas; así como cuantificar el número de neuronas marcadas en la amígdala izquierda y en ambos lados de la corteza del cíngulo, en ratas sometidas a la estimulación eléctrica en el núcleo basolateral amigdalino, en las diferentes fases conductuales durante el desarrollo del kindling. El kindling amigdalino presenta etapas conductuales características que se manifiestan de una manera gradual y progresiva (fase 1-5) lo cual aunado a la valoración de la actividad eléctrica nos permite el estudio de la evolución del fenómeno epiléptico.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Producir el kindling eléctrico amigdalino, hasta obtener la fase conductual deseada.
  
- Efectuar la técnica histoquímica de la HRP-WGA, en los grupos:
  - a) Control
  - b) Falso Operado
  - c) Experimentales: fase 1
    - fase 2-3
    - fase 4
    - fase 5
    - 10 CCG
  
- Análisis histológicos del tejido en estudio, por medio de microscopía óptica y mediante digitalización de imágenes:
  
- Realización de fotomontajes en campo oscuro a nivel de la comisura anterior para efectuar una comparación cualitativa del marcaje encontrado en esta región y en los núcleos de la cama de la estría terminalis, en los diferentes grupos.
  
- Análisis cuantitativo del número de neuronas marcadas con HRP-WGA en amígdala izquierda y corteza del cíngulo ipsi y contralateral, en los distintos grupos, mediante un análisis de imágenes.

## MATERIAL Y METODO

### Animales experimentales

Se utilizaron 34 ratas macho de la cepa Wistar de 280 a 310 g de peso, las cuales fueron mantenidas en condiciones de temperatura y luz controladas ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con 12 horas de iluminación comenzando a las 6:00 hrs), con agua y alimento *ad libitum*.

El kindling amigdalino presenta una evolución gradual, en la cual se muestran patrones conductuales característicos que se han clasificado en: Fase 1: cierre de ojo ipsilateral, olfateo, masticación; Fase 2: balanceo de la cabeza; Fase 3: clonus de las extremidades anteriores; Fase 4: levantamiento sobre las patas posteriores y Fase 5: levantamiento y caídas (Racine, 1972). Es importante mencionar que las fases conductuales son aditivas, es decir, cada fase presenta todas las anteriores.

### Grupos experimentales

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

- 1) *Grupo Control (n=5)*: ratas que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) *Grupo Falso Operado (n=5)*: animales implantados con un electrodo en amígdala izquierda, pero que no fueron estimuladas.

*Grupos Experimentales:* ratas a las que se les implantó un electrodo en la amígdala izquierda y fueron estimuladas hasta producir la fase conductual deseada:

3) Fase 1 (n=4): cierre de ojo ipsilateral, olfateo, masticación.

4) Fase 2-3 (n=5): balanceo de la cabeza y clonus de las extremidades anteriores.

5) Fase 4 (n=5): levantamiento sobre las patas posteriores.

6) Fase 5 (n=5): levantamiento y caídas.

7) 10 CCG (n=5): animales que presentaron diez crisis convulsivas generalizadas

### **Implantación del electrodo**

Las intervenciones quirúrgicas para la implantación del electrodo de estimulación y de registro se llevaron a cabo en animales anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso, vía i.p. Una vez anestesiada la rata se colocó en el aparato estereotáxico y se le implantó en amígdala izquierda un electrodo bipolar trenzado. Se utilizaron las coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson, 1982) (anterior 6.2 mm; lateral 5 mm; altura 1.5 mm, línea interaural) 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 et al, 1989; Hernández y Condés-Lara, 1989 y 1992). Los electrodos y el conector se fijaron en el cráneo por medio del pegamento super bond y de acrílico dental. Una vez concluída la implantación, los

animales fueron sometidos a un período de recuperación post-quirúrgico de una semana.

### **Estimulación amigdalina**

Una vez terminado el período de recuperación se inició el kindling 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 fue entre 20 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 fue de 20  $\mu$ A, la cual fue incrementándose de 10 en 10  $\mu$ A, hasta producir una posdescarga breve de varios segundos constituida por 5 a 10 espigas de alto voltaje, acompañada por la conducta característica de cierre del ojo ipsilateral. La actividad neuronal fue 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 eléctrica, que puede provocar una posdescarga en la estructura cerebral estimulada y/o cambios conductuales que pueden ser: inmóvilidad, 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 (semana inglesa).

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 (1972).

### **Inyección del complejo HRP-WGA**

Las ratas de los grupos: control, falso operado y experimentales (fase 1, 2-3, 4, 5, y 10 CCG) fueron sometidas al mismo procedimiento de inyección.

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 por vía i.p. Una vez anestesiada la rata, se colocó en el aparato 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 a su vez en una torre micrométrica para estereotáxico. Se tomaron 10 nanolitros de azul de pontamina \* y 100 nanolitros de nugal\* antes de tomar los 15 nanolitros del complejo HRP-WGA, disuelta al 10% en solución salina estéril. La inyección se realizó en el núcleo amigdalino basolateral derecho, contralateral al sitio de estimulación, siguiendo las coordenadas estereotáxicas de Paxinos y Watson (1982) (anterior 6.2 mm, lateral derecho 5 mm; altura 1.5 mm interaural). Después de inyectar

\* Estas soluciones sirvieron como indicadores al momento de inyectar los 15 nanolitros de HRP-WGA.

los 15 nanolitros de HRP-WGA se esperó unos minutos y se sacó el electrodo, el trépano 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 48 h.

### **Fijación y obtención del cerebro**

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se fijaron por perfusión vía intracardíaca con 250 ml de solución Ringer (pH 7.2 a 37 °C), 250 ml de solución fijadora (paraformaldehído 5%, glutardialdehído 2.5% en buffer fosfatos 0.1M, pH 7.2) a 4 °C. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se colocaron en 50 ml de la solución fijadora durante 24 h 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 durante 48 h, para su crioprotección.

### **Cortes histológicos 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 en el sentido antero-posterior, recolectándose a partir de 13.20 mm (un corte cada 160 micras) hasta 3.7 mm y de ahí hasta 1.2 mm (un corte cada 240 micras). Los cortes se colocaron en buffer fosfatos (0.1 M, pH 7.2).

## Reacción histoquímica

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 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 0.2M (pH 3.3) y 100 mg de nitroprusiato de sodio (Merck).

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

Los cortes fueron lavados 3 veces durante un minuto (cada lavado) 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 oscuridad durante 20 min. Al término de este tiempo se prosiguió a realizar la reacción enzimática, se adicionaron 3 ml de  $H_2O_2$  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.

## Contratinción

Todos los cortes se contratiñeron con safranina al 0.1%, debido a que con esta

técnica se obtiene 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 contraindicación. Posteriormente, los cortes se deshidrataron ( alcohol al 70%, 95%, 100%, 100% y xilol) y se montaron con resina sintética.

### **Análisis histológico**

El análisis de los cortes se llevó a cabo por microscopía de luz fotónica. La distribución y número de neuronas marcadas con HRP-WGA, fueron semiautomáticamente determinadas usando un sistema de análisis de imágenes (Histoscan.S BIOCROM, Francia). A partir de los cortes se obtuvieron cartografías digitalizadas y se marcaron, en éstas, las regiones a analizar y las neuronas con HRP-WGA. El número total de neuronas marcadas fue contado automáticamente mediante el programa. Las regiones analizadas fueron la amígdala contralateral al sitio de inyección y la corteza del cíngulo ipsi y contralateral. Posteriormente se tomaron fotomicrografías en campo oscuro a nivel de las fibras comisurales, para cada uno de los grupos en estudio.

### **Análisis estadístico**

El número total de neuronas marcadas en cada una de las regiones analizadas, fue contado automáticamente mediante el programa. La diferencia estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba de análisis de varianza de un factor, seguida de una comparación múltiple entre los grupos mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.01 y 0.05.

## RESULTADOS

### Desarrollo del kindling

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 (1972). Esta expresión conductual, que acompaña a la actividad electroencefalográfica durante el desarrollo del kindling, se encuentra representada (con números romanos) en la figura 3. 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 llega a la crisis convulsiva generalizada (CCG). Estos resultados sobre el desarrollo del kindling, no difieren de los descritos en la literatura (Burnham, 1976) o de experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio, obteniendo así satisfactoriamente cada una de las fases características del kindling para el estudio del transporte axonal.

### Análisis histológico

La distribución de la HRP-WGA en el tejido nervioso se detectó mediante el producto de reacción, el cual se manifiesta por la presencia de gránulos café oscuros, que se encuentran en las fibras y dentro y fuera de los cuerpos neuronales. Este resultado se ilustra en la figura 4.

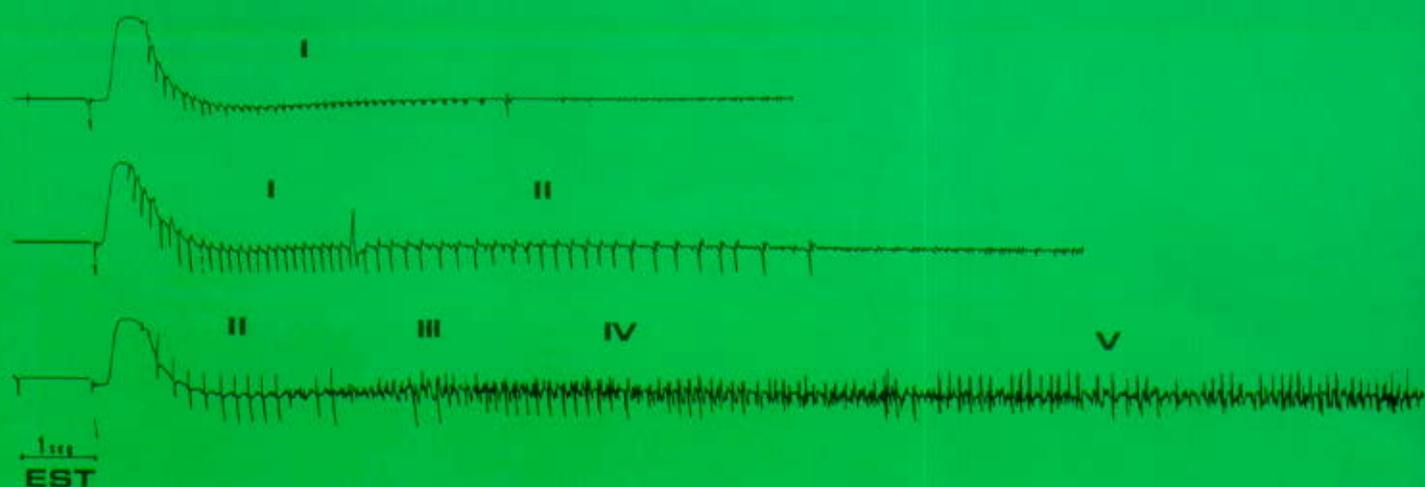


Fig. 3. Registro de la actividad eléctrica cerebral en una rata, inducida por la estimulación eléctrica en el núcleo basolateral amigdalino izquierdo, en el cual quedó establecido el fenómeno del kindling (fase V).

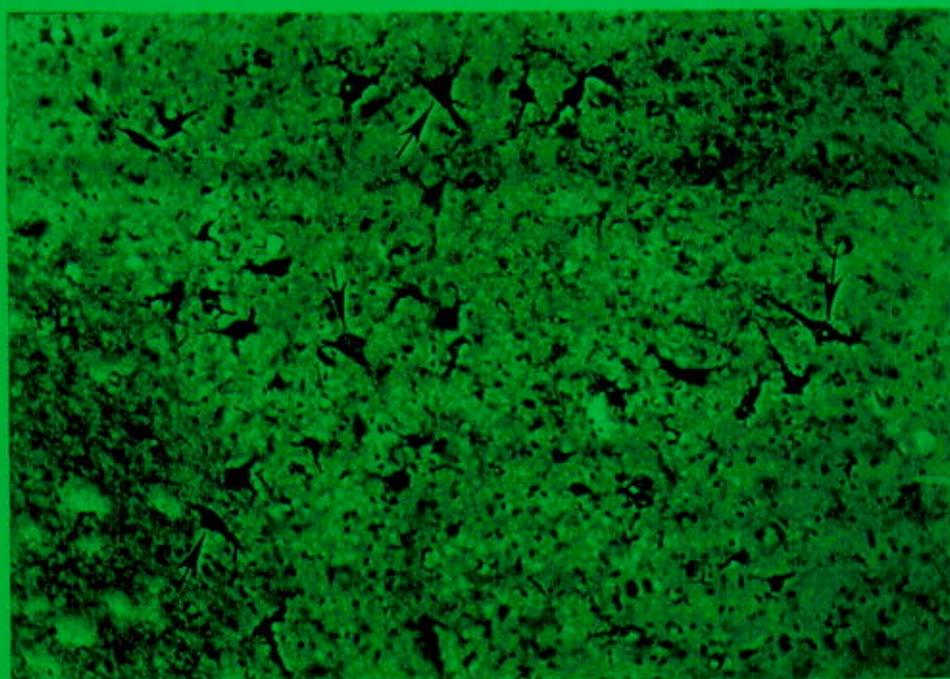


Fig. 4. Fotomicrografía que muestra el producto de la reacción de la HRP-WGA. Note los gránulos café oscuros presentes en los cuerpos neuronales (↑). Corte coronal de 40 μm, contrateñido con safranina al 0.1 % (250X).

Para cada grupo experimental, sólo se tomaron en cuenta los animales en los cuales se localizó el centro del sitio de inyección en el núcleo basolateral amigdalino (6.2 mm), como se observa en la figura 5. Nótese alrededor del sitio de inyección, un halo oscuro debido al transporte local de la HRP-WGA, en el complejo amigdalino. El número de animales que presentaron el sitio de inyección en el núcleo basolateral de la amígdala (AP 6.2 mm) fue de 4 para todos los grupos experimentales.

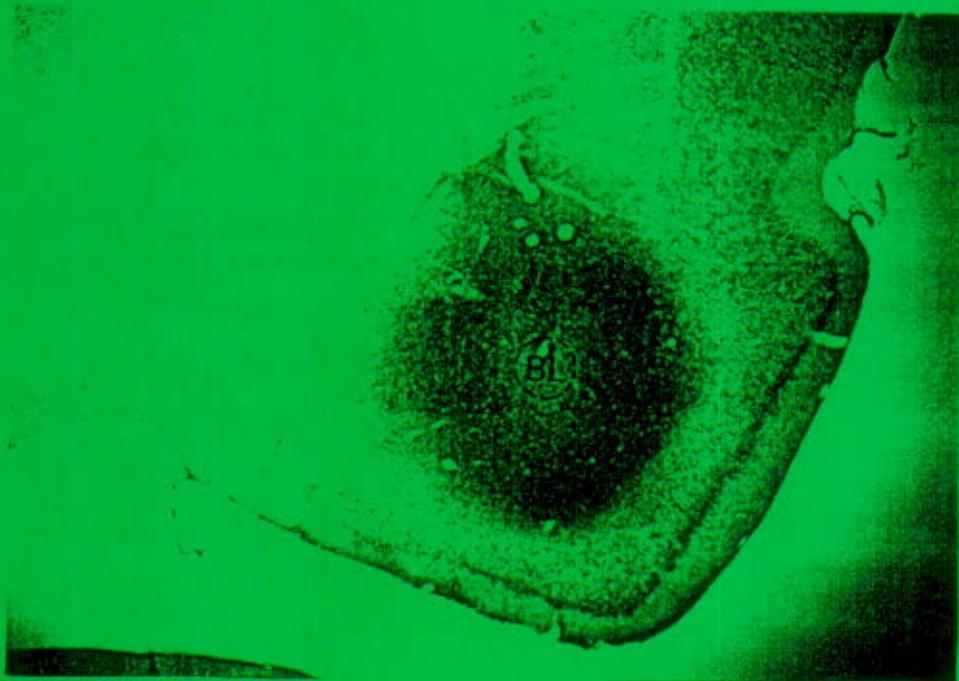
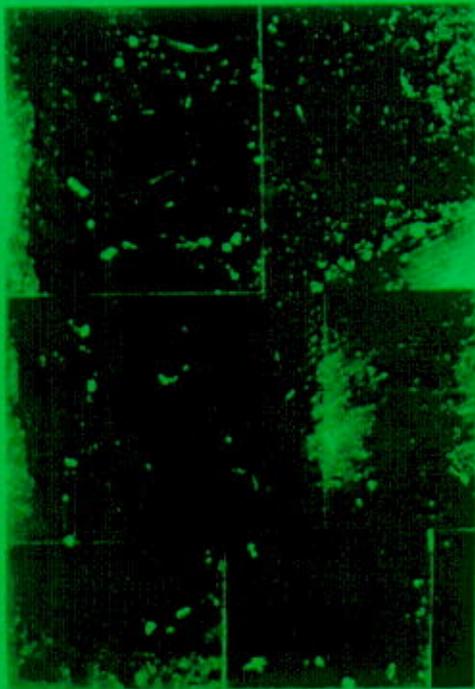


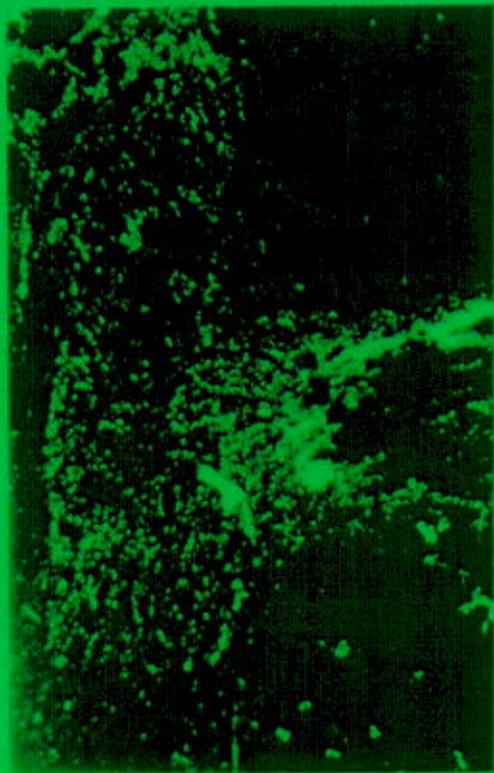
Fig. 5. Fotomicrografía del sitio de inyección de la HRP-WGA, en el núcleo basolateral amigdalino (BL). Corte coronal de 40  $\mu$ m, contrateñido con safranina al 0.1% (16X). Las líneas discontinuas encierran el sitio de inyección.

En este trabajo se presenta únicamente el conteo realizado mediante la digitalización de imágenes, de las neuronas marcadas con HRP-WGA en las regiones de la amígdala contralateral y de la corteza del cíngulo ipsi y contralateral. Así como la densidad de la marca de HRP-WGA en la comisura anterior (Ca) y en los núcleos de la cama de la estría terminalis (BST); tanto del lado ipsilateral como contralateral. Nos referimos a ipsilateral o contralateral, a las neuronas y fibras marcadas con HRP-WGA; con respecto al sitio de inyección, el cual se realizó en la amígdala derecha.

Los criterios tomados para indicar la densidad de marcaje presente en estas estructuras, para los grupos control, falso operado y cada una de las fases características del kindling, fueron los siguientes: leve, moderada y densa (fig. 6). También, se tomaron como referencia los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo en animales con 10 CCG; ya que en esta etapa se encontró un incremento del transporte axonal en ratas epileptizadas por kindling.



A



B



C

## COMISURA ANTERIOR Y ESTRIA TERMINALIS

A continuación se describen, los resultados obtenidos sobre la densidad de marca presente en las fibras comisurales amigdalinas y en estría terminalis a nivel de 9.2 mm y 8.7 mm; en los grupos controles y en las diferentes fases del kindling.

### CONTROL

En el grupo control a nivel rostral (9.2 mm) y caudal (8.7 mm) de las fibras comisurales, no se encontró marcaje de HRP-WGA. Sin embargo, en los núcleos de la cama de la estría terminalis tanto medial (BSTM) como lateral (BSTL); se encontró un marcaje leve, únicamente del lado ipsilateral ( figs. 7A y 8A).

### FALSO OPERADO

En este grupo, a nivel rostral de la comisura anterior, se observó un marcaje leve ipsilateralmente en ésta estructura y en BST(fig. 7B). Así mismo, a nivel caudal en BSTM y BSTL se encontró un marcaje leve del lado ipsilateral (fig. 8B). Además, a lo largo de la comisura (dorsalmente) hubo una marca leve de HRP-WGA.

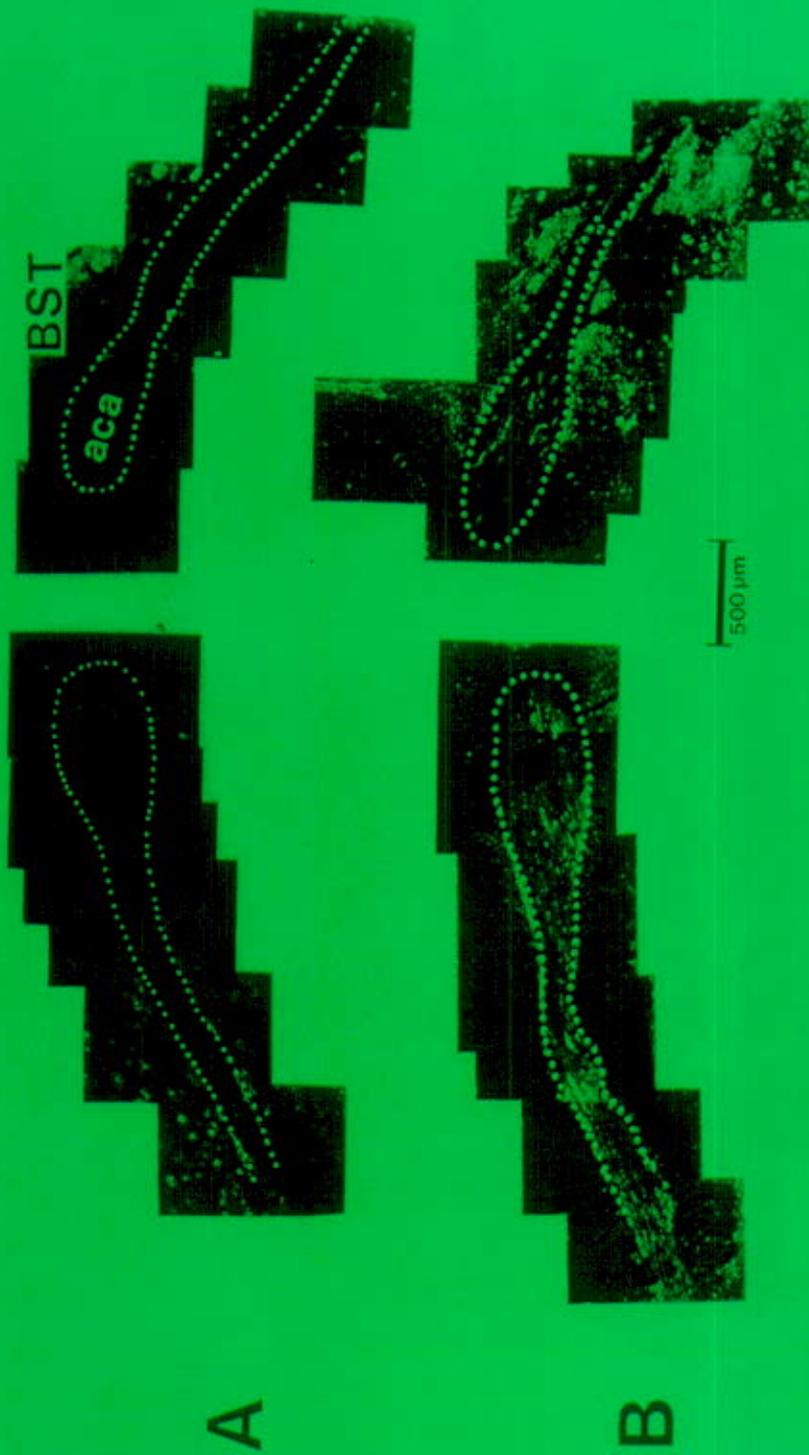


Fig. 7. Muestra los fotomontajes en campo oscuro a nivel rostral de la comisura anterior (9.2 mm), en la condición Control (A) y Falso Operado (B). Cortes coronales de 40  $\mu$ m (100X). aca= comisura anterior anterior, BST= núcleo de la estria terminalis.

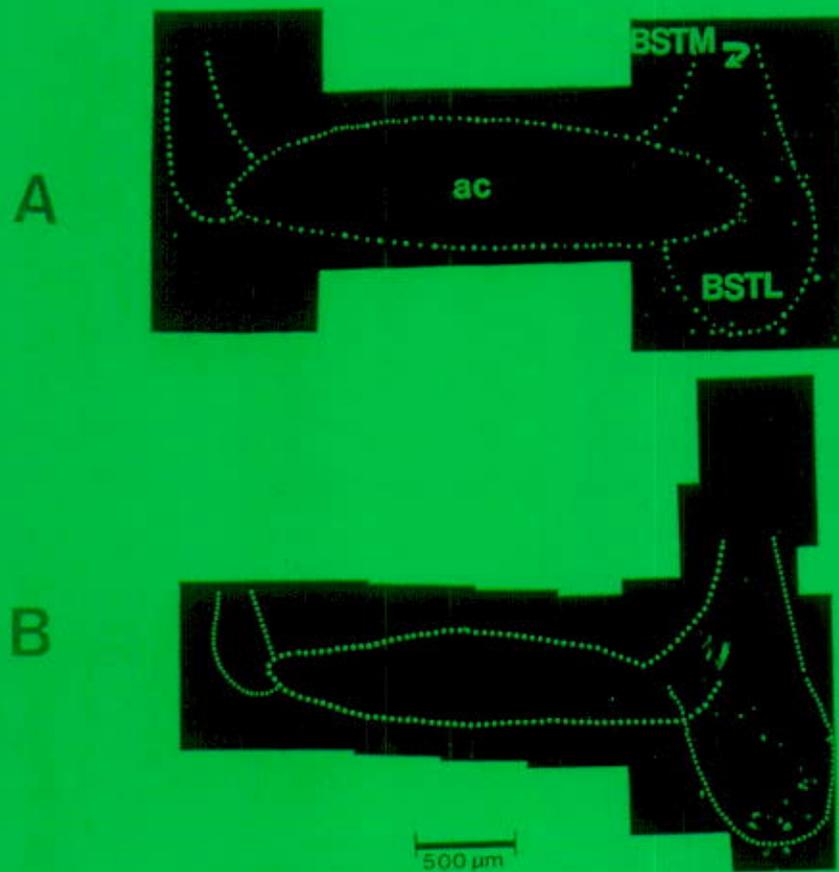


Fig. 8. Fotomontajes en campo oscuro a nivel caudal de la comisura anterior (8.7 mm), de los grupos Control (A) y Falso Operado (B). Cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  (100X). ac=comisura anterior, BSTM=núcleo medial y BSTL=núcleo lateral de la cama de la estria terminalis.

## **FASE 1**

En esta fase experimental no se presentó marcaje de HRP-WGA, a nivel rostral (9.2 mm) ni caudal (8.7 mm) de ambos lados (ipsi y contralateral) de la comisura anterior y estría terminalis (figs.9 y 10, respectivamente).

## **FASE 2-3**

Al igual que en la fase 1, en este grupo experimental no hubo presencia de HRP-WGA en las fibras comisurales amigdalinas a nivel rostral (fig. 9) y caudal (fig. 10). No obstante, en el núcleo medial y lateral de la estría terminalis, solamente del lado ipsilateral, se encontró un marcaje leve de HRP-WGA (fig. 10).

## **FASE 4**

La densidad de la marca de HRP-WGA en este grupo, fue la siguiente:

A nivel rostral (9.2 mm) se encontró un marcaje moderado, por arriba de las fibras comisurales en BST del lado ipsilateral, contralateralmente no se encontró marca. Además, en ambos lados de la comisura anterior se observó un marcaje leve de HRP-WGA en dicha estructura (fig. 9).

A nivel caudal (8.7 mm) de las fibras comisurales se presentó un marcaje leve a lo largo de la comisura (dorsalmente). En los núcleos medial (BSTM) y lateral (BSTL) de la estría terminalis, del lado ipsilateral y contralateral se encontró un marcaje denso y leve de HRP-WGA, respectivamente (fig.10).

## **FASE 5**

En 9.2 mm se presentó un marcaje denso a lo largo de las fibras comisurales del lado ipsilateral y contralateral al sitio de inyección. También, en BST se encontró un incremento de dicha densidad, siendo densa ipsilateralmente y moderada contralateralmente (fig. 9).

En 8.7 mm el marcaje se incrementó a lo largo de la comisura anterior (dorsal y ventralmente) y en los núcleos medial (BSTM) y lateral (BSTL) de la estría terminalis. Este marcaje fue denso del lado ipsilateral y moderado en el contralateral (fig. 10).

## **10 CCG**

En estos animales experimentales, se observó un incremento en la densidad del marcaje clasificado como denso en las fibras comisurales, a nivel rostral y caudal..

A nivel rostral 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 9.

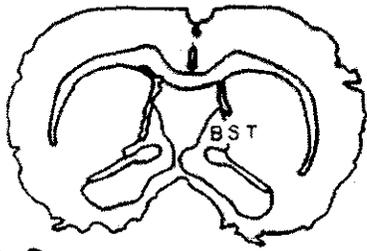
A nivel caudal de las fibras comisurales se presentó marca de HRP-WGA, a lo largo de la parte superior de ésta, así como en las fibras de la estría terminalis del lado ipsilateral y contralateral. Nótese como estas fibras se encuentran muy bien demarcadas en ambos lados y cómo ascienden para realizar interconexiones a diferentes estructuras cerebrales. También, se observa muy bien demarcado el núcleo BSTL del lado ipsilateral (fig.10).

En resumen, en los grupos experimentales se observó un incremento en el transporte axonal de HRP-WGA, en las fibras comisurales así como en los núcleos de la cama de la estría terminalis, en relación con el progreso de la epilepsia experimental por el kindling eléctrico amigdalino. Al comparar estos resultados con las condiciones control, se detectó que existe un incremento notable en el transporte axonal de HRP-WGA, a partir de la fase IV (ver tabla I).

**TABLA I.** Densidad de HRP-WGA, en la comisura anterior (rostral y caudal) y en los núcleos medial (BSTM) y lateral (BSTL) de la estría terminalis, en ambos lados ipsi y contralateral al sitio de inyección; en los diferentes grupos experimentales.

CONDICION EXPERIMENTAL (n=4)	COMISURA				ESTRIA TERMINALIS			
	ROSTRAL		CAUDAL		BSTM		BSTL	
	IPSI	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI	CONTRA
CONTROL	NO	NO	NO	NO	LEVE	NO	LEVE	NO
FALSO OPERADO	LEVE	NO	LEVE DORSAL		LEVE	NO	LEVE	NO
FASE 1	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
FASE 2-3	NO	NO	NO	NO	LEVE	NO	LEVE	NO
FASE 4	LEVE	LEVE	LEVE DORSAL		DENSO	LEVE	DENSO	LEVE
FASE 5	DENSO	DENSO	DENS O DORSAL Y VENTRAL		DENSO	MODERADO	DENSO	MODERADO
10 CCG	DENSO	DENSO	DENSO DORSAL		DENSO	MODERADO	DENSO	DENSO

Fig. 9. Fotomontajes en campo obscuro a nivel rostral de la comisura anterior (9.2 mm), de los diferentes grupos experimentales: fase 1, 2-3, 4, 5 (representados en números romanos) y 10CCG. Nótese cómo la densidad de la marca de HRP-WGA incrementa en la comisura anterior (Ca) así como en el núcleo de la estría terminalis (BST), a lo largo de la instalación del kindling eléctrico amigdalino. Cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  (100X).



9.2 mm

# FASE

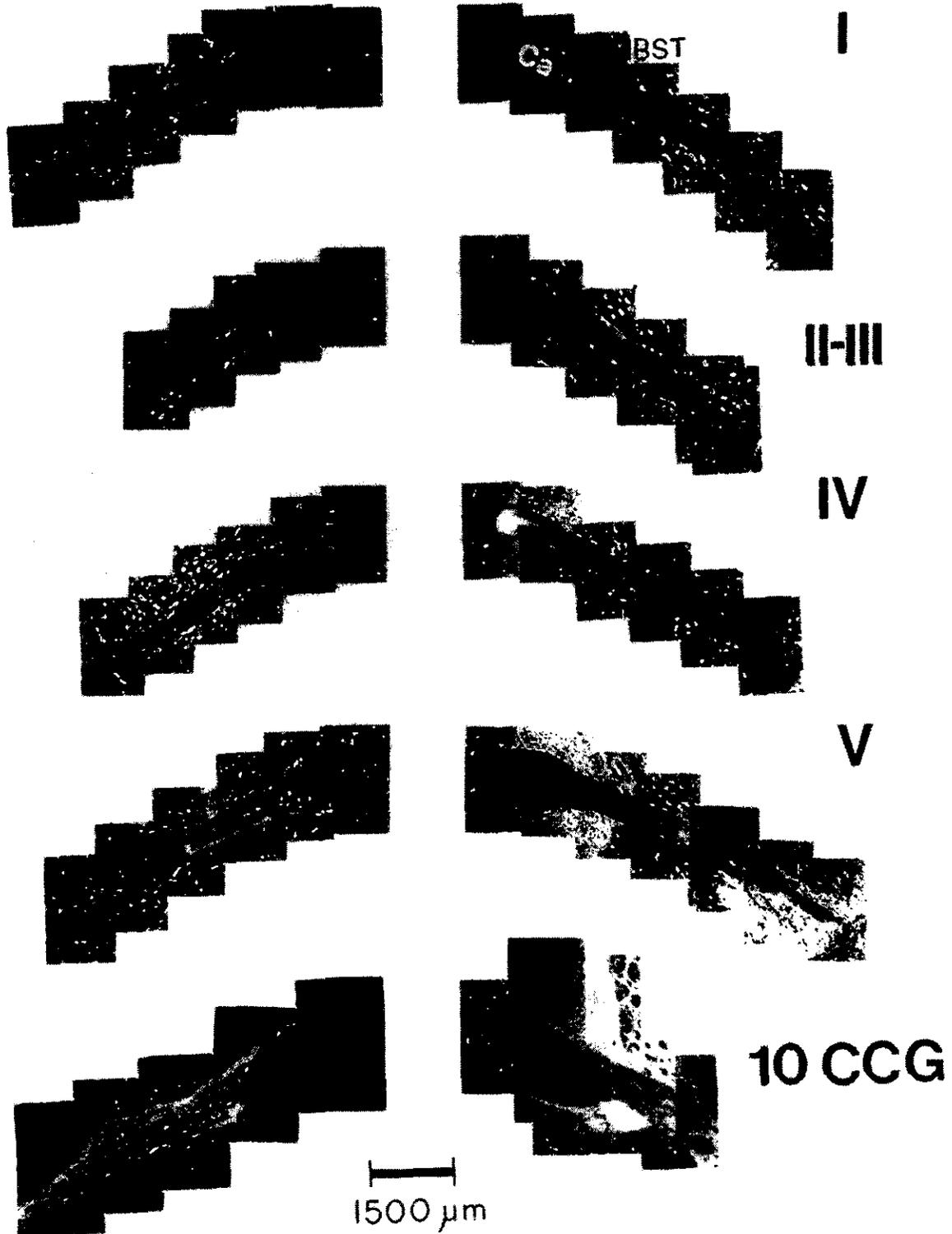
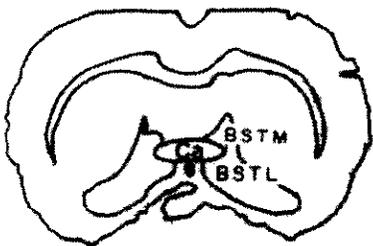
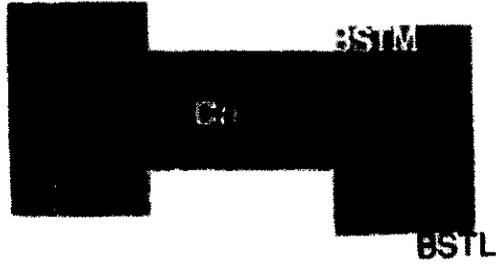


Fig. 10. Presenta los fotomontajes en campo oscuro a nivel caudal de la comisura anterior (8.7 mm), en los diferentes grupos experimentales: fase 1, 2-3, 4, 5 (números romanos) y 10CCG. Donde se observa el incremento de HRP-WGA a lo largo de la comisura anterior (Ca) y a nivel de los núcleos de la cama de la estría terminalis (BSTM y BSTL); durante el establecimiento del kindling eléctrico amigdalino. Observe como las fibras de la estría terminalis se encuentran muy bien delineadas en ambos lados de la comisura anterior, en el grupo experimental que a presentado 10 CCG.



8.7mm

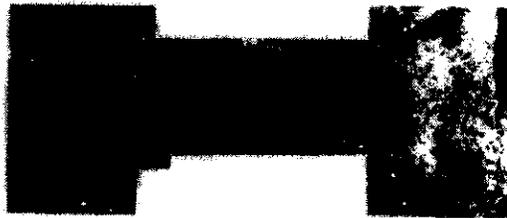


FASE

I



II-III



IV



V



10CCG

1500  $\mu$ m

## AMIGDALA

La distribución de las neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda, a partir de 7.2 a 6.2 mm, para los grupos control y falso operado; se muestra en la figura 11 y para cada grupo experimental (fase 1,2-3,4,5 y 10 CCG) en la figura 12. En estas figuras, se representan los esquemas digitalizados de un solo animal para cada condición experimental. De todos los grupos solamente en falso operado y fase 1 no se observaron neuronas marcadas en esta región.

De manera cualitativa, se observó que el número de neuronas en amígdala se incrementa en relación a cada una de las fases experimentales (fig. 12). La cuantificación de las neuronas marcadas con HRP-WGA se muestra en la tabla II. Al comparar el grupo control con los experimentales, se encontró una disminución en el número de neuronas marcadas en fase 1, 2-3 y 4, siendo igual en fase 5 y un aumento significativo en 10 CCG.

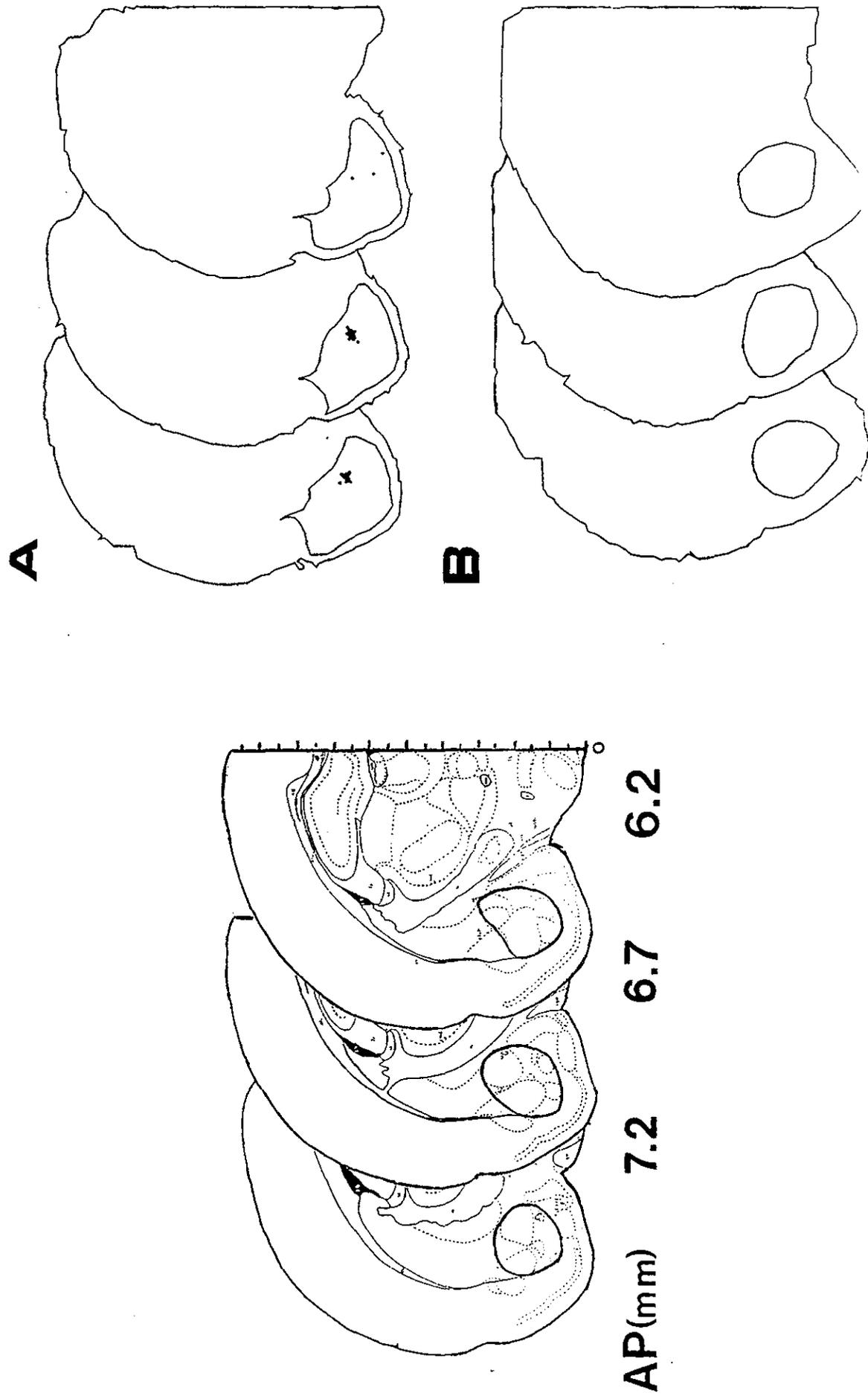
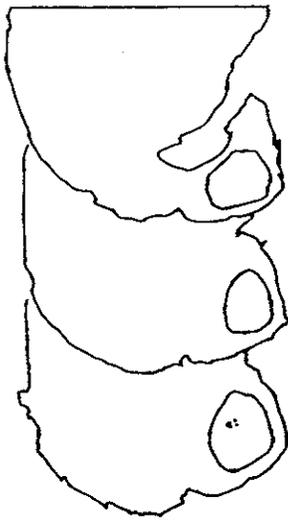
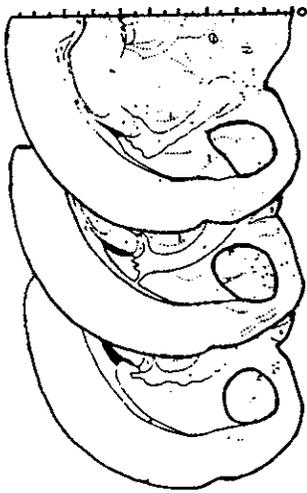
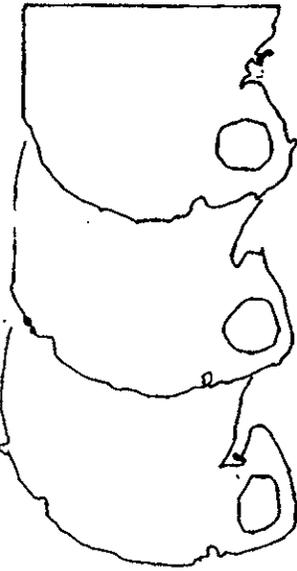


Fig. 11. Cartografías digitalizadas de cortes coronales a diferentes planos de anteroposterioridad de la amígdala izquierda. En A. Control y B. Falso Operado. Cada punto representa a una neurona marcada con HRP-WGA en este complejo amigdalino.

II-III



I

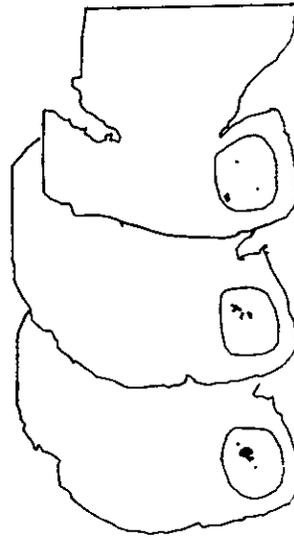


AP(mm) 7.2 6.7 6.2

10CCG



V



IV

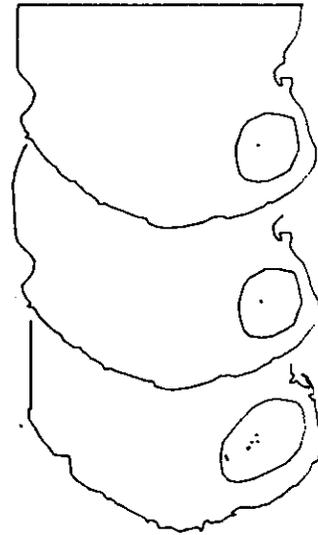


Fig. 12. Muestra la distribución de las neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda, a diferentes planos; en las diferentes fases experimentales (fase 1, 2-3, 4, 5 (en números romanos) y 10CCG). Cada punto representa a una neurona con HRP-WGA en este complejo amigdalino. Nótese el incremento en el número de neuronas marcadas conforme se desarrolla el kindling, a lo largo de las diferentes fases.

TABLA II. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la amígdala izquierda, en los grupos control, falso operado y en las diferentes fases características del kindling.

CONDICION EXPERIMENTAL (n=4)*	MEDIA ± E.E (n = 12)**
Control <sup>B</sup>	17.7 ± 4.3 <sup>b,c</sup>
Falso Operado	0 <sup>a,c</sup>
Fase 1	0 <sup>a,c</sup>
Fase 2-3 <sup>A</sup>	2.2 ± 0.97 <sup>a,b,c</sup>
Fase 4 <sup>A</sup>	3.3 ± 1.0 <sup>a,b,c</sup>
Fase 5 <sup>B</sup>	17.4 ± 3.5 <sup>b,c</sup>
10 CCG	106.7 ± 24.5 <sup>a,b</sup>

\* Número de ratas por condición experimental

\*\* Número total de cortes analizados por grupo

E.E error estándar

<sup>a</sup> Diferencia significativa al comparar con el Control (p<0.05)

<sup>b</sup> Diferencia significativa al comparar con falso operado (p<0.05)

<sup>c</sup> Diferencia significativa al comparar con 10CCG (p<0.05)

Los grupos que comparten la letra A o B, no son significativamente diferentes.

## **CORTEZA DEL CINGULO**

En la corteza del cíngulo ipsi y contralateral, la distribución y el número de neuronas marcadas con HRP-WGA, se realizó a partir de 13.20 mm hasta 9.7 mm.

Todos los animales de los grupos control y falso operado (fig. 13), así como de las diferentes fases experimentales (fase 1, 2-3, 4, 5 y 10 CCG) (fig. 14); presentaron una distribución homogénea en ambos lados de la corteza del cíngulo. Únicamente, en los grupos falso operado y fase 1 no se encontraron neuronas marcadas con HRP-WGA, en ambos lados de esta región.

Además, se observó a partir de la fase 2-3 y grupo control un incremento significativo del número de neuronas marcadas con HRP-WGA del lado ipsilateral con respecto al lado contralateral de la corteza. Los datos de este análisis se muestran en la figura 15.

En el lado ipsilateral de la corteza se encontró que existen diferencias significativas en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en las diferentes fases experimentales al ser comparadas con el grupo control y falso operado. Al cotejar las diferentes fases entre sí, se observó que no hay diferencias: entre las fases 2-3 y 4; ni entre la fase 5 y 10 CCG (ver gráfica 15).

En el lado contralateral se encontró un aumento significativo del número de neuronas en todas las fases experimentales, con respecto al control y falso operado. Al comparar las diferentes fases, se observó que únicamente la fase 5 y 10 CCG, no son estadísticamente diferentes. Los datos de este estudio se muestran en la gráfica 15.

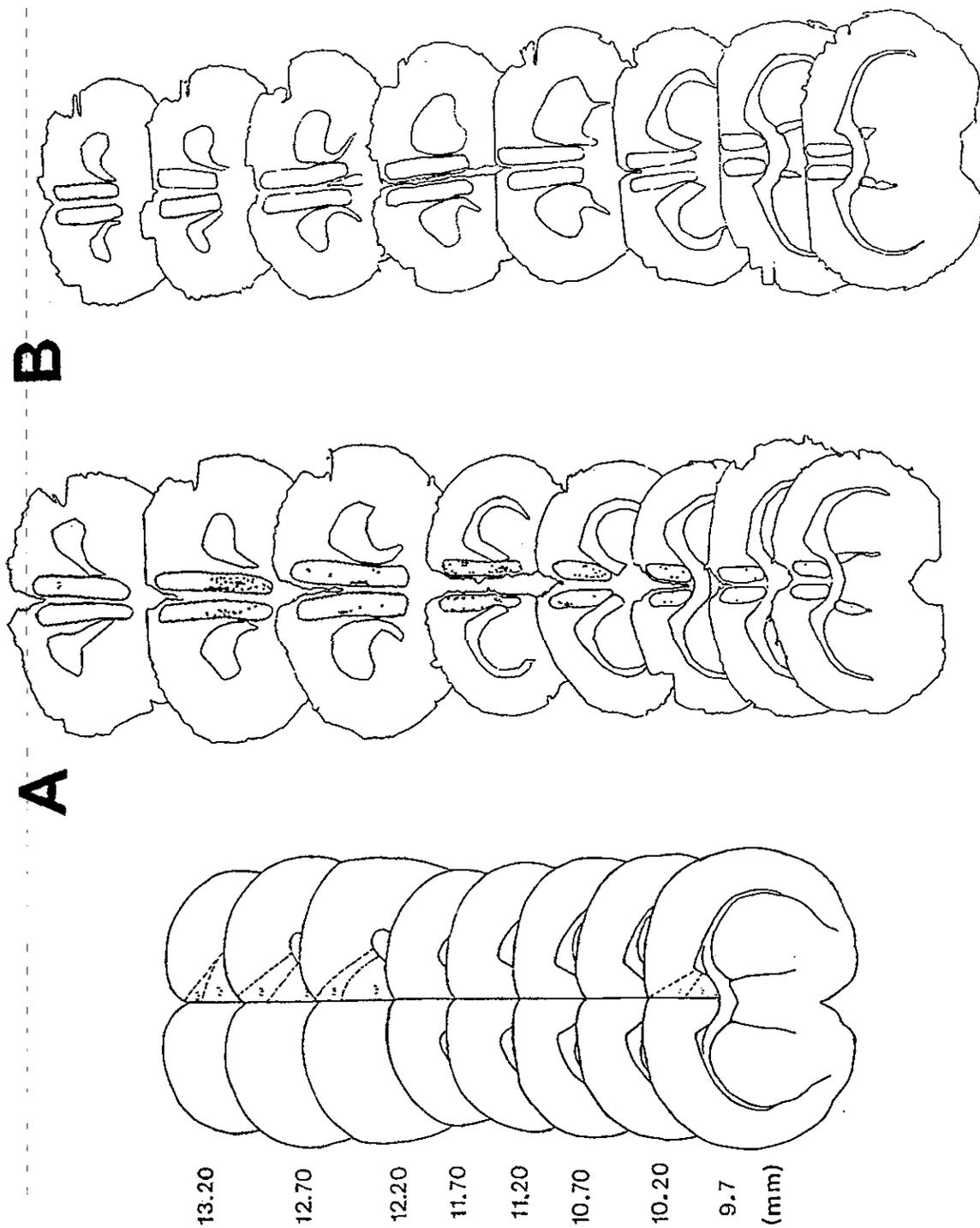


Fig. 13. Cartografías digitales de cortes coronales de la corteza del cíngulo ipsilateral y contralateral. A) Control y B) Falso Operado. Cada punto representa una neurona marcada con HRP-WGA.

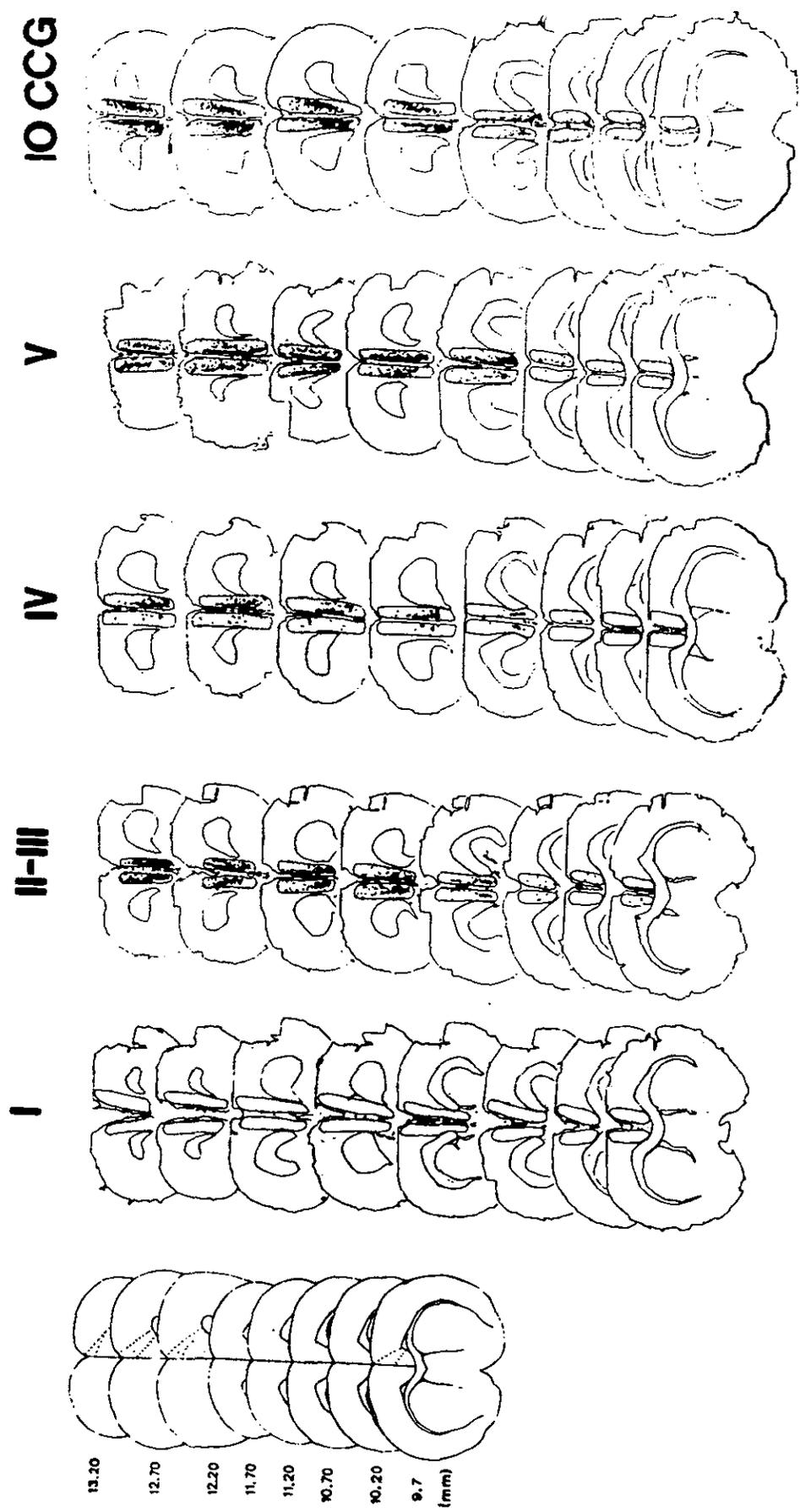


Fig. 14. Cartografías de cortes coronales, donde se muestra la distribución de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza del cíngulo (ipsilateral y contralateral) en cada una de las fases experimentales: fase 1, 2-3, 4, 5 (números romanos) y 10 CCG. Cada punto representa una neurona marcada con HRP-WGA.

## CORTEZA DEL CINGULO

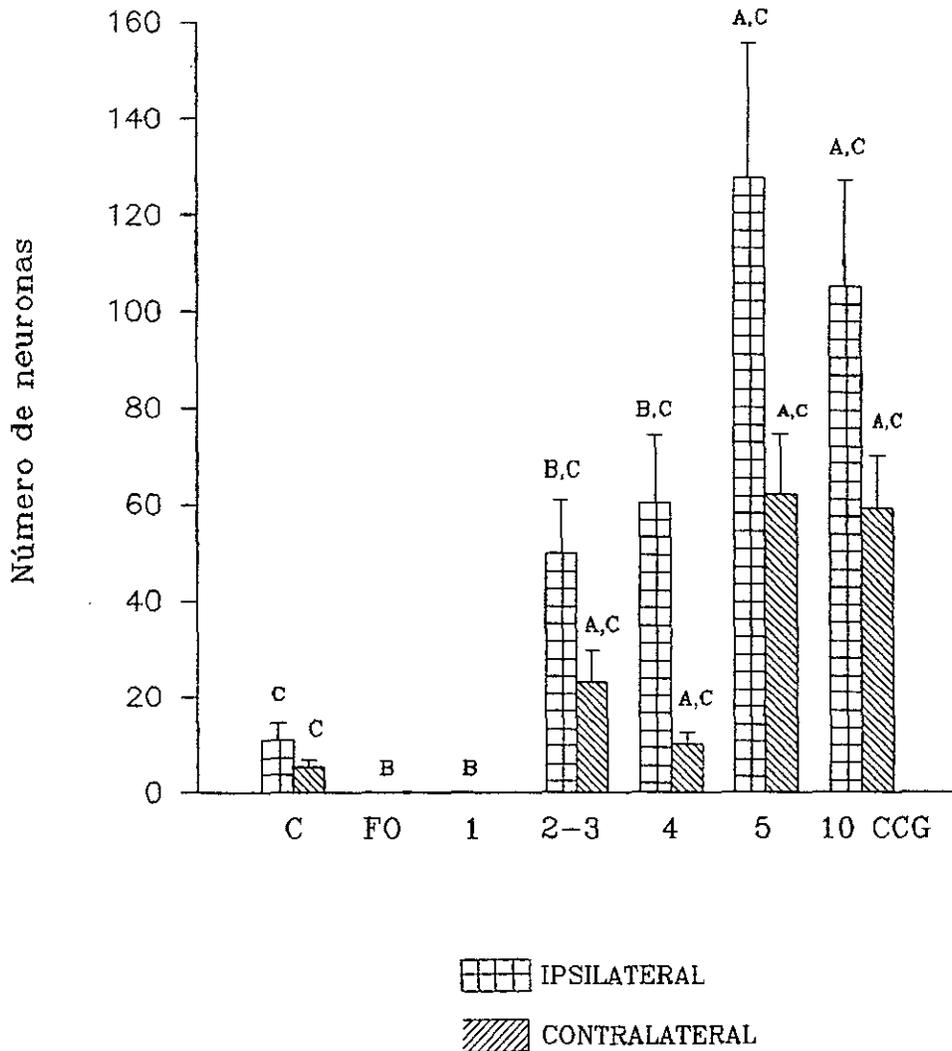


Figura 15. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza del cíngulo. Las barras cuadrículadas representan el promedio de las neuronas marcadas del lado ipsilateral en los diferentes grupos: (C) control, (FO) falso operado, fase 1, fase 2-3, fase 4, fase 5 y 10 CCG. Las barras en rayas muestran el promedio de las neuronas encontradas en el lado contralateral. Media  $\pm$  E.E (n=24). Las letras en las barras, representan que estos grupos son estadísticamente diferentes con respecto al control con una significancia de  $p < 0.01^A$  y  $p < 0.05^B$  y falso operado de  $p < 0.01^C$  (Análisis de varianza de un factor y prueba de Tukey).

## DISCUSION

Estudios neuroanatómicos indican que la amígdala está ampliamente conectada con numerosas estructuras subcorticales y corticales ( De Olmos et al, 1985). También, estudios electrofisiológicos han demostrado, que la estimulación de los núcleos basolateral y corticomediales amigdalinos inducen un efecto funcional sobre estructuras subcorticales a través de la estría terminalis (Gloor, 1955 a y b).

Por otro lado, la estimulación eléctrica repetida en sitios específicos del cerebro (kindling) provoca posdescargas que inicialmente son de duración corta; la frecuencia de las espigas de la posdescarga aumenta y éstas se propagan a otras regiones del cerebro hasta generalizar la actividad epiléptica. Los resultados obtenidos en este trabajo, sobre el incremento en el transporte axonal de HRP-WGA en la comisura anterior, núcleos de la cama de la estría terminalis (BSTM y BSTL); así como en la amígdala contralateral y corteza del cíngulo, indican que estas estructuras cerebrales se encuentran asociadas con la propagación y generalización de la actividad epiléptica; es decir, en la instalación del kindling eléctrico amigdalino.

En el presente estudio se analizaron las mismas estructuras cerebrales para cada una de las fases del kindling (fase 1, 2-3, 4, 5 y 10CCG). Aún cuando el marcaje de HRP-WGA aumenta en las estructuras estudiadas, no indica que estas sean las únicas vías neuronales involucradas para la propagación y el establecimiento del kindling. Esto lo demuestra la ausencia y menor marcaje presente en fase 1 y fase 2-3 respectivamente; en las cuales, quizás otras estructuras cerebrales no analizadas podrían estar activas durante estas etapas y quizás también estar encendidas o apagadas en fase 4 y 5. Esta suposición se basa en el trabajo de Engel et al (1978)

quienes, mediante la técnica de autorradiografía, observaron diferentes regiones marcadas para crisis parciales (fase 1 y 2) y para crisis generalizadas (fase 3, 4 y 5). En dicho trabajo, encuentran un incremento de captura de  $^{14}\text{C}$ -2 deoxiglucosa en el núcleo lateral de la estría terminalis (bilateralmente) así como un incremento bilateral en la amígdala, en crisis generalizada. Lo anterior, apoya nuestros resultados sobre el incremento del transporte axonal de HRP-WGA en los núcleos de la estría terminalis en fase 4, 5 y 10 CCG y en amígdala contralateral en 10 CCG.

Las conexiones interamigdalinas mediante el componente comisural, han sido ampliamente discutidas por diferentes grupos de investigación. Por un lado, se ha visto que mediante este componente se interconectan ambos complejos amigdalinos (Hamilton, 1976; Canteras et al, 1992). También se ha determinado que a través de estas fibras comisurales, la amígdala se conecta al complejo estriatal (Kelley et al, 1982; McDonald, 1991b) y a la corteza prefrontal medial (Krettek y Price, 1977). Por otro lado, Canteras et al (1995) observaron, mediante un trazador neuronal, que fibras que emergen del complejo amigdalino cruzan por la comisura anterior, pero no llegan a la amígdala contralateral. Niteka et al (1981) proponen que ambas amígdalas no se conectan mediante un componente comisural sino por otra vía diferente, sin cruzar por estas fibras. Sin embargo, en este trabajo se muestra claramente que las fibras que conectan a la amígdala con otras estructuras pasan por la parte superior de la comisura anterior. Una de estas estructuras podría ser la amígdala opuesta, ya que en este estudio se encontraron neuronas marcadas del lado contralateral al sitio de inyección.

Las investigaciones que demuestran la conexión interamigdalina mediante la comisura anterior, involucran únicamente a los núcleos medial y cortical posterolateral (Hamilton, 1976; Canteras et al, 1992); en la presente tesis, se inyectó el núcleo

basolateral el cual no se ha reportado que participe directamente en esta vía. Se sabe que las fibras provenientes de este núcleo cruzan por la comisura, pero no han sido identificadas en dirección hacia otras regiones (Leonard y Scott, 1971). No obstante, no se descarta que el núcleo basolateral participe, indirectamente, en la comunicación interamigdalina, mediante las fibras comisurales, ya que este núcleo se encuentra relacionado mediante conexiones intraamigdalinas con los núcleos central, medial y cortical (Niteka et al, 1981; Ottersen, 1982; Paré et al, 1995). Lo anterior se fundamenta con los resultados de este estudio del incremento en la densidad de fibras marcadas con HRP-WGA en la comisura anterior y número de neuronas marcadas en la amígdala izquierda cuando ha sido establecido el kindling; ya que la estimulación utilizada en el presente estudio, permite que la corriente se extienda al menos 1 mm (revisar Hosford et al, 1995), una distancia suficiente para depolarizar neuronas de núcleos vecinos al sitio de estimulación. En este caso, los núcleos vecinos son el cortical y medial, los cuales se ha reportado que participan en esta vía mediante el componente comisural. Estudios ulteriores son necesarios para dilucidar detalles sobre el origen y término de esta conexión.

Por otro lado, el núcleo basolateral se conecta con los núcleos de la cama de la estría terminalis (Krettek y Price, 1978) así como con la corteza prefrontal medial (Krettek y Price, 1977 a,b; Ottersen, 1982; Kita y Kitai, 1990; McDonald, 1987 y 1991 a,b). La presencia de HRP-WGA en los núcleos de la cama de la estría terminalis y corteza prefrontal medial (corteza del cíngulo) reafirma que hay conexión del complejo amigdalino mediante el basolateral por esta vía.

La corteza prefrontal medial es considerada el principal curso de proyecciones recíprocas cortico-amigdalinas (Ottersen, 1982; Cassell et al, 1986). Granato et al (1991) reportaron que las proyecciones amigdalocorticales, mediante el complejo

basolateral, son bilaterales y que además participa un número mayor de neuronas del lado ipsilateral que contralateral, con respecto al sitio de inyección. Estos resultados apoyan a los obtenidos en este trabajo sobre las diferencias estadísticas, entre la corteza del cíngulo ipsi y contralateral (siendo mayor del lado ipsilateral) en todas las fases experimentales y grupo control; con la excepción del grupo falso operado y fase 1, en los cuales no se encontraron neuronas marcadas con HRP-WGA. El núcleo basolateral, es considerado como un eslabón subcortical de comunicación interhemisférica. Sin embargo, el curso preciso de estas fibras no ha sido establecido con exactitud; no obstante, nuestros resultados sobre el incremento del transporte axonal de HRP-WGA a lo largo de la parte superior de las fibras comisurales a nivel caudal; así como en las fibras de la estria terminalis ipsilateral y contralateral en los animales que presentaron 10 CCG, muestran cómo estas fibras ascienden en ambos extremos. Este resultado podría indicar que las fibras se dirigen hacia la corteza prefrontal medial; estructura también analizada en este estudio en la que se encontraron cambios en el número de neuronas marcadas, en ambos lados, durante la instalación del kindling eléctrico amigdalino.

La posibilidad de que el proceso epiléptico puede activar nuevas vías que se encuentran normalmente inactivas, puede explicarse por la participación de más neuronas marcadas con HRP-WGA en amígdala izquierda así como de las fibras densamente marcadas en ambos lados de BSTM, en 10 CCG; además de los incrementos en el número de neuronas, en ambos lados de la corteza del cíngulo a partir de la fase 2-3. En la literatura no hay información que apoye este cambio plástico; sin embargo, no podemos descartar un proceso de reclutamiento que involucra más unidades neuronales, en relación a un aumento en la hiperactividad neuronal característica del fenómeno epiléptico.

Se debe señalar que a medida que el proceso de generalización y de propagación de la actividad convulsiva aumenta, la velocidad del transporte axonal también se incrementa. Este resultado presenta particularidades para cada estructura. Por ejemplo, el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda se encuentra disminuído en las fases 1, 2-3, 4 y sin cambios en fase 5, con respecto al control. Sin embargo, en la corteza del cíngulo, del lado ipsilateral y contralateral al sitio de inyección, se ve aumentado el número de neuronas en las diferentes fases 2-3, 4, 5 y 10 CCG. Se sabe que el efecto de "transferencia" de la amígdala contralateral, es un fenómeno de aparición tardía si se compara con la corteza prefrontal ipsi y contralateral (Fernández-Mas et al, 1992). Estos resultados coinciden con nuestro trabajo, en el cual se observó un aumento de neuronas marcadas, en amígdala hasta 10 CCG; sin embargo, en la corteza del cíngulo ipsi y contralateral se encontraron cambios en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA, a partir de la fase 2-3. Lo anterior indica que la corteza prefrontal se activa antes que la amígdala contralateral. Estos cambios sugieren un posible mecanismo de control o de inhibición de dicha actividad. Así mismo, se sabe que la corteza cerebral juega un papel importante en la propagación de la actividad epiléptica (Lieb et al, 1991; Fernández-Mas et al, 1992). Además, se ha postulado que la activación del sistema de opioides endógenos en la corteza cerebral, interviene en la supresión de la actividad epiléptica durante los periodos postictal e interictal (Rocha et al, 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo, sobre el incremento en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en las diferentes fases del kindling; es una evidencia más, que podría apoyar la participación de la corteza en la inhibición de la actividad epiléptica.

Cuando se compararon los grupos control y falso operado, se observó que éste último presentó más marca a nivel de la comisura y en BSTM, lo cual indica un leve incremento en el transporte. No se conoce la causa de tal incremento, pero hay

estudios que demuestran alteraciones neuroquímicas (Ben Attia et al, 1992, Lscher et al, 1993), conductuales (Denti et al, 1970; Boast et al, 1976) y electrofisiológicas (Blackwood, 1982; Lscher et al, 1995) en respuesta al período de implantación del electrodo. La ausencia de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda y en corteza del cíngulo en el grupo falso operado y fase I; así como la disminución de células en fase 2-3 y 4 con respecto al grupo control, sugieren la participación de un componente inhibitorio durante estas fases. Ben Attia et al (1992) señalan que la implantación de un electrodo en animales falso operado (sin estimulación), produce un incremento en la densidad de receptores a benzodiazepinas, únicamente en el sitio donde se localiza el electrodo, en comparación con los animales control. Así mismo, Ashton et al (1980) observaron un decremento significativo en la unión del ligando [<sup>3</sup>H] spiperona en la corteza prefrontal, en animales a los cuales se les implantó un electrodo en amígdala pero que no fueron estimulados (falso operado) en relación a los animales control. No se descarta la participación de eventos neuroquímicos que podrían estar mediando respuestas inhibitorias, como resultado de la implantación de un electrodo en el grupo falso operado, que persisten durante las fases iniciales de la actividad epiléptica. Una vez que ésta última se generaliza, las respuestas inhibitorias pueden haber desaparecido o pueden estar sobrepasadas por un mecanismo excitatorio que pueda estar reflejado en el incremento de neuronas marcadas con HRP-WGA, en las fases 10 CCG y en la corteza del cíngulo.

A lo largo de este trabajo, se ha hecho referencia a los cambios metabólicos celulares responsables de los procesos de propagación y generalización de la actividad epiléptica, afirmación que falta precisar ya que en este estudio no se pueden determinar los organelos y/o macromoléculas celulares responsables o implicadas en los aumentos de la velocidad del transporte axonal. Diversos reportes en la literatura señalan que los procesos de propagación y de generalización de la actividad epiléptica

se acompañan de un incremento en la actividad del gen c-fos (McNamara,1995; Hosford et al, 1995), de incrementos en los contenidos de neurotransmisores ( Kalichman,1982; Bajorek et al, 1986; Siggins,1986; McNamara et al, 1987; Kamphius et al, 1991; Talavera et al, 1989) y, como se señaló en los antecedentes, la importancia de la síntesis de proteínas para formar un foco epiléptico secundario, la cual es importante para la realización de muchos eventos neuronales. Si bien, estos resultados experimentales sugieren cambios en la actividad celular que pueden reflejar un aumento en la síntesis de precursores de los neurotransmisores (que explicarían los cambios en las concentraciones de los mismos), se tendría que postular un cambio en el mecanismo para el movimiento de los organelos a lo largo de los microtubúlos que explique los cambios en la velocidad del transporte axonal. Esto asociado a los cambios en los procesos de exocitosis (Langmeier et al, 1980,1983), a las modificaciones estructurales de la sinapsis (Geinisman et al, 1990; Hovorka et al, 1992) y del funcionamiento de la bomba  $[Na^+,K^+]ATPasa$  dependiente de serotonina y de noradrenalina (Hernández y Condés-Lara, 1989 y 1992); darían cuenta de un proceso generalizado de la disfunción celular que conlleva al estado de hiperexcitabilidad que caracteriza a la actividad epiléptica.

Sin lugar a dudas, el incremento de la velocidad del transporte axonal tiene que ser estudiado con más detalle para dilucidar qué organelos y/o macromoléculas celulares están implicadas y cuáles son las responsables.

## CONCLUSIONES

- ◆ El resultado más sobresaliente de este trabajo es el incremento en el transporte axonal, como consecuencia del proceso de la epilepsia experimental. Este incremento en la velocidad se correlaciona con el incremento en la excitabilidad celular, juzgada a partir del incremento en la frecuencia y la duración de las posdescargas. Todo ello sugiere un cambio en los procesos metabólicos celulares que culminan con una exacerbación de la actividad celular y se acompaña de las crisis convulsivas generalizadas
- ◆ Este trabajo aporta evidencias sobre las conexiones interamigdalinas, por el núcleo basolateral mediante el componente comisural.
- ◆ Los resultados obtenidos sobre los cambios en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la corteza prefrontal medial, durante el establecimiento del kindling; indican que la corteza prefrontal se activa antes que la amígdala contralateral.

## BIBLIOGRAFIA

- Aird R.B, Masland R.L. and Woodbury D.M. (1984). *The Epilepsies. A critical Review*, Raven Press, New York.
- Ashton D, Leysen J.E. and Wauquier A. (1980). Neurotransmitters and receptor binding in amygdaloid kindled rats: serotonergic and noradrenergic modulatory effects. *Life Sci.*, **27**: 1547-1556.
- Bajorek J.G, Lee R.J. and Lomax P. (1986). Neuropeptides: Anticonvulsant and convulsant mechanisms in epileptic model systems and in humans. In: Delgado-Escueta A.V, Ward A.A, Woodbury Jr. D.M. and Porter R.J. (Eds.), *Advances in Neurology*. Raven Press, New York, pp 489-500.
- Ben Attia M. Gouemo P.N, Belaidi M, Rondouin G. and Chicheportiche R. (1992). Kindling and electrode effects on the benzodiazepine receptors density of olfactory bulb and hippocampus after olfactory bulb kindling. *Neurosci. Lett.*, **143**:74-78.
- Bernard J.F, Huang G.F, Besson J.M. (1992). Nucleus centralis of the amygdala and the globus pallidum ventralis electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiology*, **68**:551-569.
- Blackwood D.H. (1982). Enhanced rate of kindling after prolonged electrode implantation in to the amygdala of rats. *J. Neurosci. Methods*, **5**:343-348.
- Boast C.A, Reid S.A, Johnson P. and Zornetzer S.F. (1976). A caution to brain scientists: unsuspected hemorrhagic vascular damage resulting from mere electrode implantation. *Brain. Research*, **103**:527-534.
- Broadwell R.D. and Brightman M.W. (1979): Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein in vivo. *J.Comp. Neurol.*, **185**:31-74.
- Burnham W.M (1976): Primary and "transfer" seizure development in the kindled rat. In: Wada J.A. (Ed.), *Kindling 1*. Raven Press, New York, pp 61-83.
- Cain D.P, Corcoran M.E, and Staines W.A. (1980). Effects of protein synthesis inhibition on kindling in the mouse. *Exp. Neurol.*, **68**:409-419.
- Cain D.P. (1989): Excitatory neurotransmitters in Kindling: excitatory amino acid, cholinergic and opiate mechanisms. *Neurosci. Behav. Rev.*, **13**:269-276.
- Cain D.P, Boon F. and Corcoran M.E. (1990): Involvement of multiple opiate receptors in opioid Kindling. *Brain Research*, **517**:236-244.

- Ceccarelli B, Hurlbut W.P. and Mauro A. (1973): Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **J. Cell. Biol.**, **57**: 499-524.
- Canteras N. S, Simerly R. B. and Swanson L. W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. **J. Comp. Neurol.**, **324**:143-179.
- Canteras N.S, Simerly R.B. and Swanson L.W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **360**:213-245.
- Casell M.D. and Wright D.J. (1986). Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, **17**:321-333.
- Cooke C.T, Cameron P.U. and Jones D.G. (1975): Stimulation-induced uptake of horseradish peroxidase by rat cortical synapses. **Neurosci. Lett.**, **1**:15-18.
- Denti A, McGaugh J, Landfield P. and Shinkman P. (1970). Facilitation of learning with post-trial stimulation of the reticular formation. **Physiol. Behav.**, **5**:659-662.
- De Olmos J, Alheid G.F. and Beltramino C.A. (1985): Amygdala. In: Paxinos G. (Ed.), **The rat nervous system 1**. Academic Press, Australia, pp 223-317.
- Divac I, Petrovic-Minic B, Mogensen J. (1984). Focal cortical seizures prevent HRP-WGA labeling only in neuron bidirectionally connected to the cortex. **Brain Research**, **311**:189-193.
- Dolivo M, Meurant C. and Verdan C.I. (1977): The retrograde axonal flow depends on neuronal activity. **Experimentia**, **33**:778.
- During M.J, Craig J.S, Hernández, Anderson G.M. and Gallager D.W. (1992): 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.
- Enerback L, Kristensson K. and Olsson T. (1980): Cytophotometric quantification of retrograde axonal transport of a fluorescent tracer (primuline) in mouse facial neurons. **Brain Research**, **186**:21-32.
- Engel J, Wolson L. and Brown L. (1978): Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid Kindling. **Ann. Neurol.**, **3**: 538-544.
- Fernández-Mas R, Martínez A, Gutiérrez R. and Fernández-Guardiola A. (1992). EEG frequency and time domain mapping study of the cortical projections of temporal lobe amygdala afterdischarge during kindling in the cat. **Epilepsy Research**, **13**:23-34.
- Geinisman Y, Morrell L.T. and Morrell F. (1990). The brains record of experience: kindling induced enlargement of the active zone in hippocampal perforated synapses. **Brain Research**, **513**:175-179.

- Gloor P. (1955a): Electrophysiological studies on the connections of the amygdaloid nucleus in the cat: I. The neuronal organization of the amygdaloid projection system. **Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.**, 7: 223-242.
- Gloor P. (1955b): Electrophysiological studies on the connections of the amygdaloid nucleus in the cat: II. The electrophysiological properties of then amygdaloid projection system. **Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.**, 7:243-264.
- Goddard G.V, McIntyre D.C. and Leech C.K. (1969): A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp. Neurol.**, 25:295-330.
- Gonatas N.K, Harper C, Mizutani T. and Gonatas J.O. (1979). Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. **J. Histochem. Cytochem.** 27:728-734.
- Granato A, Santarelli M. and Minciacchi D. (1991). Bihemispheric organization of amygdalo-cortical projections in the rat. **Neurosci. Lett.**, 127:53-56.
- Guilbaud G, Bernard J.F, Benson J.M. (1994). **Areas involved in nociception and pain.** Textbook of pain. Churchill Livingstone.
- Hamilton L.W. (1976): **Basic limbic system anatomy of the rat.** Plenum, New York, London.
- Hernández R.J. and Condés L.M. (1989): Serotonin dependent ( Na +/K+) ATPase in kindling rats: A study in various brain regions. **Brain Research**, 480: 403-406.
- Hernández R.J. and Condés L.M. (1992): Brain Na+/K+ ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and kindled rats. **Brain Research**, 593:239-244.
- Heuser J.E. and Reese T.S. (1973): Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. **J. Cell. Biol.**,57:315-344.
- Holtzman E, Teichberg S, Abrahams S.J, Citkowitz E, Crain S.M, Kawai N. and Peterson E.R. (1973): Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla. **J. Histochem. Cytochem.**, 23:349-385.
- Hosford D.A, Simonato M, Cao Z, Garcia-Cairaseo N, Silver J.M, Butler L, Shin Ch. and McNamara J.O. (1995): Differences in the anatomic distribution of immediate early gene expression in amygdala and angular bundle kindling development. **J. Neurosci.**, 15 (3): 2513-2523.
- Hovorka J, Langmeier M. and Mares P. (1992). Morphological changes of the presynaptic and postsynaptic element in excitatory synapses during kindling. **Physiol. Res.** 41:351-357.

- Jackson J.H. (1889). On post-epileptic states: a contribution to the comparative study of insanities. **J. Ment. Sc. London.**, 34:490-500.
- Jonec V. and Wasterlain G.C. (1979): Effect of inhibitors of protein synthesis on the development of Kindled seizures in rats. **Exp. Neurol.**, 66:524-532.
- Kalichman M.W. (1982): Neurochemical correlates of the Kindling model of epilepsy. **Neurosci. Behav. Rev.**, 6:165-181.
- Kamphius W, Huisman E, Dreijer A.M, Ghijsen W.E, Verhage M. and Lopes da Silva F.H. (1990): Kindling increases the K (+) -evoked Ca<sup>2</sup> (+) -dependet release of endogenous GABA in area CA 1 of rat hippocampus. **Brain Research**, 511:63-70.
- Kamphius W, Huisman E, Veerman M.J. and Lopes da Silva F.H. (1991): Development of changes in endogenous GABA release during kindling epileptogenesis in rat hippocampus. **Brain Research**, 545: 33-40.
- Karlsson J.O. (1979). Proteins of axonal transport: interaction of rapidly transported proteins with lectins. **J. Nuerochem.** 32:491-494.
- Kelley A.E, Domestic V.B. and Nauta W.J. (1982): The amigdaloid striatal projection in the rat anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. **Neuroscience**, 7:615-630.
- Kita H. and Kitai S.T. (1990). Amygdaloid projections to the frontal cortex and the striatum in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 298:40-49.
- Krettek J.E and Price J.L. (1977).The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 171:157-192.
- Krèttek J.E and Price J.L. (1977). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, 172:687-722.
- Krettek J.E and Price J.L. (1978). Amygdaloid projection to subcortical structures within basal forebrain and brainstem in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, 178: 225-254.
- Krettek J.E and Price J.L. (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. **J. Comp. Neurol.**, 178:255-280.
- Langmeier M, Fisher J. and Mares J. (1980): Number of synaptic vesicles in the rat somatosensory cortex after repetitive electrical stimulation prolonging self-sustained after-discharges. **Epilepsia**, 21:255-260.
- Langmeier M, Fischer J. and Mares J. (1983): Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained after discharge during Kindling. **Epilepsia**, 24:616-627.

- Leonard C.M and Scott J.W. (1971): Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental study. **J. Comp. Neurol.**, **141**:313-381.
- Lieb J.P, Dasheiff R.M. and Engel J. (1991). Role of the frontal lobes in the propagation of mesial temporal lobe seizures. **Epilepsia**. **32**:822-837.
- Litchy W.J. (1973): Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase of frog sartorius nerve in vitro. **Brain Research**, **56**:377-381.
- Löscher W, Horstermann D, Honack D, Rundfeldt C. and Wahnschaffe U. (1993). Transmitter amino acid levels in rat brain regions after amygdala-kindling effect of prolonged electrode implantation. **Neurochem. Res.**, **18**:775-781.
- Löscher W, Wahnschaffe U, Honack D. and Rundfeldt C. (1995). Does prolonged implantation of depth electrodes predispose the brain to kindling?. **Brain Research**, **697**:197-204.
- Martínez Lorenzana G. (1994): Determinación del transporte axonal del trazador peroxidasa aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales amigdalinas, en ratas epileptizadas por kindling. UNAM.
- McDonald A.J. (1987). Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **262**: 46-58.
- McDonald A.J. (1991a). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. **Neuroscience**, **44**:1-14.
- McDonald A.J. (1991b). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. **Neuroscience**, **44**:15-33.
- McNamara J.O. (1995): Analyses of the molecular basis of kindling development. **Psychi. and Clin. Neurosci.**, **49**: 5175-5178.
- McNamara J.O, Bonhaus D.W, Crain B.J, Gellman R.L. and Shin Ch. (1987): Biochemical and Pharmacologic studies of neurotransmitters in the kindling model. In: Phillip C, Jobe and Hugh E. (Eds.), **Neurotransmitters and epilepsy**. Human Press, New Jersey, pp 115-160.
- Mesulam M. (1982): **Tracing neuronal connections with horseradish peroxidase**. John Wiley & Sons, New York, London. pp.
- Morrell F. and Morrell L.T (1983): Kindling as a model of neural plasticity. In: Wada J.A. (Ed.), **Kindling 3**. Raven Press, New York, pp 17-35.

- Morrell F, Tsuru T.J, Hoeppner T.J, Morgan D. and Harrison W.H. (1975): Secondary epileptogenesis in frog forebrain: Effect of inhibition of protein synthesis. *Can. J. Neurol. Sci.*, **2**: 407-416.
- Nennesmo I. and Kristensson K. (1982): Somatopetal axonal transport of fluorescent lectins: distribution pattern and cytophotometric quantification in mouse peripheral neurons. *Neurosci. Lett.*, **27**: 243-248.
- Nishino H, Ono T, Sasaki K, Nishino A. and Muramoto K. (1979): Retrograde transport of horseradish peroxidase in sciatic nerve of rats and dystrophy mice. *Neurosci. Lett.*, **14**: 1-6.
- Nitecka L, Amerski L. and Narkiewicz O. (1981): Interamygdaloid connections in the rat studied by the horseradish peroxidase method. *Neurosci. Lett.*, **26**: 1-4.
- Ottersen O.P (1982): Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **205**: 30-48.
- Paré D, Smith Y. and Paré J.F. (1995). Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat : phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience*, **69**: 567-583.
- Paxinos G. and Watson C.H. (1982): **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, London.
- Racine R.J. (1972): Modification of seizure activity by electrical stimulation I. After-discharge threshold. *Electroenceph. Clin. Neurophys.*, **32**: 269-279.
- Ralston H.J III. (1990): Analysis of neuronal networks: a review of techniques for labeling axonal projections. *J. Elec. Microsc. Tech.*, **15**: 322-331.
- Rocha L. (1995): Activación del sistema de los opioides endógenos durante el desarrollo del kindling amigdalino de la rata. *Salud Mental*, **18**: 39-44.
- Rocha L, Ackermann R.F, Nassir Y, Chugani H.T. and Engel J Jr. (1993). Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: an autoradiographic study. *Epilepsy Res.* **14**: 195-208.
- Siggins G.R, Henriksen S.J, Chavkin C.H. and Gruol D. (1986): Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system: Cellular mechanisms. In : Delgado-Escueta V.A, Ward Jr A.A, Woodbury D.M. and Porter R.J. (Eds.), **Advances in Neurology**, Raven Press, New York. pp 501-512.
- Talavara E, Omaña Z.I, Asai M and Condés L.M. (1989): Regional brain IR-Met, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. *Brain Research*, **485**: 141-148.

- Teichberg S, Holtzman E, Crain S.M. and Peterson E.R. (1975): Circulation and turnover of synaptic vesicle membrane in culture fetal mammalian spinal cord neurons. **J. Cell. Biol.**, **67**: 215-230.
- Turner T.P. (1977). Effect of pentobarbital on uptake of horseradish peroxidase by rabbit cortical synapses. **Exp. Neurol.** **54**:24-32.
- Vindrola O, Briones R, Asai M. and Fernández A. (1981): Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. **Neurosci. Lett.**, **21**: 39-43.
- White L.E. and Price J.L. (1993): The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. I. Patterns of 14 C-2-deoxyglucose uptake and fos immunocytochemistry. **J. Neurosci.**, **13**: 4787-4809.