

03097

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA
CAMPUS UNAM-UAQ, JURQUILLA

ASPECTOS MORFO-FUNCIONALES EN EL KINDLING ELECTRICO
AMIGDALINO

299222

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MA. GUADALUPE MARTINEZ LORENZANA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL CONDES-LARA

JURQUILLA, QUERETARO

2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PARTE DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO SE HAN PRESENTADO EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS, REUNIONES Y PUBLICACIONES.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES:

Martínez-Lorenzana, G. y Condés-Lara M. Conexión ínteramigdalina del núcleo basolateral mediante la comisura anterior. XVII Congreso Nacional de Anatomía. 22-26 de Noviembre, 1998. León, Gto. México.

Martínez-Lorenzana, G., Talavera E. y Condés-Lara M. Cuantificación del transporte axonal mediante el marcaje de HRP-WGA, en el SNC en ratas epileptizadas. Valorado por un programa de análisis de imágenes. XIII Reunión Nacional de Morfología. 15-18 de Noviembre, 1999. Acapulco, Gro. México.

Martínez-Lorenzana G., Talavera-Cuevas E. y Condés-Lara M. Conexión ínter amigdalina del núcleo basolateral mediante la comisura anterior. SIMPOSIO-99 "La investigación y el desarrollo tecnológico en Querétaro", CONCyTEQ. Septiembre, 1999. Querétaro, México.

Martínez-Lorenzana G., Talavera-Cuevas E. y Condés-Lara M. Efecto de la cicloheximida en el kindling eléctrico y en el transporte axonal. SIMPOSIO-2000 "La investigación y el desarrollo tecnológico en Querétaro 2000", CONCyTEQ, Agosto 2000, Querétaro, México.

Martínez-Lorenzana G., Talavera-Cuevas E. and Condés-Lara M. Effects of the cycloheximide in WGA-HRP labeling in different brain regions in kindled rats. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience. New Orleans, LA. November 4-9, 2000.

PUBLICACIONES:

Martínez-Lorenzana G., Talavera-Cuevas E., Sanchez-Alvarez M. and Condés-Lara M. Effects of kindling in wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in neurons of the interamygdaloid pathway in rats. *Neuroscience Letters*. 281: 135-138, 2000.

Condés-Lara M., Talavera-Cuevas E., Larriva-Shad J and **Martínez-Lorenzana G.** Different wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in structures related to the development of amygdaline kindling in the rat. *Neuroscience Letters*. 299:13-16, 2001.

DURANTE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO Y REALIZACIÓN DE ESTA TESIS, SE CONTÓ CON EL APOYO DE LAS BECAS DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT), COMPLEMENTO DE BECA POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP) Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE QUERÉTARO (CONCyTEQ).

TAMBIÉN SE CONTÓ CON LOS SIGUIENTES APOYOS:

Proyecto PAEP-205310. Efecto de la cicloheximida, anisomicina y colchicina, en la velocidad del transporte axonal, en las fibras comisurales, en el kindling eléctrico amigdalino. 1998. DGEP.

Apoyo para la Estancia realizada en el Departamento de Morfología bajo la dirección del Dr. Carlos Avendaño, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, España. En donde se colaboró en el proyecto denominado "Estudio anatómico de las conexiones de los núcleos del cordón posterior en la rata". Durante el período del 3 de Abril al 14 de Junio del 2000. De este proyecto se publicó el siguiente artículo:

Martínez-Lorenzana G., Machín R. and Avendaño C. Definite segregation of cortical neurons projecting to the dorsal column in the rat. *NeuroReport*. 12 (2): 413-416, 2001.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Jurado por sus comentarios y sugerencias:

Dr. Miguel Condés Lara

Dr. Augusto Fernández Guardiola

Dr. Alfredo Fera Velasco

Dr. Raúl Paredes Guerrero

Dr. Roberto Prado Alcalá

Dr. Jorge Larriva Shad

Dr. Francisco Pellicer Graham

Dr. Hugo Solís Ortiz

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a toda mi familia en general.

A la memoria de mi Padre Fausto Martínez Martínez.

A mi Madre Esther Lorenzana Ávila.

A mi Esposo Marco Antonio Morales Fuentes.

Y a todos mis Hermanos:

Carmen

Esther

Silvia

Fausto

Araceli.

INDICE

Resumen -----	I
Abstract -----	II
Introducción -----	1
Capitulo I	
Kindling-----	4
Capitulo II	
Amígdala-----	13
Capitulo III	
Hiperexcitabilidad y Transporte axonal-----	23
Capitulo IV	
Kindling y Síntesis de Proteínas -----	27
Planteamiento del Problema -----	30
Hipótesis -----	31
Objetivos Generales-----	32
Material y Métodos	
Experimento I	
<u>Análisis de la Conexión interamigdalina del núcleo basolateral a través de la comisura anterior</u> -----	34
Resultados-----	40
Experimento II	
<u>Cuantificación de la Densidad del marcaje en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis (8.7 mm interaural): en el kindling amigdalino establecido</u> -----	44
Resultados-----	48
Experimento III	
<u>Efecto de la cicloheximida en el kindling eléctrico y en la densidad del marcaje en diferentes estructuras relacionadas con la propagación de la actividad epiléptica</u> -----	50
Resultados -----	53
Discusión -----	72
Bibliografía-----	80

RESUMEN

El Kindling es un modelo experimental de epilepsia que se produce por la administración repetida de estímulos eléctricos subconvulsivos en sitios específicos del cerebro, los cuales generan cambios conductuales y electroencefalográficos que culminan en crisis convulsivas generalizadas. Se ha sugerido que la actividad eléctrica anormal generada por el kindling podría alterar el transporte axonal y la síntesis de proteínas, los cuales son mecanismos importantes para la generación de focos epilépticos secundarios. Siendo dichos procesos fundamentales para la propagación y generalización de la actividad epiléptica. Sin embargo, la relación entre la densidad del marcaje por medio del transporte axonal y la hiperexcitabilidad inducida por algún modelo de epilepsia experimental no ha sido estudiada. Además, el kindling conduce a cambios permanentes en la función neuronal de otras estructuras que son el resultado de las conexiones entre una región y otra, no obstante, la conexión ínteramigdalina del núcleo basolateral mediante la comisura anterior para la generación de un foco en espejo, no ha sido establecida. Tomando en cuenta estos antecedentes, los objetivos de esta tesis fueron: 1) Establecer si existe la conexión ínteramigdalina para el núcleo basolateral; 2) Determinar si la hiperactividad neuronal producida por el kindling induce cambios en la densidad del marcaje del trazador peroxidasa de rábano conjugada a la lectina de germen de trigo (HRP-WGA) en la vía ínteramigdalina y 3) Estudiar los efectos que produce la cicloheximida, un inhibidor de síntesis de proteínas, sobre el desarrollo del kindling y la densidad del marcaje de HRP-WGA en diferentes estructuras relacionadas con la propagación de la actividad epiléptica. Los resultados obtenidos muestran: 1) Que la conexión ínteramigdalina del núcleo basolateral es a través de la comisura anterior; 2) Los animales epileptizados presentan un incremento en la densidad del marcaje en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis y 3) La cicloheximida decrementó el marcaje en la comisura anterior, en los núcleos del lecho de la estría terminalis; así como, en el número de neuronas marcadas en la amígdala y en ambos lados de la corteza prefrontal medial en animales epileptizados.

ABSTRACT

Kindling is an experimental model of epilepsy that is established by the administration of repetitive subconvulsive electrical stimuli in specific brain regions, inducing behavioral and electroencephalographic changes that culminate in convulsive generalized seizures. It has been suggested that in kindling the abnormal electrical activity might alter protein synthesis and that axonal transport is important in the generation of secondary epileptic foci. Thus, protein synthesis and axonal transport are fundamental in the propagation and generalization of epileptic activity. However, the relation between labeling by means of axonal transport and neuronal hyper excitability induced by some model of experimental epilepsy has not been explored. Moreover, kindling produces permanent changes in the neuronal function in structures of different regions by means of their interconnections, such as, the interamygdaloid connection of the basolateral nucleus through the anterior commissure that could be involved in the generation of secondary epileptic foci. With this background in mind, the aim of this thesis were: 1) to demonstrate the basolateral interconnections through the anterior commissure; 2) to determine whether neuronal hyperactivity produced by kindling induced changes on the labeling the wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) in the interamygdaline pathways and; 3) to examine the effects of cycloheximide (inhibitor of proteins synthesis) on the development of kindling and in the labeling in different brain structures related with the propagation of the epileptic activity. The results obtained show: 1) Interamygdaloid connection of the basolateral nucleus is throughout the dorsal portion of the anterior commissure; 2) Kindled animals had an increase in WGA-HRP density labeling in the anterior commissure and in the bed nuclei of stria terminalis and 3) Cycloheximide produced a decrease in the label of the anterior commissure, in the bed nuclei of stria terminalis, in the number of labeled neurons in the amygdala, on both sides of the medial prefrontal cortex and delayed the early behavioral stages of kindled animals.

INTRODUCCION

La epilepsia es un padecimiento del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por la hipersincronía anormal de la actividad neuronal (Aird et al., 1984). Se ha propuesto, que este padecimiento 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; Brailowsky et al., 1989).

Hasta la fecha, se cuenta con diferentes modelos animales que presentan características semejantes a las observadas en las epilepsias humanas y que son de gran utilidad para el estudio de la fisiopatología de estas alteraciones (ver tabla 1). 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. Entre estas se encuentran: no utilizar 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 mejores estrategias de experimentación, es decir, el estímulo se puede controlar de tal forma

TABLA 1

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 kainico, etc. estimulación eléctrica focal</p> <p>1.2 Crónicos: crema de aluminio, sales de hierro, kindling</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 (papiro papiro)</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: pentilenetetrazol, sustancia 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

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 y progresiva, de tal forma 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 relación con los fenómenos electrofisiológicos, conductuales y bioquímicos (Vindrola et al., 1981; Cain, 1989; Talavera et al., 1989; Cain et al., 1990; Kamphuis et al., 1990; During et al., 1992; Hernández y Condés-Lara, 1989 y 1992).

Durante el kindling eléctrico se producen cambios en las concentraciones de diferentes neurotransmisores (Kalichman, 1982; Bajorek et al., 1986; Siggins, 1986; McNamara et al., 1987; Kamphuis et al., 1991). Así como alteraciones estructurales, que dependen de la síntesis de proteínas (Goddard et al., 1969; Morrell et al., 1975). Estos cambios sugieren una alteración en el transporte axonal, como consecuencia de la epilepsia experimental; ya que el transporte axonal juega un papel importante en la propagación y generalización de la actividad epiléptica (Morrell y Morrell, 1983). De esta forma los objetivos de esta tesis son: analizar la vía que puede intervenir en la propagación de la actividad epiléptica al estimular el núcleo basolateral de la amígdala; cuantificar el marcaje del trazador peroxidasa de rábano conjugada a la lectina de germen de trigo (HRP-WGA) en relación con la actividad epiléptica y los efectos que puede producir un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre el transporte axonal en los procesos de propagación y generalización de dicha actividad.

CAPITULO I

KINDLING

1.1 Modelo Experimental de Epilepsia

La inducción de crisis generalizadas mediante la estimulación eléctrica focal, fue muy utilizada por numerosos investigadores en los años 1950s y 1960s. Delgado y Sevillano en 1961, demostraron que la administración repetida de estímulos eléctricos de baja intensidad en el hipocampo, induce una intensificación progresiva de la actividad de las crisis. Sin embargo, fueron Goddard et al. (1969), quienes utilizaron estímulos de baja intensidad y fueron los primeros en describir y cuantificar el efecto kindling y describir su posible aplicación como un modelo experimental de epilepsia, aprendizaje y memoria.

El término kindling se refiere a los cambios conductuales y electroencefalográficos progresivos, que resultan de la estimulación eléctrica repetida en sitios específicos del SNC (Goddard et al., 1969). Dicha estimulación es de baja intensidad (60-150 μ A) y provoca posdescargas que inicialmente son de corta duración (1-5 seg); la frecuencia de las espigas de la posdescarga aumenta y se propaga a otras regiones del cerebro hasta generalizar la actividad epiléptica. Asimismo, los cambios conductuales que acompañan a dichas posdescargas se incrementan en número y en intensidad hasta culminar en crisis convulsivas generalizadas (CCG) tónico clónicas. La actividad epiléptica así producida tiene un carácter permanente, es decir, si se

interrumpen temporalmente las estimulaciones, al reanudarse las CCG se presentarán con un número menor de estimulaciones (Goddard et al., 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 et al., 1969; Talavera et al., 1989).

1.2 Características del estímulo

El tipo de estímulo eléctrico es determinante para el desarrollo del kindling. Un ejemplo comúnmente utilizado consiste en la administración diaria de estímulos de 1 seg de duración con pulsos cuadrados de 1 mseg a una frecuencia de 60 Hz (en el presente trabajo se utiliza este protocolo), estímulos a frecuencias de 25 o 150 Hz son igualmente efectivos para el desarrollo del kindling. En contraste, estímulos de baja frecuencia (i.e., pulsos menores de 10 Hz) no son suficientes (Goddard et al., 1969). Sin embargo, estímulos de larga duración (60 seg) y baja frecuencia (menor de 0.875 Hz) puede 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 desarrollo del kindling. Estímulos (pulsos de 1 mseg a 60 Hz durante 1 seg) administrados a intervalos de 1 día o más, inducen el kindling. Sin embargo, los animales estimulados a intervalos de 12 hr 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 que se produzca el fenómeno del kindling (Goddard et al., 1969; Racine et al., 1973).

1.3 Región cerebral

El número de estímulos necesarios 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 desarrollado fácilmente, se encuentran localizadas principalmente en el sistema límbico. El orden descendente de susceptibilidad de varias estructuras cerebrales, fue caracterizado conductualmente por primera vez por Goddard et al. (1969) de la siguiente manera: amígdala, globo pálido, corteza piriforme, área olfatoria, neocorteza anterior, corteza entorhinal, bulbo olfatorio, área septal, área preóptica, caudado putamen e hipocampo (tabla 2). Por otra parte, se ha demostrado que en el núcleo rojo, sustancia nigra, cerebelo, formación reticular, la sustancia gris central, los núcleos ventrales del tegmento y en el tectum mesencefálico no es posible producir el kindling (Goddard et al., 1969).

1.4 Aspectos filogenéticos

El kindling puede ser establecido en numerosas especies, como son: rana, lagarto, ratón, rata, conejo, perro, gato, mono Rhesus, gerbil y mandril (Morrell y Tsura, 1976; Rial y Gonzalez, 1978; Leech y McIntyre, 1976; Goddard et al., 1969; Stach et al., 1978; Wauquier et al., 1979; Wada et al., 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 filogenéticamente menos evolucionadas (Wada,1978). Independientemente del sitio de estimulación empleado en mamíferos, el kindling ocurre más rápidamente en la rata, seguida por el gato, mandril y mono (tabla 3).

TABLA 2. Número de estímulos requeridos para producir la primera crisis convulsiva generalizada, en diferentes regiones cerebrales.

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

TABLA 3. Tiempo aproximado para el desarrollo del kindling

ESPECIES	DÍAS
ESTIMULACIÓN AMIGDALINA	
Rata	8-12
Gato	20-30
Mandril	16-70
Mono	150-200
ESTIMULACIÓN NEOCORTICAL ANTERIOR	
Rata	35-40
Gato	60-70
Mandril	300

Tomada de Joy,1985.

1.5 Cambios conductuales

La expresión conductual que acompaña a la actividad electroencefalográfica, durante el desarrollo del kindling en la rata, 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. Sin embargo, estimulaciones subsecuentes inducen progresivamente una mayor complejidad de la expresión conductual y electroencefalográfica, terminando con la presencia de CCG. Cuando se manifiesta la primera CCG el comportamiento que presentan los animales estimulados parece ser un resumen de todos los estadios conductuales previos. Los animales, previamente sometidos al proceso del kindling y que se dejan sin estimular por un periodo de 12 meses, pueden responder a uno de los dos primeros estímulos eléctricos con una CCG (Wada et al., 1974). En el presente estudio se usará la clasificación de Racine (1972b) ya que es la más conocida, utilizada y refleja claramente una evolución conductual del proceso de epileptización.

1.6 Ventajas

El kindling eléctrico ofrece varias ventajas para su estudio, al ser comparado con otros modelos experimentales de epilepsia: 1) se puede inducir por la estimulación de un área específica del cerebro; 2) presenta un desarrollo gradual y progresivo, el cual

TABLA 4. Patrones conductuales durante el desarrollo del kindling amigdalino en rata.

ESTADIO	RACINE, 1972 b	JOY, 1985
0		No hay una respuesta clara a la estimulación
1	Cierre del ojo ipsilateral, retracción, quieta	Cierre del ojo ipsilateral, clonus facial, olfateo, masticación
2	Masticación, balanceo de la cabeza, búsqueda, automatismos	Movimientos vigorosos de masticación, balanceo de la cabeza, clonus del cuello
3	Sacudidas, Clonus de las extremidades anteriores	Clonus unilateral o bilateral de las extremidades anteriores
4	Posición de canguro con clonus	Levantamiento sobre las patas posteriores con una extensión casi vertical del cuerpo
5	Clonus con caídas	Levantamiento, seguido por la pérdida de equilibrio y caída
6		Levantamiento y caídas repetidas
7		Ataque de carrera similar al provocado por estimulación audio génica, 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: Los estadios conductuales son progresivos y contienen los estadios previos. Tomada de Joy, 1985.

puede ser caracterizado por diferentes fases conductuales y electroencefalográficas; 3) produce cambios que son irreversibles y permanentes; 4) su desarrollo gradual permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos y bioquímicos que acompañan a la evolución del proceso epiléptico (Goddard y et al., 1969; Racine, 1972 a y b; Vindrola et al., 1981; Cain, 1989; Talavera et al., 1989; Cain et al., 1990; Kamphuis et al., 1990; During et al., 1992; Hernández y Condés-Lara, 1992).

1.7 Cambios en la función y en la conectividad neuronal

El kindling provoca cambios evidentes en el funcionamiento neuronal, los cuales pueden encontrarse en el sitio primario de estimulación y en otras regiones del cerebro (sitios secundarios) (Joy, 1985). Los cambios más evidentes en el sitio primario de estimulación son: 1) la reducción del umbral para provocar una posdescarga durante la evolución del kindling y su estabilidad cuando alcanza la CCG (Racine, 1972a); 2) el incremento de la duración de la posdescarga durante el kindling (Burnham, 1975) (ver figura 1); y 3) y el aumento gradual de la complejidad en la morfología de las posdescargas (Racine, 1972b).

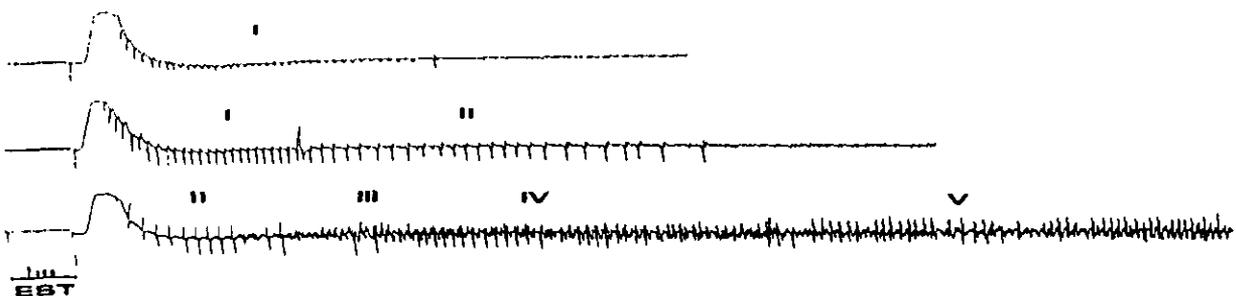


Figura 1. Registro de la actividad eléctrica cerebral en una rata, inducida por la estimulación eléctrica en el núcleo basolateral amígdalino izquierdo, en el cual quedó establecido el fenómeno del kindling (fase V). El primer trazo corresponde a una estimulación número 8 y el tercer trazo a una estimulación número 15. Los números romanos significan las etapas conductuales que el animal presentó.

Las áreas de proyección primaria de los sitios de estimulación van reclutándose en los cambios electrofisiológicos descritos. Las posdescargas llegan a ser más prominentes y complejas en los sitios secundarios hasta poder ser registradas en cualquier área del cerebro ante una crisis generalizada (Racine, 1972b). Este efecto, en las áreas de proyección primarias, se ha denominado transferencia e indica que el desarrollo progresivo del kindling facilita el establecimiento de focos secundarios, en donde se requiere menor número de estímulos para producir una CCG (Goddard et al., 1969; Racine 1972b; Burnham, 1975). Este efecto de transferencia fue descrito por Goddard et al. (1969) quienes reportaron que el kindling eléctrico de la amígdala, activa subsecuentemente a la amígdala contralateral. Sin embargo, trabajos recientes realizados por Fernández-Más et al. (1992) han demostrado que durante el kindling eléctrico amigdalino la corteza prefrontal del gato se activa antes que la amígdala contralateral.

De este modo, el kindling produce cambios permanentes en la función neuronal de otras estructuras como resultado de las interconexiones entre las regiones involucradas. Se ha considerado que estos cambios pueden tener un correlato morfológico (a largo plazo) o neuroquímico (inmediato y a largo plazo). Los cambios que pudieran estar involucrados son la formación de nuevas conexiones sinápticas o el reordenamiento de conexiones preexistentes (Goddard et al., 1969; McNamara et al., 1980). Con el empleo de técnicas de microscopía tanto óptica como electrónica se han descrito algunos cambios morfológicos como son: alteraciones en la arquitectura sináptica, reorganización de las conexiones sinápticas de las fibras musgosas del

hipocampo, muerte o pérdida neuronal en poblaciones neuronales específicas del sistema límbico (Sutula et al., 1994; McNamara, 1995). Sin embargo, todos estos cambios presentan una gran variabilidad en relación al origen y tipo de epilepsia y algunos autores los consideran como poco consistentes (McNamara et al., 1980; Girgis, 1981; Joy. 1985).

Otros mecanismos que han sido involucrados en la formación de focos epilépticos secundarios son el transporte axonal y la síntesis proteínica; los cuales han sido poco estudiados y hablaremos de ellos más adelante.

CAPITULO II

AMIGDALA

2.1 Generalidades

La amígdala cerebral es una estructura con forma de almendra, que se encuentra localizada por debajo del manto cortical de la tercera circunvolución del lóbulo temporal. Esta región está interconectada con la corteza cerebral, el sistema olfatorio y el sistema estriatal, así como con algunas regiones del tálamo e hipotálamo (De Olmos et al., 1985). Se ha descrito que la amígdala participa en la modulación de funciones endocrinas 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).

Como se mencionó en el apartado anterior, el número de estímulos necesarios para el desarrollo del kindling varía de acuerdo con la región, siendo la amígdala la región que requiere menor número de estímulos, por lo que en este estudio se utilizó el kindling eléctrico amigdalino y en este capítulo se hará una amplia descripción de esta estructura. Los estudios iniciales de Goddard et al. (1969) no encontraron ninguna diferencia entre los diferentes núcleos amigdalinos, sin embargo el grupo de Le Gal La Salle (1981) reportó que el área amigdalina anterior evoluciona más rápido a las CCG que áreas más posteriores.

2.2 Complejos amigdalinos

Con base en estudios morfológicos y de trazado de vías neuronales por medio de métodos histoquímicos, se ha establecido las siguientes divisiones en el complejo amigdalino (De Olmos et al., 1985):

OLFATORIO: este grupo está formado por el área de la amígdala anterior (AA), el núcleo del tracto olfatorio lateral (TOL), el extremo dorsal del núcleo amigdalino medial (Me), los núcleos amigdalinos corticales 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 del lecho de la estría terminalis (BST).

CENTRAL: incluye el núcleo central de la amígdala (Ce) y la porción dorso lateral de la sustancia sublenticular inominata, así como las divisiones lateral y ventral del núcleo del lecho 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 particular, el núcleo basolateral (BL) ya que interconecta ambos complejos amigdalinos (Leonard y Scott, 1971; Hamilton, 1976; Niteka et al., 1981) y a la corteza prefrontal medial (Krettek y Price, 1977; Ottersen, 1982; Cassell y Wright, 1986; Kita y Kitai, 1990; McDonald, 1987, 1991; Granato, 1991). Éste se subdivide en los núcleos basolateral anterior (BLA) y basolateral posterior (BLP). El núcleo BL alcanza los límites rostro caudales del complejo basolateral, rostralmente se encuentra localizado cerca de los núcleos La, BM y BLV (figura 2), 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 un nivel caudal, cerca de la salida de la estría 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 y Watson, 1982; De Olmos et al., 1985).

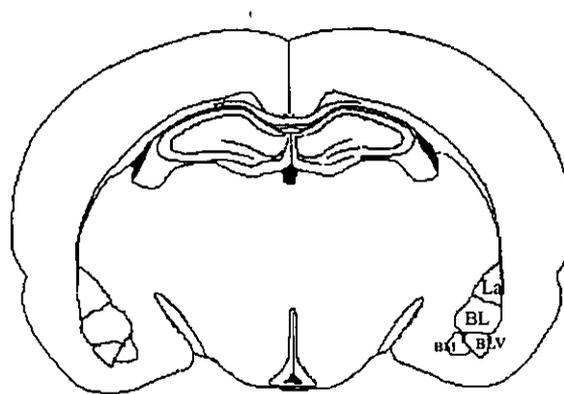


Fig. 2. Localización esquemática del complejo basolateral amigdalino (AP 6.2 mm, línea interaural). Núcleos: lateral (La), basolateral (BL), basolateral ventral (BLV) y basomedial (BM). Tomado de Paxinos y Watson (1982)

2.3 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 corticomediales. 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 cortical posteromedial 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; Kelley et al., 1982; Canteras et al., 1992, 1995).

La corteza prefrontal medial es considerada el principal sitio de proyecciones recíprocas cortico-amigdalinas (Cassell y Wright, 1986; Ottersen, 1982). 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 en comparación con el contralateral. Sin embargo, no se ha descrito el curso de las fibras de proyección recíprocas entre la amígdala y ambos lados de la corteza prefrontal medial en particular a través de la comisura anterior. Siendo ambas estructuras (el núcleo basolateral amigdalino y la corteza prefrontal medial) componentes claves en el llamado "circuito límbico basolateral" y a los cuales se les ha atribuido un papel conjunto en el aprendizaje y la memoria (revisar Cassell y Wright, 1986).

La comisura anterior consta de dos divisiones: una anterior y otra posterior (Figura 4), formadas de fibras delgadas, tanto mielínicas como amielínicas.

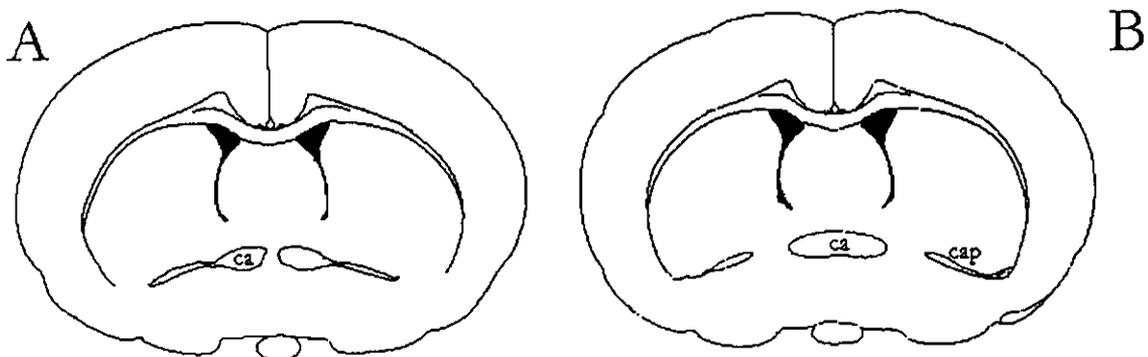


Fig. 3. Esquemas representativos de la localización de la comisura anterior. A) Comisura a un nivel rostral (AP 9.2 mm, línea interaural), donde se observa únicamente la división anterior. B) Comisura a un nivel caudal (AP 8.7 mm, línea interaural), donde se observan ambas divisiones anterior y posterior. Ca= comisura anterior, Cap= comisura anterior posterior (Paxinos y Watson, 1982).

La división anterior deriva primordialmente 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).

Tomando en cuenta todas las interrelaciones descritas y con la finalidad práctica del estudio que aquí se presenta, se tiene que señalar que está bien establecido que el desarrollo progresivo del kindling facilita el establecimiento de focos epilépticos secundarios (Goddard et al., 1969; Racine, 1972b; Burnham, 1975) de tal forma que el kindling eléctrico amigdalino involucra la amígdala contralateral (Goddard et al., 1969). Por consiguiente la propagación interamigdalina de la actividad epiléptica para la generación de un foco epiléptico secundario, podría estar dada a través de la comisura anterior.

Sin embargo, las conexiones interamigdalinas mediante el componente comisural, han sido ampliamente discutidas por diferentes grupos de investigación. Por un lado, se ha descrito que mediante este componente se interconectan ambos complejos amigdalinos (Hamilton, 1976; Canteras et al., 1992). 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. Las investigaciones que demuestran la conexión ínteramigdalina mediante la comisura anterior, involucran únicamente a los núcleos medial y cortical posteromedial (Hamilton, 1976; Canteras et al., 1992). En relación al núcleo basolateral, únicamente 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, en la comunicación ínteramigdalina, mediante las fibras comisurales. Lo anterior se fundamenta con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo (Martínez-Lorenzana G, 1998), en el cual se muestra claramente que las fibras que conectan a la amígdala con otras estructuras pasan por la parte superior de la comisura anterior; y 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. No obstante, es necesario emplear una metodología diferente para poder dilucidar detalles sobre el origen y término de esta conexión; ya que esta vía podría ser de gran importancia para la generación de un foco epiléptico secundario.

2.4 Trazado de vías

Los estudios neuroanatómicos del sistema nervioso han avanzado durante las dos últimas décadas, en gran parte debido al desarrollo de nuevas técnicas, una de éstas es el empleo del transporte axonal (figura 4) para establecer conexiones en el SNC. Anteriormente, las proyecciones neuronales eran establecidas mediante la

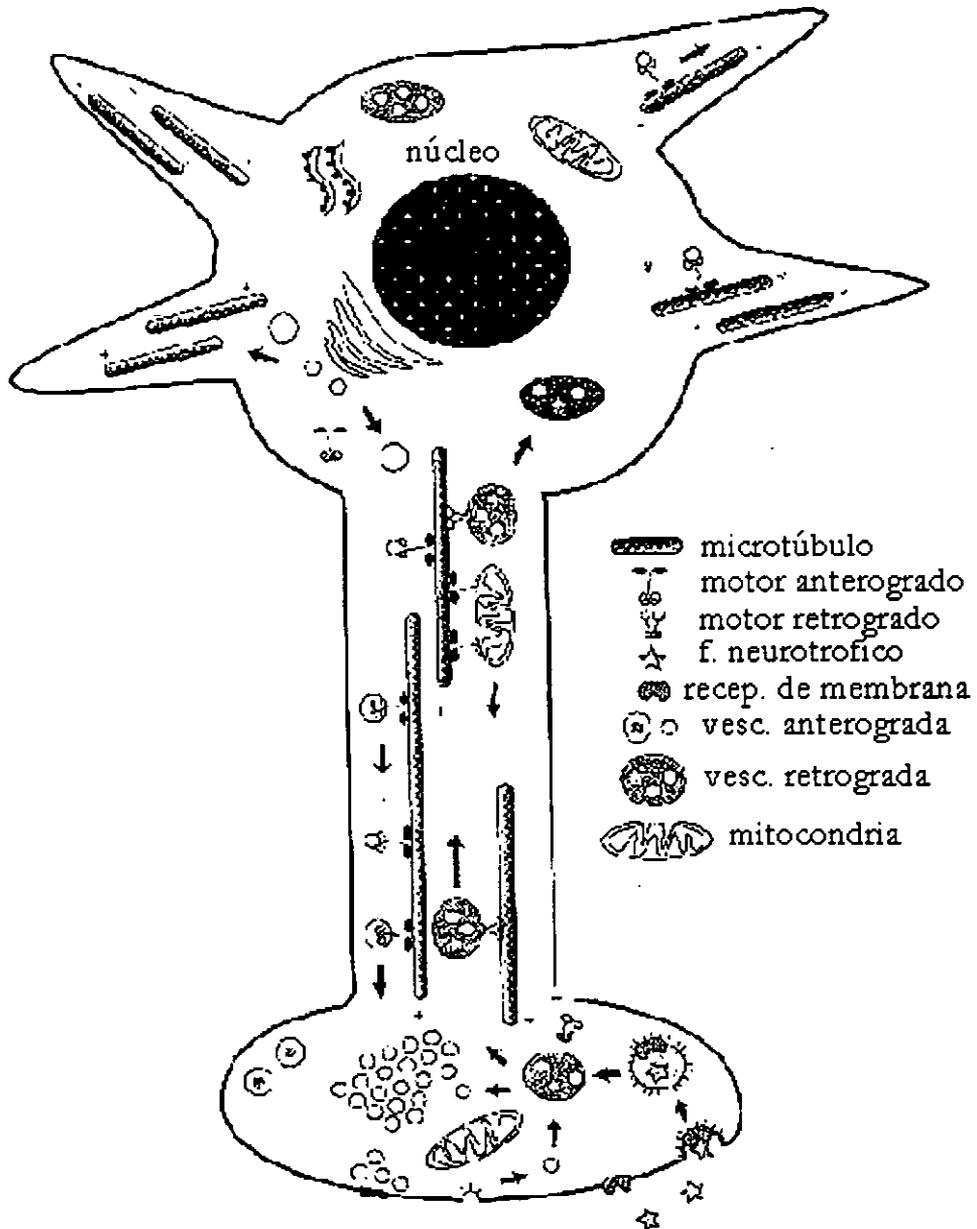


Figura 4. Esquema de una neurona en el que se puede observar el transporte anterógrado, desde el cuerpo celular hacia la terminal nerviosa, y el transporte retrógrado de la terminal nerviosa hacia el cuerpo celular (Brady et al., 1999).

degeneración de los axones, localizando únicamente los sitios de terminación de estos (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 del trazado autorradiográfico de proteínas, después de haber administrado aminoácidos o azúcares (precursores de glicoproteínas) marcados radioactivamente; por ejemplo prolina y leucina tritiada. Asimismo, la localización de los cuerpos celulares pertenecientes a terminales específicas pueden ser identificados mediante 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 están ubicados 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 (figura 5).

La detección histoquímica de la HRP, se utiliza como una técnica neuroanatómica en el trazado de vías neuronales en el SNC (Mesulam, 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.

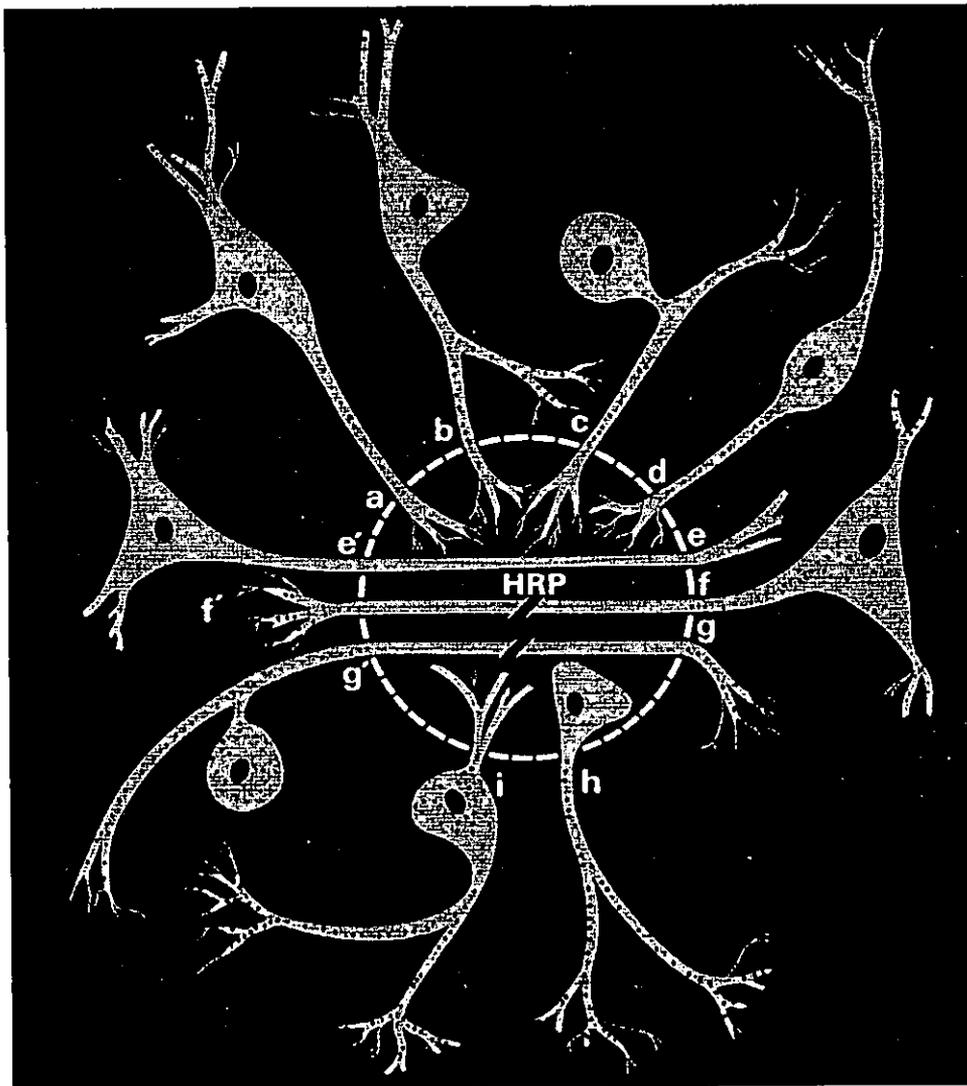


Figura 5. Diferentes tipos de transporte de HRP: a) captura en terminales intactas; b) captura en terminales y colaterales; c) en célula ganglionar; d) en neurona bipolar; e) axón íntegro (no hay transporte); f) y g) en axón lesionado; h) en cuerpo neuronal e i) en dendritas. Las líneas discontinuas demarcan el sitio de inyección y los puntos el marcaje de la HRP-WGA. Tomado de Mesulam, 1982.

CAPITULO III

HIPEREXCITABILIDAD Y TRANSPORTE AXONAL

Como se mencionó en el apartado anterior, estudios neuroanatómicos han empleado el transporte axonal con la finalidad de encontrar conexiones en el SNC (Mesulam, 1982). Sin embargo, 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).

Asimismo, 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 captura (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 y Brightman, 1979; Nishino et al., 1979).

El kindling es un proceso dinámico durante el cual las conexiones sinápticas y demás mecanismos asociados se activan. Estos cambios sinápticos son un punto importante para investigar los mecanismos de hiperexcitabilidad neuronal en el kindling, ya que las modificaciones de estas sinapsis pueden representar alteraciones en la

eficacia de sinapsis preexistentes y/o en la formación de nuevas sinapsis (i.e. formación de conexiones que no existen en el cerebro normal o cambios muy notables en el número de tales sinapsis) (McNamara, 1995).

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 exocitosis, de 0.7% (en controles) a 11.4% (en ratas kindling), así 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 él

transporte axonal, pero mantiene intacta la transmisión eléctrica, 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 en la rana el kindling requiere del transporte axonal para que se desarrolle un foco epiléptico secundario, siendo este un paso fundamental en la propagación y generalización de la actividad epiléptica, es decir para su desarrollo.

Sin embargo, no han sido establecidos incrementos en el marcaje de ningún trazador neuronal por medio del transporte axonal relacionados con la hiperexcitabilidad neuronal producida por algún modelo de epilepsia experimental (Divac et al., 1984). Pero nuestro grupo de trabajo ha demostrado la relación entre el marcaje a través del transporte axonal y la hiperexcitabilidad neuronal producida por el kindling (Martínez-Lorenzana G., 1998). En este estudio se analizó el transporte del trazador peroxidasa de rábano conjugada a la lectina de germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales y en los núcleos del lecho de la estría terminalis. Así como en la amígdala izquierda (contralateral al sitio de inyección) y en la corteza del cíngulo ipsi y contralateral, tanto en ratas íntegras durante el desarrollo del kindling como en ratas epileptizadas que presentaron diez crisis convulsivas generalizadas (10 CCG). Nuestros resultados señalan que existe un incremento en el transporte axonal, valorado como un aumento en la densidad del marcaje presente en las fibras y en el número de neuronas marcadas, a un tiempo similar, al ser comparados con los grupos control y falso operado, a partir de la fase 4, en relación con el progreso de la epilepsia experimental

por el kindling eléctrico en el núcleo basolateral amigdalino.

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. Sin embargo, únicamente han sido evaluados cambios del transporte axonal en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis, a partir de valoraciones cualitativas en la densidad de fibras marcadas. Por ello será indispensable aplicar un método de análisis de imágenes que nos permita analizar de una manera cuantitativa los cambios del transporte axonal en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis, en animales epileptizados. Esto último ha sido parte del trabajo realizado en la presente tesis.

CAPITULO IV

KINDLING Y SINTESIS DE PROTEINAS

Se conoce que la síntesis de proteínas es indispensable para mantener la integridad estructural y funcional del SNC. Y se ha descrito que este mecanismo celular se encuentra implicado en la plasticidad neuronal (Greenough et al., 1994; Kelly, 1994; Role et al., 1994).

La plasticidad neuronal aquí referida, esta dada por cambios morfológicos a nivel de la sinapsis, los cuales han sido clasificados en dos tipos: 1) alteraciones de estructuras sinápticas preexistentes y 2) la formación de nuevas sinápsis (Greenough et al., 1994). Entre las alteraciones de estructuras sinápticas preexistentes se encuentran las siguientes: a nivel presináptico puede haber modificaciones en el tamaño y en la forma de la sinapsis, así como en el número o distribución de las vesículas cercanas a la zona activa. En relación a la región postsináptica se han visto modificaciones tanto en el tamaño y la forma, así como densidades perforadas asociadas al conglomerado vesicular y también se han visto unidades poliribosomales (Greenough et al., 1994) ver figura 6.

La posibilidad de que el kindling eléctrico se encuentre asociado a modificaciones estructurales, se deriva de las siguientes observaciones: un incremento en las dimensiones de las terminales axónicas presinápticas y de las espinas dendríticas postsinápticas; decremento en la densidad de vesículas sinápticas;

incremento en las dimensiones de la cabeza y tallo de las espinas dendríticas; en la proporción relativa de sinápsis axoespinosas perforadas y en el número de contactos sinápticos rodeando el tallo dendrítico por unidad de área (revisar Geinisman et al., 1993).

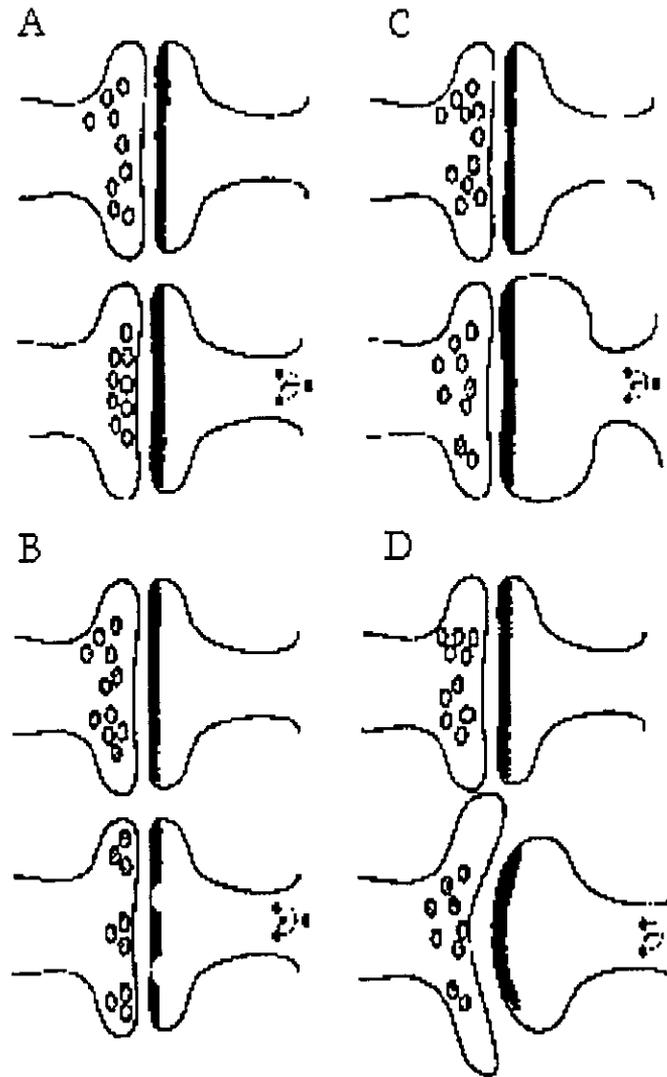


Figura 6. Representación esquemática de los cambios morfológicos y ultraestructurales en el complejo sináptico, implicados en la plasticidad neuronal. En cada uno de los esquemas (A, B, C y D) en la parte superior esta representada una terminal sináptica "normal" y en la parte inferior la terminal con cada uno de los cambios plásticos. A) agregación vesicular en la membrana presináptica y expresión de polirribosomas en la base de la espina postsináptica ; B) densidad presináptica perforada y la asociación de grupos vesiculares; C) alteraciones en la forma y tamaño de la postsinapsis y D) cambios en la morfología de la pre y postsinapsis. Greenough et al., 1994.

La relación entre cambios plásticos inducidos por estimulación eléctrica y la síntesis proteínica, ha sido poco investigada (Fifková et al., 1982; Jones et al., 1992), por consiguiente, no se sabe si el kindling eléctrico produce alteraciones estructurales que requieren de la síntesis proteínica. Probablemente el único dato, es el que al aplicar inhibidores de la síntesis de proteínas durante el desarrollo del kindling, se ha reportado un retardo de éste, como se describe a continuación.

Morrell et al. (1975), estudiaron el efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas; la cicloheximida, durante el proceso del kindling en la rana. Los resultados muestran que la cicloheximida bloquea los incrementos de la duración de la posdescarga durante el desarrollo del kindling. También se han analizado en ratas y ratones los efectos de la cicloheximida y anisomicina en el kindling eléctrico amigdalino y la posible relación de éste con la síntesis de proteínas, y se ha demostrado que ambos antibióticos además de inhibir la síntesis proteínica, retardan el establecimiento del kindling. Siendo este retardo explicado como un efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas y no a su acción anticonvulsiva (Jonec y Wasterlain, 1979; Cain et al., 1980).

Todos estos resultados sobre la síntesis de proteínas y los antes mencionados sobre el transporte axonal, señalan la participación de ambos procesos en el establecimiento del kindling. Por lo que es importante analizar los efectos que pueda provocar un inhibidor de síntesis de proteínas sobre el transporte axonal, valorado por la densidad de marcaje de algún trazador neuronal en el kindling eléctrico amigdalino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se señaló, el kindling requiere tanto de la síntesis de proteínas como del transporte axonal para que se desarrolle un foco epiléptico secundario (Morrell et al., 1975; Morrell y Morell, 1983), siendo este un paso fundamental para la propagación y la generalización de la actividad epiléptica. Además, se ha establecido que cuando se aplican inhibidores de la síntesis de proteínas, como es el caso de la cicloheximida y anisomicina, hay un retardo en el desarrollo del kindling, sugiriendo que la síntesis de proteínas tiene relación con el establecimiento del kindling (Morrell et al., 1975; Jonec y Wasterlain, 1979; Cain et al., 1980).

En esta situación y tomando en cuenta los antecedentes, esta tesis pretende demostrar: 1) que la vía que comunica los núcleos basolaterales de ambas amígdalas pasa por la comisura anterior; 2) que existe una relación cuantitativa entre el desarrollo del kindling amigdalino y la densidad del marcaje del transporte axonal de la HRP-WGA y 3) que un inhibidor de síntesis de proteínas, la cicloheximida, produce una disminución del marcaje de HRP-WGA y retrasa los estadios conductuales que caracterizan el desarrollo y la evolución de la epilepsia experimental.

HIPOTESIS

De los antecedentes presentados se desprende que el kindling requiere de la síntesis de proteínas y del transporte axonal para el desarrollo de un foco epiléptico secundario. Siendo ambos procesos fundamentales para la propagación y generalización de la actividad epiléptica. Tomando en cuenta que el kindling eléctrico amigdalino involucra la amígdala contralateral para el desarrollo de un foco epiléptico secundario, se plantean las siguientes hipótesis:

- 1) La conexión íteramigdalina del núcleo basolateral mediante la comisura anterior existe y participa en la propagación del kindling eléctrico amigdalino.
- 2) El transporte axonal se modifica como consecuencia y tiene relación con el desarrollo del kindling amigdalino.
- 3) La inhibición de la síntesis de proteínas por la cicloheximida produce un retardo en el establecimiento del kindling con una disminución en el marcaje de HRP-WGA.

OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este trabajo son:

- 1) Efectuar lesiones en la comisura anterior a los animales. Inyectar algunos animales con HRP-WGA en esta misma estructura y otros inyectarlos en el núcleo basolateral amigdalino (BL). Analizar el número de neuronas marcadas en los complejos amigdalinos. En esta situación se podrá mostrar que la interconexión del BL es por medio de la comisura anterior.

- 2) Implementar un análisis cuantitativo para evaluar la densidad de marcaje presente en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis (AP 8.7 mm, línea interaural), mediante el programa scion-imagen, en animales control, falso operado y con 10 CCG.

- 3) Analizar el efecto de la cicloheximida en el desarrollo del kindling eléctrico amigdalino, mediante la administración por vía subcutánea, previa de ésta a cada estimulación y con un tratamiento crónico, precediendo al inicio del kindling.

- 4) Observar las posibles modificaciones en el transporte axonal, determinado por la densidad de marcaje del trazador peroxidasa de rábano conjugado con la aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA) ocasionadas por la cicloheximida, a lo largo de la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis; así como en el complejo amígdalino izquierdo (contralateral al sitio de inyección) y en ambos lados

de la corteza prefrontal medial, en las últimas fases del kindling (fases 4 y 5) y en animales que presenten 10 CCG. De esta forma podremos obtener resultados que indiquen la participación del transporte axonal, síntesis de proteínas y desarrollo conductual del kindling amigdalino.

MATERIAL Y METODO

Animales Experimentales.

Se utilizaron 170 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*. En este trabajo, únicamente se consideró a los animales en los que el sitio de inyección de HRP-WGA se localizó en el lugar correcto y con un tamaño similar que permitiera comparar los resultados (ver figura 9) y alcanzar las n descritas en cada experimento.

Para el cumplimiento de los objetivos antes mencionados, se optó por dividir el trabajo y los grupos experimentales de la siguiente manera:

EXPERIMENTO I

ANALISIS DE LA CONEXIÓN INTERAMIGDALINA DEL NÚCLEO BASOLATERAL A TRAVÉS DE LA COMISURA ANTERIOR.

Para su estudio los animales fueron agrupados como se describe a continuación:

Grupo A (n=6): Animales a los cuales se les inyectó HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho y se mantuvo íntegra la comisura.

Grupo B (n=6): Animales con lesión en cuerpo calloso y fórnix e inyección de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho.

Grupo C (n=6): Animales con lesión en la comisura anterior e inyección de HRP-WGA en esta misma región.

Grupo D (n=8): Ratas con lesión en la comisura anterior, y con inyección de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho.

Lesión en comisura anterior

Las intervenciones quirúrgicas para realizar la lesión en la comisura anterior, 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 realizó la lesión en la comisura mediante el desplazamiento de una aguja del número 21, esta aguja estaba montada en una torre micrométrica para estereotáxico. Se utilizaron las coordenadas estereotáxicas siguientes: anterior 8.7 ± 0.5 mm; lateral 0 mm; altura 3.0 ± 0.5 mm; línea interaural (Paxinos y Watson, 1982). El seno venoso sagital fue desplazado cuidadosamente para efectuar estas maniobras.

Lesión en cuerpo calloso y fórnix

Las intervenciones quirúrgicas para realizar la lesión en cuerpo calloso y fórnix, 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 realizó la lesión en estas estructuras mediante una aguja del número 21, esta aguja estaba montada en una torre micrométrica para estereotáxico. Se utilizaron las coordenadas estereotáxicas siguientes: anterior 8.7 ± 0.5 mm; lateral 0 mm; altura 1.5 ± 0.5 mm; línea interaural (Paxinos y Watson, 1982). Las lesiones de estas estructuras se efectuaron únicamente en estas coordenadas.

Inyección del complejo HRP-WGA

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 una micropipeta de vidrio con una punta de diámetro de 10-20 micras. Esta micropipeta estaba unida a una jeringa Hamilton de un microlitro y acoplada a un vernier manual, el que permitía un desplazamiento controlado del embolo de la jeringa, montado 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. Esta maniobra fue posible mediante un vernier acoplado a la jeringa Hamilton.

La inyección se realizó en el núcleo basolateral amigdalino derecho, siguiendo las coordenadas esterotáxicas de Paxinos y Watson (1982) (anterior 6.2 mm; lateral derecho 5 mm; altura 1.5 mm; línea interaural) y para la inyección en comisura anterior, se utilizaron las siguientes coordenadas: anterior 8.7 mm; lateral 0 mm; altura 3.0 mm; línea interaural. Después de 30 seg de haber inyectado los 15 nanolitros de HRP-WGA se retiró la micropipeta, el trepano se selló con cera de hueso y se suturó la piel con hilo quirúrgico estéril. Una vez terminado el procedimiento, los animales fueron sometidos a un período de sobrevivencia de 48 h.

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

Fijación y obtención del cerebro

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se fijaron por perfusión vía intracardiaca con 250 ml de solución salina, 250 ml de solución fijadora (paraformaldehído 5%, glutaraldehído 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. El período de post-fijación fue de 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, para su crioprotección.

Cortes histológicos del cerebro

Los cerebros fueron cortados en un micrótopo de congelación. A efecto de identificar cada lado se realizó un corte posterior al nivel de puente y una muesca a lo largo del hemisferio 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 11.7 mm (un corte cada 80 micras) hasta 3.7 mm y de ahí hasta 1.2 mm (un corte cada 120 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 (H₂O₂) como substrato 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 0.2M (pH 3.3) y 100 mg de nitroprusiato de sodio.

Solución B: 5 mg de tetrametilbenzidina 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, en el que se mezcló la Solución A con la Solución B en los cortes de tejido flotados. Estos 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, adicionando 3 ml de H₂O₂ 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 gelatinizados.

Contratinción

Todos los cortes fueron contrateñidos con Safranina al 0.1%, 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 (etanol al 70%, 95%, 100%, 100% y xilol) y se montaron con resina sintética.

Análisis histológico y estadístico

El análisis de los cortes se llevó a cabo por microscopía de luz fotónica a aumentos de 100x y 400x. Luego de confirmar la lesión a un nivel rostral y caudal de la comisura anterior, se eligieron al azar los cortes de cada una de las regiones para la toma de fotografías. La cuantificación de neuronas marcadas con HRP-WGA, de ambas amígdalas (dependiendo del grupo experimental) se realizó por el mismo experimentador sin saber a qué rata o a qué tratamiento correspondía cada corte. Como prueba estadística, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Como prueba post-hoc se empleó la prueba de Student-Neuman-Keuls para detectar diferencias en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA, entre los diferentes grupos experimentales: Grupo A: animales a los cuales se les inyectó HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho y se mantuvo íntegra la comisura; Grupo B: animales con lesión en cuerpo calloso y fórnix e inyección de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho; Grupo C: animales con lesión en la comisura anterior e inyección de HRP-WGA en esta misma región y Grupo D: ratas con lesión en la comisura anterior, y con inyección de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho.

RESULTADOS

Los sitios de lesión y de inyección de la HRP-WGA, realizados en las diferentes estructuras, dependiendo de la situación experimental para cada grupo; se muestran en las figuras 7, 8 y 9.

De la cuantificación de neuronas marcadas con HRP-WGA en los diferentes grupos, se observó lo siguiente: En el grupo A se encontró una media aritmética de 16 ± 1.5 neuronas marcadas en la amígdala contralateral al sitio de inyección de HRP-WGA. En el grupo B se detectó una media de 15 ± 1.8 neuronas marcadas también en la amígdala izquierda. En el grupo C se localizó en promedio 13 ± 1.7 neuronas marcadas del lado izquierdo y 15 ± 1.8 del lado derecho. En el grupo D únicamente en dos animales se encontró 1 y 2 neuronas marcadas respectivamente y en los otros seis animales restantes, no se encontró neuronas marcadas en la amígdala izquierda, en promedio este grupo obtuvo un valor medio de 0.4 ± 0.26 , ANOVA, $F=252.7$, $p < 0.0001$. Indistintamente de la situación experimental, la localización de las neuronas marcadas con HRP-WGA fue en el complejo basolateral específicamente en los núcleos basolateral, basomedial y basolateral ventral. Al realizar una comparación múltiple entre los grupos, se observó únicamente una disminución significativa en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en el grupo D, con relación a los demás grupos con una $p < 0.05$, Student-Newman-Keuls, véase la gráfica 10.

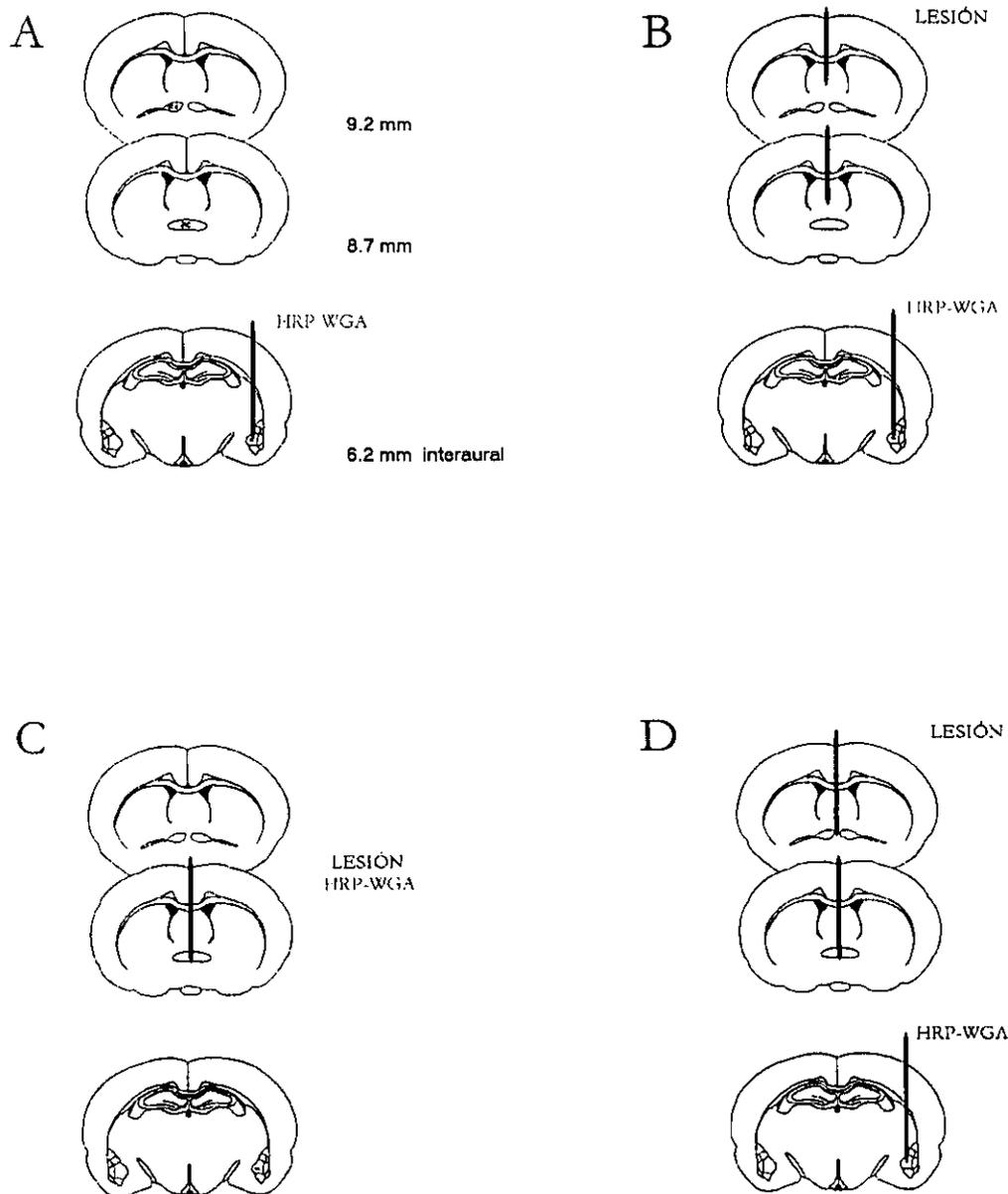


Figura 7. Esquemas de cortes coronales a una antero posterioridad de 9.2 mm y 8.7 mm a un nivel de la comisura anterior (ac) y a 6.2 mm del núcleo basolateral (BL) línea interaural. A) Grupo A: únicamente se realizó la inyección de HRP-WGA en el núcleo BL; B) Grupo B: el cual se lesionó el cuerpo calloso y fórnix e inyección de HRP-WGA en el BL; C) Grupo C: se lesionó e inyectó la comisura anterior y D) Grupo D: en donde se realizó una lesión en ac e inyección de HRP-WGA en el BL.

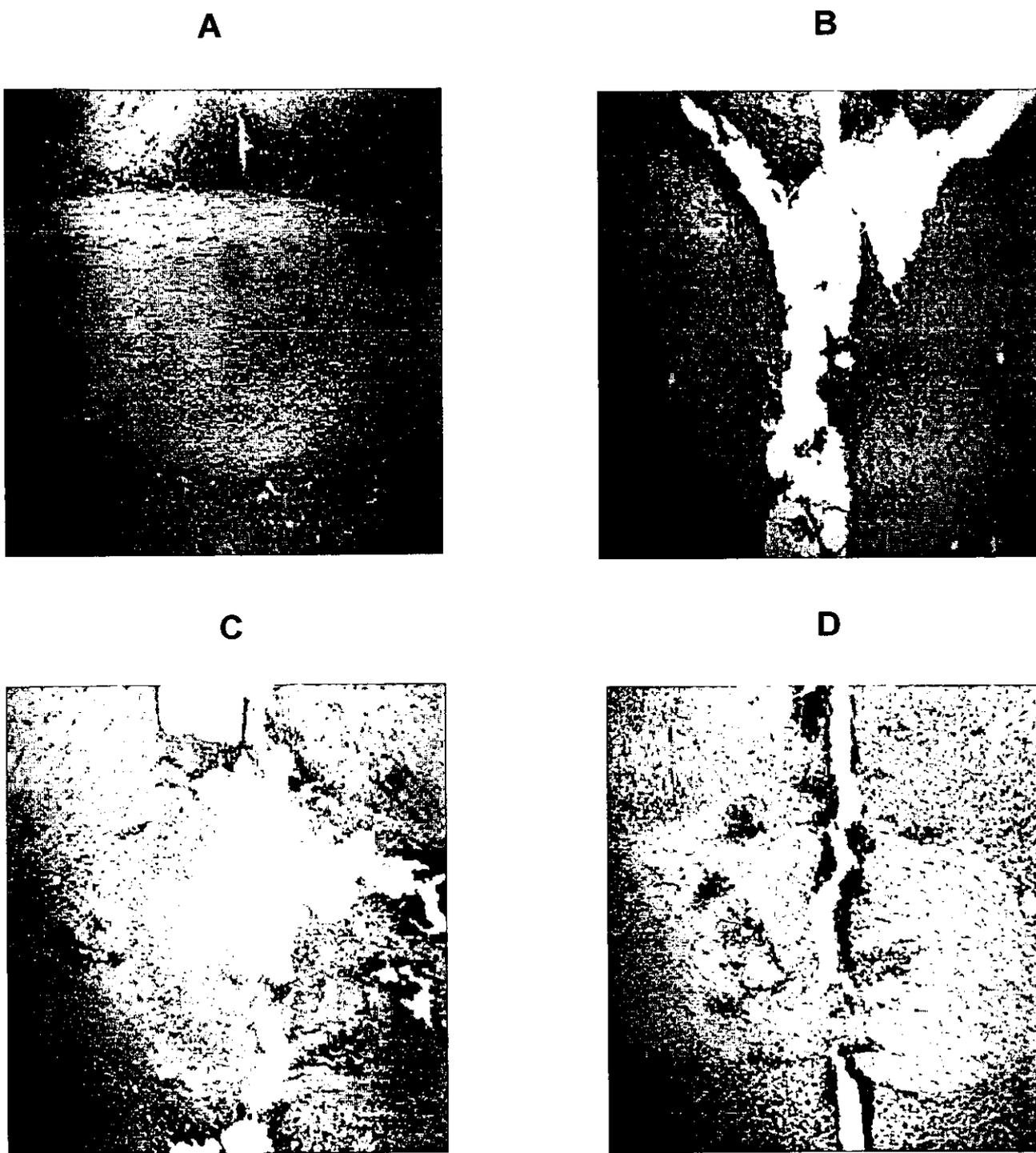


Figura 8. Fotografías de cortes coronales de 40 μm en donde se muestran diferentes niveles de la lesión realizada. A) Muestra a la comisura anterior de manera íntegra; B) se observa la lesión en el fórnix, pasando por el cuerpo calloso; C) y D) muestran la lesión realizada en la comisura anterior.

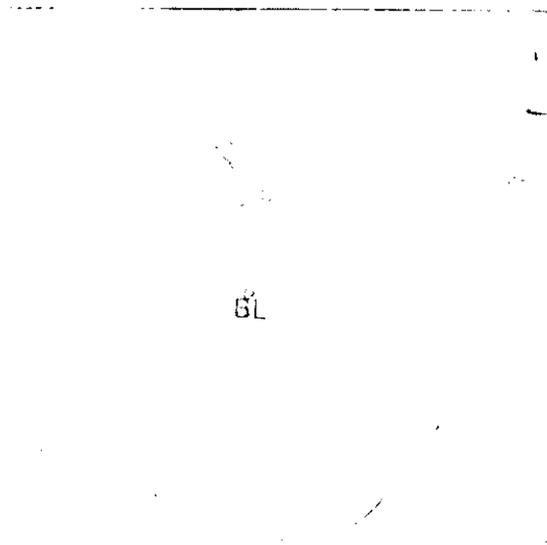
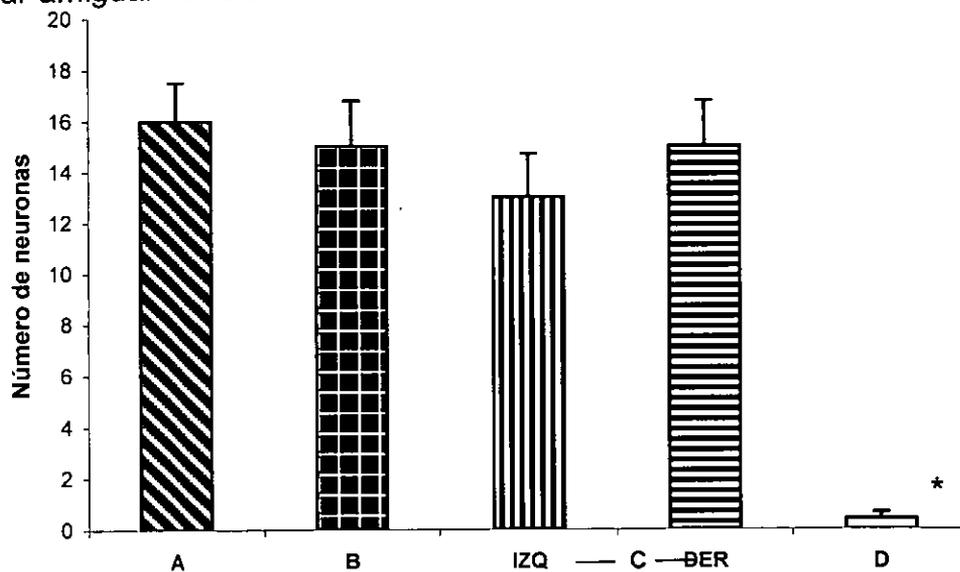


Figura 9. Fotomicrografía del sitio de inyección de la HRP-WGA, en el núcleo basolateral amigdalino. Corte coronal de 40 μ m, contrateñido con safranina al 0.01% (16X).



▨ Representa al grupo A (n=6).

▣ Representa al grupo B (n=6).

▤ ▥ Representa el lado izquierda (IZQ) y (DER) del grupo C (n=6).

□ Representa al grupo D (n=8).

Fig. 10. Muestra el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala, en los diferentes grupos. Los datos están expresados como la media \pm e.e., * $p < 0.05$, Student-Newman-Keuls.

EXPERIMENTO II

CUANTIFICACION DE LA DENSIDAD DEL MARCAJE PRESENTE EN LA COMISURA ANTERIOR Y EN LOS NÚCLEOS DEL LECHO DE LA ESTRÍA TERMINALIS (8.7 MM INTERAURAL): EN EL KINDLING AMIGDALINO ESTABLECIDO.

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

GRUPO CONTROL (n=6): Animales únicamente con inyección de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino derecho.

GRUPO FALSO OPERADO (n=6): Ratas a las que se les implantó un electrodo en el núcleo basolateral izquierdo, pero que no fueron estimuladas.

GRUPO KINDLING (10 CCG) (n=6): Animales implantados con un electrodo en el núcleo basolateral izquierdo y que fueron estimulados hasta presentar diez crisis convulsivas generalizadas.

Implantación 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, vía i.p. Una vez anestesiada la rata, se colocó en el aparato estereotáxico y se le implantó en el núcleo basolateral amigdalino izquierdo un electrodo bipolar trenzado. Utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas

(anterior 6.2 mm, lateral 5 mm, altura 1.5 mm, línea interaural) (Paxinos y Watson, 1982). El electrodo se colocó utilizando 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). El conector se fijó en el cráneo por medio del pegamento super bond y acrílico dental. Una vez concluida 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 de entre 40 y 150 μ 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 40 μ A, la cual fue incrementándose de 10 en 10 μ A, hasta producir una breve posdescarga de varios segundos constituida por 5 a 10

* 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: inmovilidad, giro y cierre del ojo. Este caso se aplica únicamente para animales que no han sido sometidos al proceso de estimulación amigdalina.

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.

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 frecuencia, la duración de las posdescargas y por la conducta de los animales, tomando como referencia los criterios definidos por Racine (1972b).

Inyección del complejo HRP-WGA

Todos los animales, fueron sometidos al mismo procedimiento de inyección. En el caso de los animales Kindling, la HRP-WGA se inyectó inmediatamente después de la última CCG. Se inyectaron en el núcleo basolateral amigdalino derecho 15 nanolitros del complejo peroxidasa de rábano conjugada con la aglutinina de germen de trigo HRP-WGA (sigma), disuelta al 10% con solución salina estéril. Como se indicó en el experimento 1 (ver pagina 36), una vez terminada la inyección, los animales fueron sometidos a un período de sobrevivencia de 48 h. También todo el proceso histológico para el revelado de la HRP-WGA fue mediante el método de Mesulam, como se detalló en el apartado anterior (ver paginas 37-39).

Análisis histológico y estadístico

Para el estudio de la densidad del marcaje en la comisura anterior (ac), núcleos medial (BSTM) y lateral (BSTL) del lecho de la estría terminalis, se tomaron fotomicrografías (100X) en campo oscuro a un nivel de 8.7 mm interaural de estas regiones. Se hicieron las reconstrucciones de las estructuras y se prepararon fotomontajes, los cuales fueron escaneados y analizados en escala de grises en el programa Scion-imagen. Se obtuvieron los histogramas en escala de grises de cada una de las regiones analizadas, de tal forma que este método permitió la valoración de la cantidad de marcaje de HRP-WGA. Se utilizó una estadística no paramétrica, al no obtenerse una distribución normal. Se aplicó la prueba de análisis de varianza por rangos con el criterio de clasificación de Kruskal-Wallis, para detectar las diferencias de marcaje en las estructuras analizadas. El método de pos-hoc de comparación múltiple fue el de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

Cuando los grupos Control y Falso Operado fueron comparados, no se encontró ninguna diferencia significativa en el marcaje de HRP-WGA. El grupo Kindling presentó un mayor marcaje con respecto al resto de los grupos en la comisura anterior ($H=30.8$, $g.l=2$, $p<0.0001$, Kruskal-Wallis) y en ambos lados ipsilateral ($H=57.7$, $g.l=2$, $p<0.0001$, Kruskal-Wallis), y contralateral ($H=66.7$, $g.l=2$, $p<0.0001$, Kruskal-Wallis) de los núcleos BSTM y BSTL, $p<0.05$, Student-Newman-Keuls. Las diferencias en el marcaje se muestran en los histogramas de la figura 11, en donde están las medias y los errores estándares de la densidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras cerebrales de los tres grupos experimentales. El grupo Kindling mostró un marcaje característico a todo lo largo de la porción dorsal de la comisura anterior, en la región lateral de ambos lados de la comisura anterior, en ambos lados de BSTM y en el lado ipsilateral de BSTL. Estos resultados están ilustrados en la figura 11.

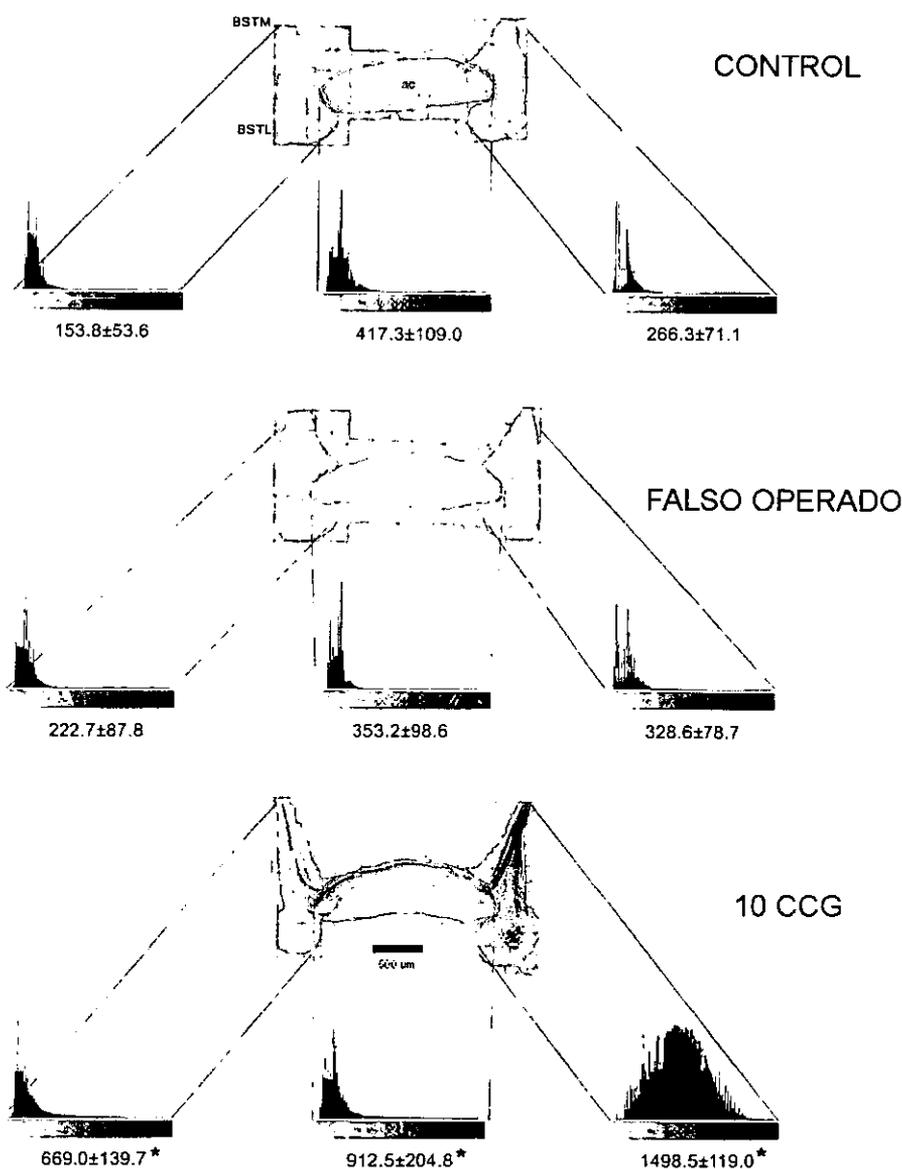


Fig. 11. Fotomontaje en escala de grises de cortes coronales a un nivel de la comisura anterior (8.7mm interaural) en animales Control, Falso Operado y 10 CCG. Los histogramas muestran la cantidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras analizadas. Los datos representan los valores de las medias±e.e. (n=6 animales por grupo) y están expresados en píxeles. Nótese que en todas las estructuras del grupo Kindling, los valores obtenidos son más altos. En este fotomontaje el lado derecho corresponde al sitio de inyección en la amígdala. Abreviaciones: ac; comisura anterior; BSTL; núcleo lateral de la cama de la estría terminalis, y BSTM; núcleo medial de la cama de la estría terminalis. *P<0.05, Student-Neuman-Keuls.

EXPERIMENTO III

EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN EL KINDLING ELECTRICO Y EN LA DENSIDAD DEL MARCAJE EN DIFERENTES ESTRUCTURAS RELACIONADAS CON LA PROPAGACIÓN DE LA ACTIVIDAD EPILÉPTICA.

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

Kindling – Cicloheximida (K-C): Animales que fueron tratados con cicloheximida antes de cada estimulación, hasta producir la fase conductual deseada:

- fase4 – cicloheximida (n=6)
- fase 5 – cicloheximida (n=6)
- 10 CCG – cicloheximida (n=6)

Kindling – Salina (K-S): Animales con las mismas condiciones que el grupo anterior, pero con administración de solución salina.

- fase4 – salina (n=6)
- fase 5 – salina (n=6)
- 10 CCG – salina (n=6)

Cicloheximida-Kindling-Cicloheximida (C-K-C): Animales que fueron tratados crónicamente con cicloheximida 8 días antes de cada estimulación, seguido de dosis y estimulación posterior hasta producir la fase conductual deseada:

- fase4 – cicloheximida (n=6)
- fase 5 – cicloheximida (n=6)
- 10 CCG – cicloheximida (n=6)

Salina-Kindling-Salina (S-K-S): Animales con las mismas condiciones que el grupo anterior, pero con administración de solución salina.

- fase4 – salina (n=6)
- fase 5 – salina (n=6)
- 10 CCG – salina (n=6)

Implantación del electrodo, estimulación amigdalina e inyección del complejo HRP-WGA

La metodología empleada para la implantación del electrodo y la estimulación amigdalina en estos experimentos se realizó de la misma manera como se indicó en las paginas 44 y 45. En estos experimentos la estimulación de la amígdala fue una vez al día. A estos animales también se les inyectó 15 nanolitros de HRP-WGA en el núcleo basolateral amigdalino, una vez obtenida la fase conductual deseada. Los cuales fueron sacrificados 48 h después de realizada la inyección (ver pagina 36). El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante el mismo procedimiento mencionado en las paginas 37 y 38. El análisis histológico se realizó de la misma manera que en la página 39.

Administración del antibiótico

A los grupos experimentales, se les administro una dosis de 1 mg/kg de cicloheximida (sigma) vía subcutánea, media hora antes de cada estimulación amigdalina. Estos animales experimentales fueron divididos en dos subgrupos:

- 1) Animales tratados con cicloheximida antes de cada estimulación (únicamente la cicloheximida se dio a partir del protocolo de estimulación).
- 2) Animales tratados crónicamente con cicloheximida 8 días antes de empezar la estimulación. La administración de la cicloheximida se continuó en dosis diarias antes de cada estimulación al igual que en el grupo 1.

Nota: Se debe de tomar en cuenta que con el mismo protocolo de la administración de la cicloheximida se trato a dos grupos con solución salina, ver pagina 50.

Análisis estadístico

El desarrollo del Kindling se evaluó por las fases conductuales y por la duración de la posdescarga, en cada una de las condiciones experimentales (K-S/K-C) y (S-K-S/C-K-C). Se aplicó la prueba de Friedman para analizar la diferencia en las fases conductuales y la duración de la posdescarga dentro de cada grupo experimental. Además, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, para valorar las diferencias entre los grupos (K-S/K-C) y (S-K-S/C-K-C) en las fases conductuales y en la duración de la posdescarga durante la evolución del kindling.

Para la valoración de la cantidad de marcaje de HRP-WGA en la comisura anterior, núcleos del lecho de la estría terminalis ipsilateral y contralateral. Se utilizó la prueba estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney para valorar las diferencias entre los grupos tratados con solución salina y cicloheximida para cada una de las estructuras en las diferentes etapas del kindling (fase 4, fase 5 y 10CCG). Esta prueba se aplicó a ambos grupos con administración de solución salina y cicloheximida antes de cada estimulación (K-S/K-C) y con administración de solución salina y cicloheximida 8 días antes de empezar la estimulación, seguido de dosis y estimulación posterior (S-K-S/C-K-C).

También, se empleó una prueba de t de Student para comparar las diferencias en el número de neuronas marcadas en la amígdala izquierda, corteza prefrontal ipsilateral y contralateral, entre los grupos tratados con solución salina y cicloheximida en las diferentes etapas del kindling (fase 4, fase 5 y 10CCG). También, esta prueba se aplicó a ambos grupos con administración de solución salina y cicloheximida antes de cada estimulación y con administración de solución salina y cicloheximida 8 días antes de empezar la estimulación, seguido de dosis y estimulación posterior, respectivamente.

RESULTADOS

Establecimiento del Kindling.

La evolución del kindling se evaluó por la duración de la posdescarga y por la conducta presentada durante cada estimulación. Ver clasificación de Racine (1972b) en la página 9. La valoración fue para cada uno de los animales control y experimental (solución salina y cicloheximida respectivamente). En los dos grupos con diferente manera de administración de la cicloheximida (K-S/K-C y S-K-S/C-K-C).

Al analizar los grupos K-S, K-C, S-K-S y C-K-C entre las estimulaciones durante el desarrollo del kindling, con la prueba de Friedman no se encontraron diferencias significativas, $p > 0.05$.

Los resultados de los estadios conductuales y la duración de la posdescarga del grupo al cual se le administro cicloheximida hasta el momento de la estimulación (K-C) y los resultados de su respectivo grupo control (K-S); se muestran en la figura 12. En A se muestra la evolución de las fases conductuales y en B, se muestra el desarrollo gradual en la duración de la posdescarga medida en segundos, durante la evolución del kindling. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cada uno de los estímulos, tanto en la duración de la posdescarga como en las fases conductuales durante el desarrollo del kindling, $p > 0.05$, U de Mann-Whitney.

Al comparar los resultados del grupo tratado crónicamente con cicloheximida (C-K-C) 8 días antes de empezar la estimulación con su respectivo control salina (S-K-S), se observó que en las fases conductuales durante el desarrollo del kindling, existen diferencias significativas en diferentes estímulos como se muestra a continuación:

Estímulo	S-K-S	MEDIA±e.e	C-K-C	MEDIA±e.e	Valor de p
3		2.4±0.4		1.0±0.0	p=0.016
4		2.6±0.6		1.0±0.0	p=0.008
5		2.6±0.6		1.0±0.0	p=0.008
6		3.6±0.6		1.0±0.0	p=0.008
7		4.2±0.5		1.0±0.0	p=0.008
8		3.8±0.6		1.5±0.3	p=0.032

Y del estímulo 21 al 24 S-K-S (0.0±0.0) y C-K-C (5.0±0.0) ($p < 0.0001$), U de Mann-Whitney. Estos últimos cuatro estímulos fueron necesarios en el grupo cicloheximida para alcanzar las 10 CCG (figura 13 A).

En la duración de la posdescarga en las 4 últimas estimulaciones se observó una diferencia significativa como se muestra a continuación y en la figura 13B:

Estímulo	S-K-S	MEDIA±e.e	C-K-C	MEDIA±e.e	Valor de p
21		0.0±0.0		162.0± 9.9	p=0.016
22		0.0±0.0		151.5±17.4	p=0.016
23		0.0±0.0		166.0±31.2	p=0.016
24		0.0±0.0		199.3±86.9	p=0.036

U de Mann-Whitney.

Estos últimos cuatro estímulos fueron necesarios en el grupo cicloheximida para alcanzar las 10 CCG.

Estos resultados indican que los animales tratados con cicloheximida permanecen más tiempo en fase 1 y requieren en promedio 4 estimulaciones más para alcanzar la primera crisis convulsiva generaliza.

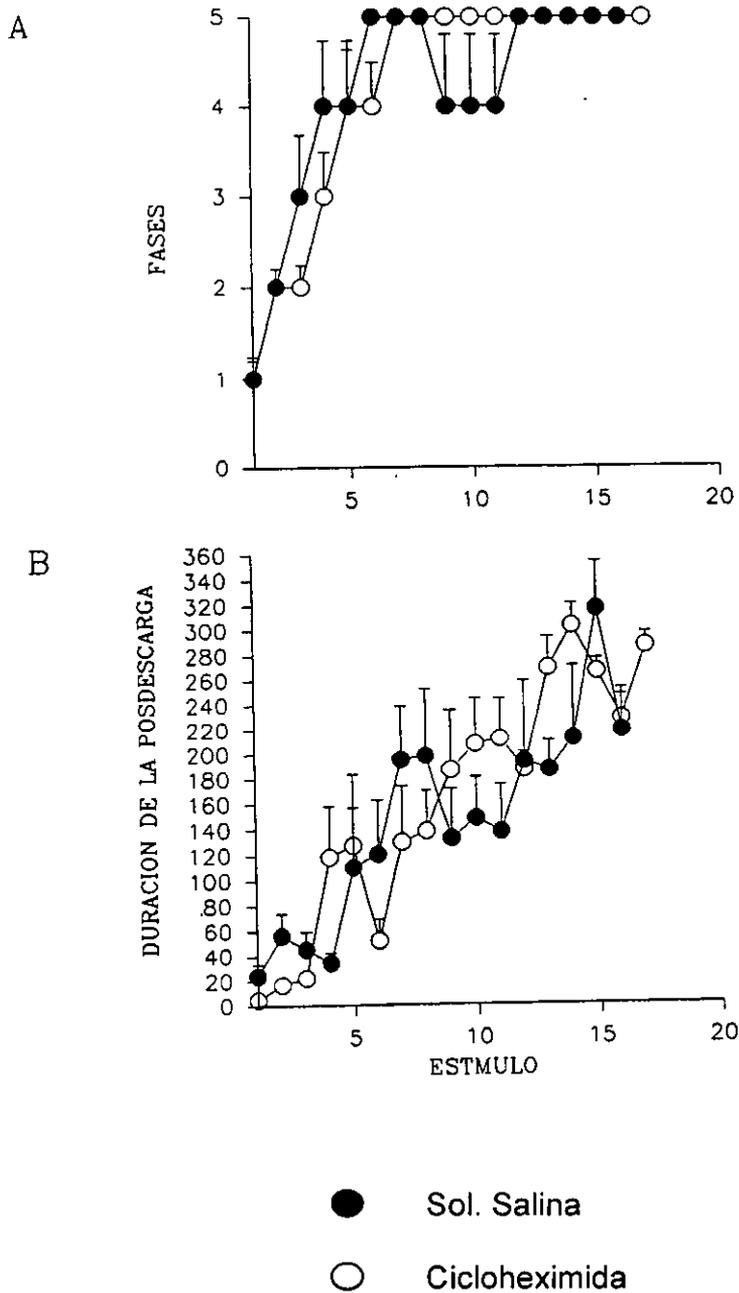


Figura 12. Muestra el desarrollo del kindling en ratas control (salina) y en ratas experimentales (cicloheximida administrada únicamente antes de cada estimulación) hasta alcanzar 10 CCG. A) etapas conductuales y B) duración de la posdescarga medida en segundos. Los datos están expresados como la media \pm e.e. ($n=6$ para cada grupo).

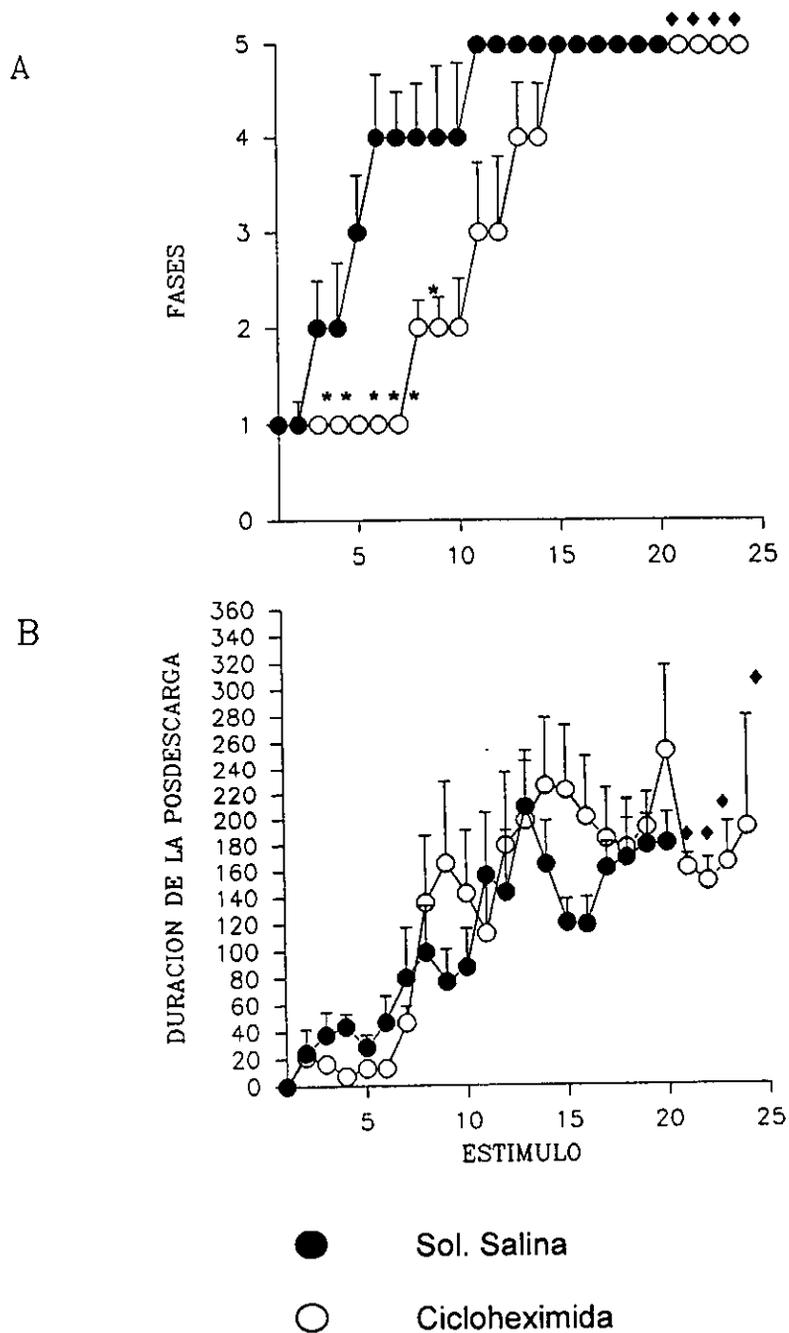


Fig. 13. Muestra el desarrollo del kindling en ratas control (salina) y en ratas experimentales (cicloheximida administrada 8 días antes y durante cada estimulación) hasta alcanzar 10 CCG. A) etapas conductuales y B) duración de la posdescarga medida en segundos. Los datos están expresados como la media \pm e.e. ($n=6$ para cada grupo). * $p<0.05$, U de Mann-Whitney, al comparar el mismo estímulo entre el grupo cicloheximida y el control salina. \blacklozenge el grupo cicloheximida necesito 4 estimulaciones más que el grupo control salina para alcanzar las 10CCG.

Análisis cuantitativo del marcaje de HRP-WGA (GRUPOS K-S/K-C)

El análisis del marcaje de HRP-WGA presente en la comisura anterior y en los núcleos del lecho de la estría terminalis, se realizó mediante el sistema de procesamiento de imágenes (Scion imagen). Ver pagina 47.

Los resultados obtenidos de la comparación realizada entre los grupos tratados con Cicloheximida administrada antes de cada estimulación (K-C) y su respectivo Control Salina (K-S) en las diferentes fases del kindling (fase 4, fase 5 y 10 CCG), fueron los siguientes: En fase 4 y fase 5 se observó una disminución del marcaje en ambos lados de los núcleos medial y lateral de la estría terminalis (BSTM y BSTL) y en la comisura anterior, en el grupos tratados con Cicloheximida ($p < 0.0001$) a excepción de los núcleos BSTM y BSTL del lado contralateral al sitio de inyección en el grupo fase 4 en donde el marcaje fue mayor ($p = 0.004$), U de Mann-Whitney. Véase la figura 14. En 10 CCG también se encontró una disminución del marcaje en los animales tratados con Cicloheximida en dichas estructuras: Comisura anterior ($p = 0.002$), BSTM y BSTL ipsilateral ($p = 0.005$) y contralateral ($p < 0.0001$), U de Mann-Whitney, ver la figura 15. Las medias y los errores estándares del marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras cerebrales de los dos grupos experimentales son indicados en cada uno de los histogramas. Estos resultados se muestran en la figura 14 y 15.

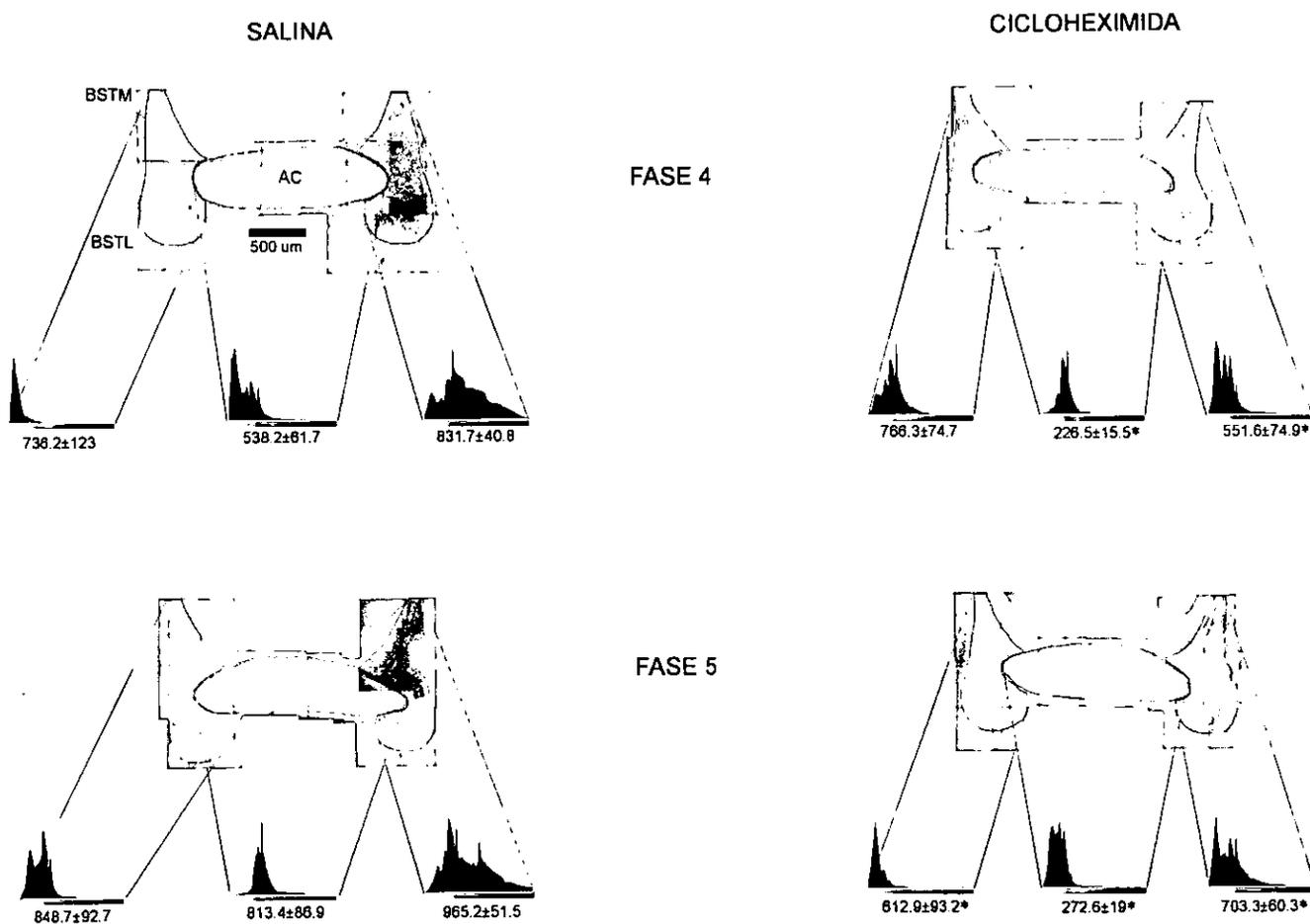


Figura 14. Fotomontaje en escala de grises de cortes coronales a un nivel de la comisura anterior (8.7mm interaural) en animales Fase 4 y Fase 5 Salina y Cicloheximida administrada antes de cada estimulación. Los histogramas muestran la cantidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras analizadas. Los datos representan los valores de las medias \pm e.e. (n=6 animales por grupo) y están expresados en píxeles. Nótese que en todas las estructuras de los grupos tratados con Cicloheximida, los valores obtenidos son más bajos, a excepción de BSTM y BSTL contralateral del grupo fase 4. En este fotomontaje el lado derecho corresponde al sitio de inyección en la amígdala. Abreviaciones: ac: comisura anterior; BSTL: núcleo lateral y BSTM núcleo medial del lecho de la estria terminalis. * $p < 0.0001$, U de Mann-Whitney, para cada fase y estructura.

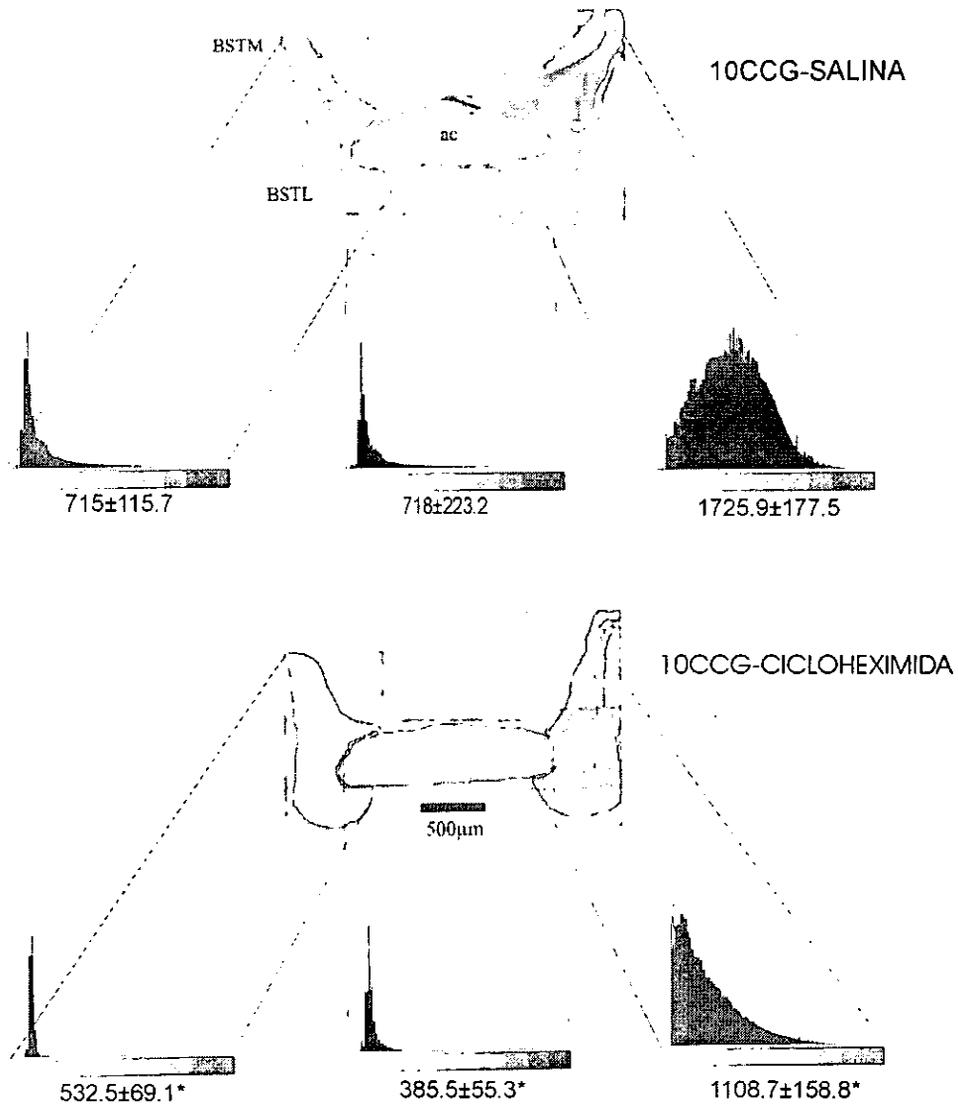


Figura 15. Fotomontaje en escala de grises de cortes coronales a un nivel de la comisura anterior (8.7mm interaural) en animales 10 CCG-Salina y 10 CCG-Cicloheximida administrada antes de cada estimulación. Los histogramas muestran la cantidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras analizadas. Los datos representan los valores de las medias \pm e.e. (n=6 animales por grupo) y están expresados en píxeles. Nótese que en todas las estructuras del grupo 10 CCG-Cicloheximida, los valores obtenidos son más bajos. En este fotomontaje el lado derecho corresponde al sitio de inyección en la amígdala. Abreviaciones: ac: comisura anterior; BSTL: núcleo lateral y BSTM núcleo medial del lecho de la estria terminalis. * $p < 0.05$, U de Mann-Whitney, para cada estructura.

Con relación al número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda y en ambos lados de la corteza prefrontal medial en la fase 4, fase 5 y 10CCG de los grupos experimentales antes mencionados. Se observó de manera general que en los animales tratados con Cicloheximida el número de neuronas disminuye notablemente, estos resultados se muestran en la tabla 5 y figura 16,17 y 18.

Tabla 5. Promedio de las neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda, corteza prefrontal ipsilateral y contralateral, en los grupos salina (K-S) y cicloheximida administrada antes de cada estimulación (K-C) en las diferentes etapas del Kindling (fase 4, fase 5 y 10CCG).

NEURONAS MARCADAS CON HRP-WGA		MEDIA \pm e.e		
ESTRUCTURA	CONDICION	FASE 4	FASE 5	10CCG
AMIGDALA IZQUIERDA	SALINA	7.7 \pm 2.0 *p=0.02	17.0 \pm 0.6 *p=<0.0001	97.3 \pm 5.2 *p=0.0002
	CICLOHEXIMIDA	0.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	28.7 \pm 0.7
CORTEZA PREFRONTAL IPSIATERAL	SALINA	51.0 \pm 5.8 *p=0.02	128.3 \pm 10.9 *p=0.008	330.0 \pm 0.0 *p=<0.0001
	CICLOHEXIMIDA	27.0 \pm 2.9	75.0 \pm 0.0	223.0 \pm 0.0
CORTEZA PREFRONTAL CONTRALATERAL	SALINA	27.7 \pm 3.8 *p=0.06	61.0 \pm 1.1 *p=<0.0001	211.0 \pm 0.0 *p=<0.0001
	CICLOHEXIMIDA	16.7 \pm 2.0	38.0 \pm 0.0	73.0 \pm 0.0

*p<0.05, t de Student.

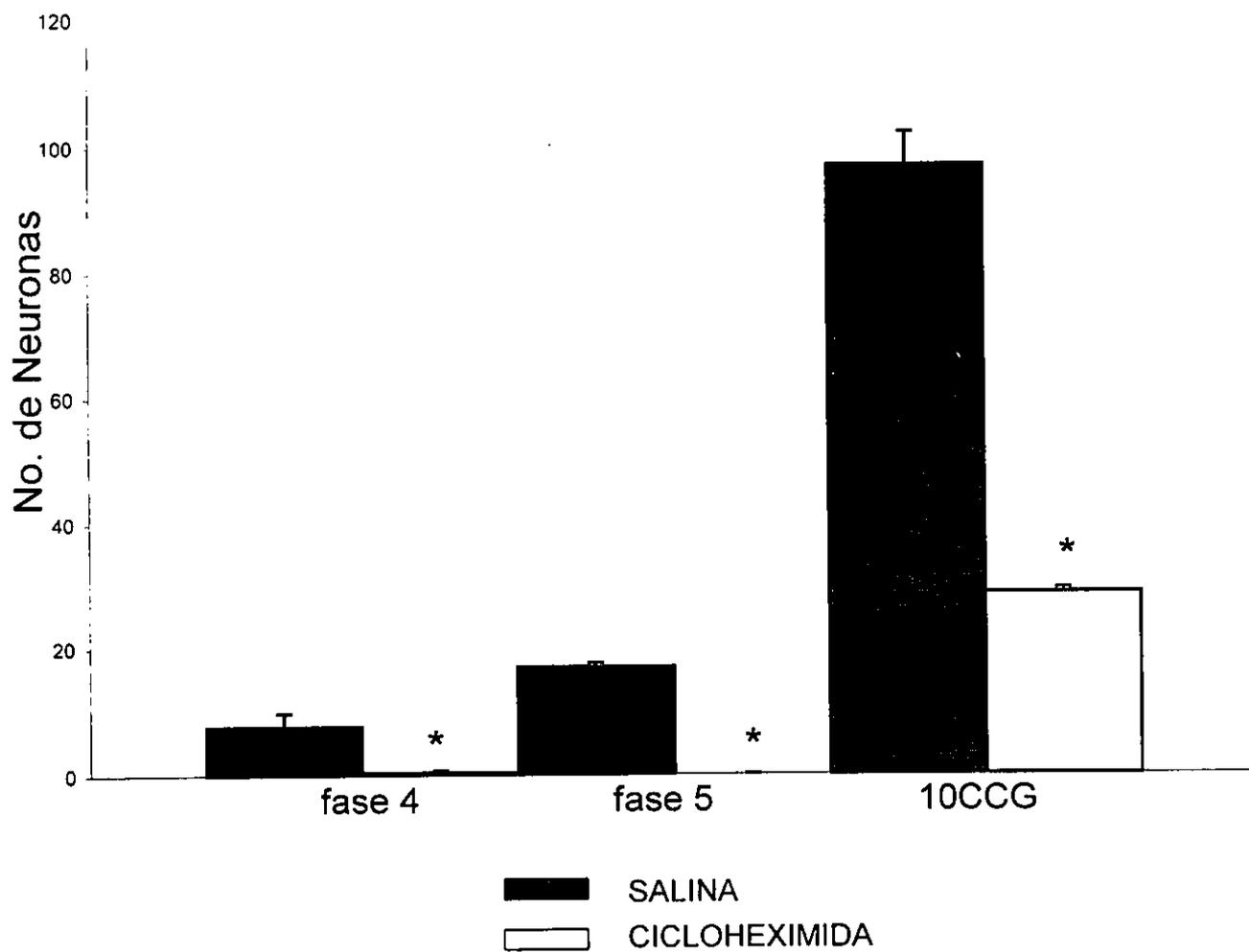


Figura 16. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la amígdala izquierda. Las barras en negro representan el promedio de las neuronas encontradas en los grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG control salina (K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados con cicloheximida antes de cada estimulación (K-C). Media \pm e.e (n=6, para cada grupo). *p<0.05, t de Student al comparar las fases respectivas.

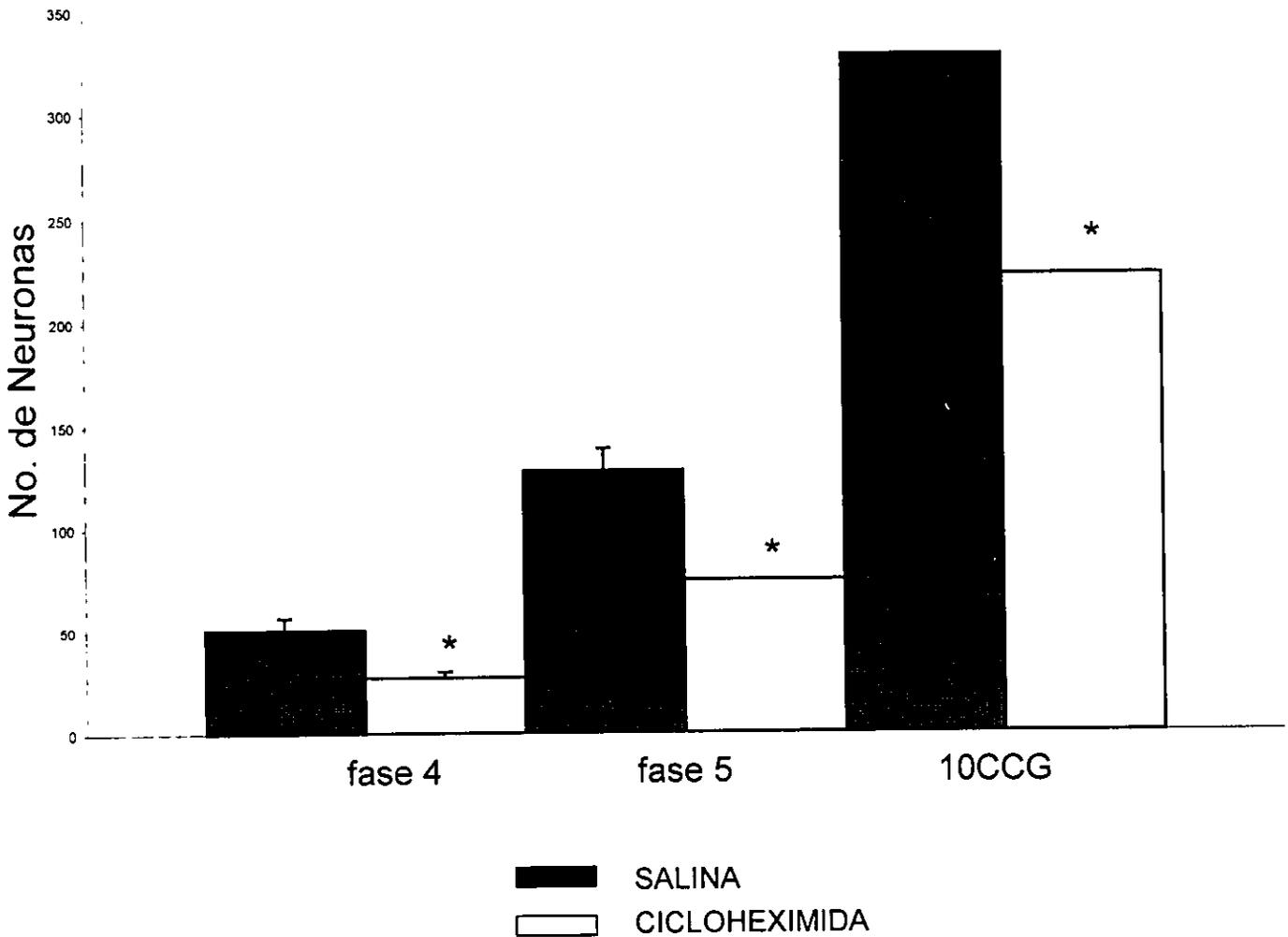


Figura 17. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza prefrontal medial ipsilateral. Las barras en negro muestran el promedio de las neuronas encontradas en los grupos control salina: fase 4, fase 5 y 10 CCG (K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados con cicloheximida antes de cada estimulación (K-C). Media \pm e.e (n=6 para cada grupo), *p<0.05, t de Student al comparar las fases respectivas.

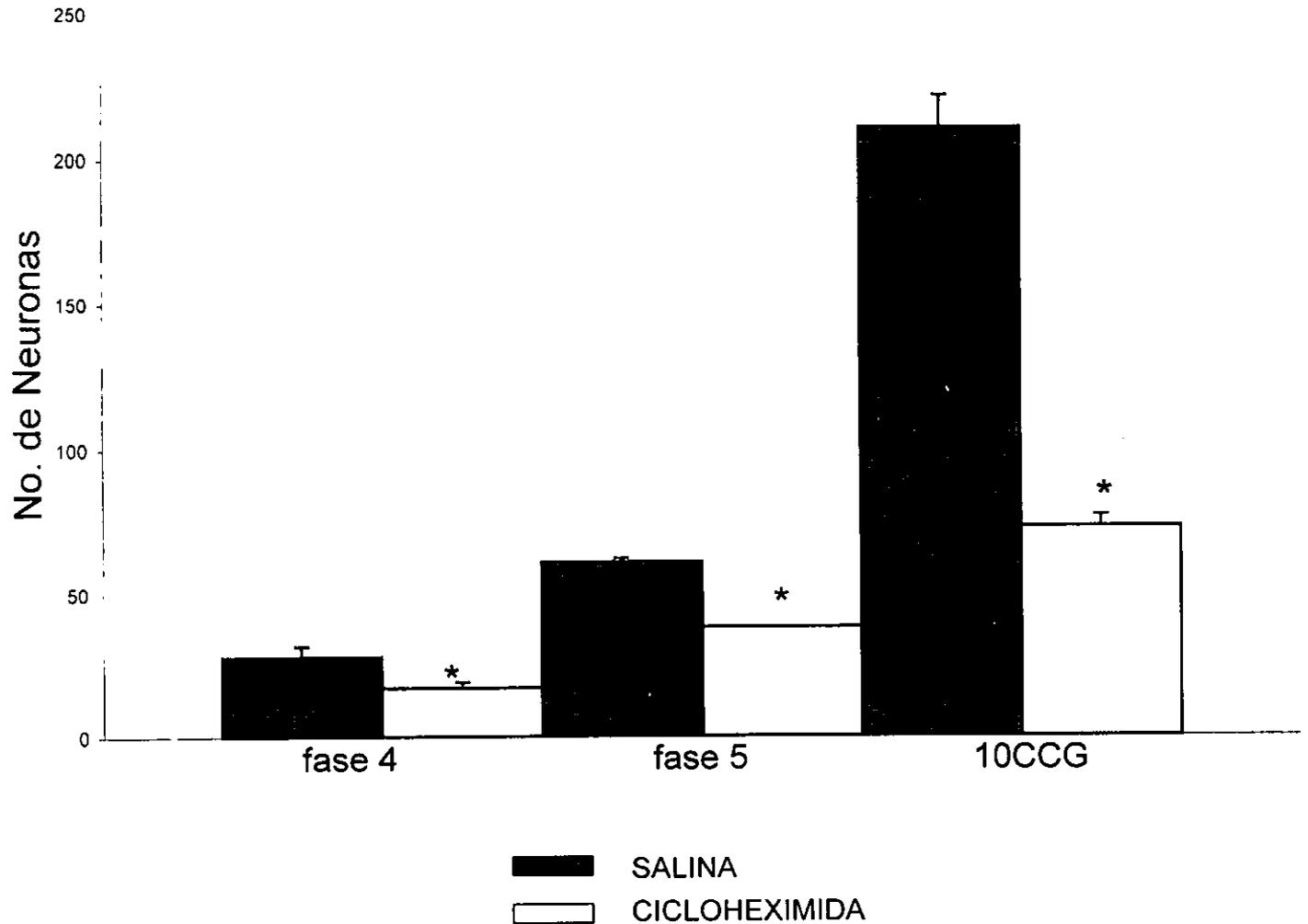


Figura 18. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza prefrontal medial contralateral. Las barras en negro muestran el promedio de las neuronas encontradas en los grupos control salina: fase 4, fase 5 y 10 CCG (K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados con cicloheximida antes de cada estimulación (K-C). Media \pm e.e (n=6 para cada grupo), *p<0.05, t de Student al comparar las fases respectivas.

Análisis cuantitativo del marcaje de HRP-WGA (grupos S-K-S/C-K-C)

Con respecto a los resultados obtenidos de la comparación entre los grupos tratados con Cicloheximida administrada crónicamente antes y durante la estimulación (C-K-C) y su respectivo grupo Control Salina (S-K-S), en las diferentes etapas del kindling, fueron los siguientes: En fase 4 se encontró una disminución en la densidad del marcaje en los núcleos del lecho de la estría terminalis ipsilateral y en la comisura anterior en el grupo fase 4-cicloheximida vs fase 4-salina ($p < 0.0001$) y en el lecho de la estría terminalis contralateral no se encontró diferencia significativa, U de Mann-Whitney. En fase 5 también se encontró una disminución en el marcaje en el grupo tratado con cicloheximida en los núcleos del lecho de la estría terminalis ipsilateral ($p = 0.001$) y en la comisura anterior ($p = 0.08$), pero en los núcleos del lecho de la estría terminalis contralateral tampoco se presentaron diferencias significativas, U de Mann-Whitney. El grupo con 10 CCG-cicloheximida sí presentó una disminución del marcaje en ambos lados de los núcleos del lecho de la estría terminalis ipsilateral ($p = 0.006$) y contralateral ($p = 0.005$) y en la comisura anterior ($p < 0.0001$), U de Mann-Whitney. Las medias y los errores estándares del marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras cerebrales de los grupos experimentales son indicados en cada uno de los histogramas. Véase figuras 19 y 20.

Además, al comparar el grupo 10 CCG-Cicloheximida administrada crónicamente antes y durante la estimulación con el grupo 10 CCG-Cicloheximida administrada únicamente antes de cada estimulación, se observó que el marcaje de HRP-WGA en ambos lados de los núcleos del lecho de la estría terminalis (BSTM, BSTL) y en la comisura anterior, es menor en los animales que fueron tratados crónicamente 8 días antes de la estimulación eléctrica amigdalina, $p < 0.0001$, U de Mann-Whitney.

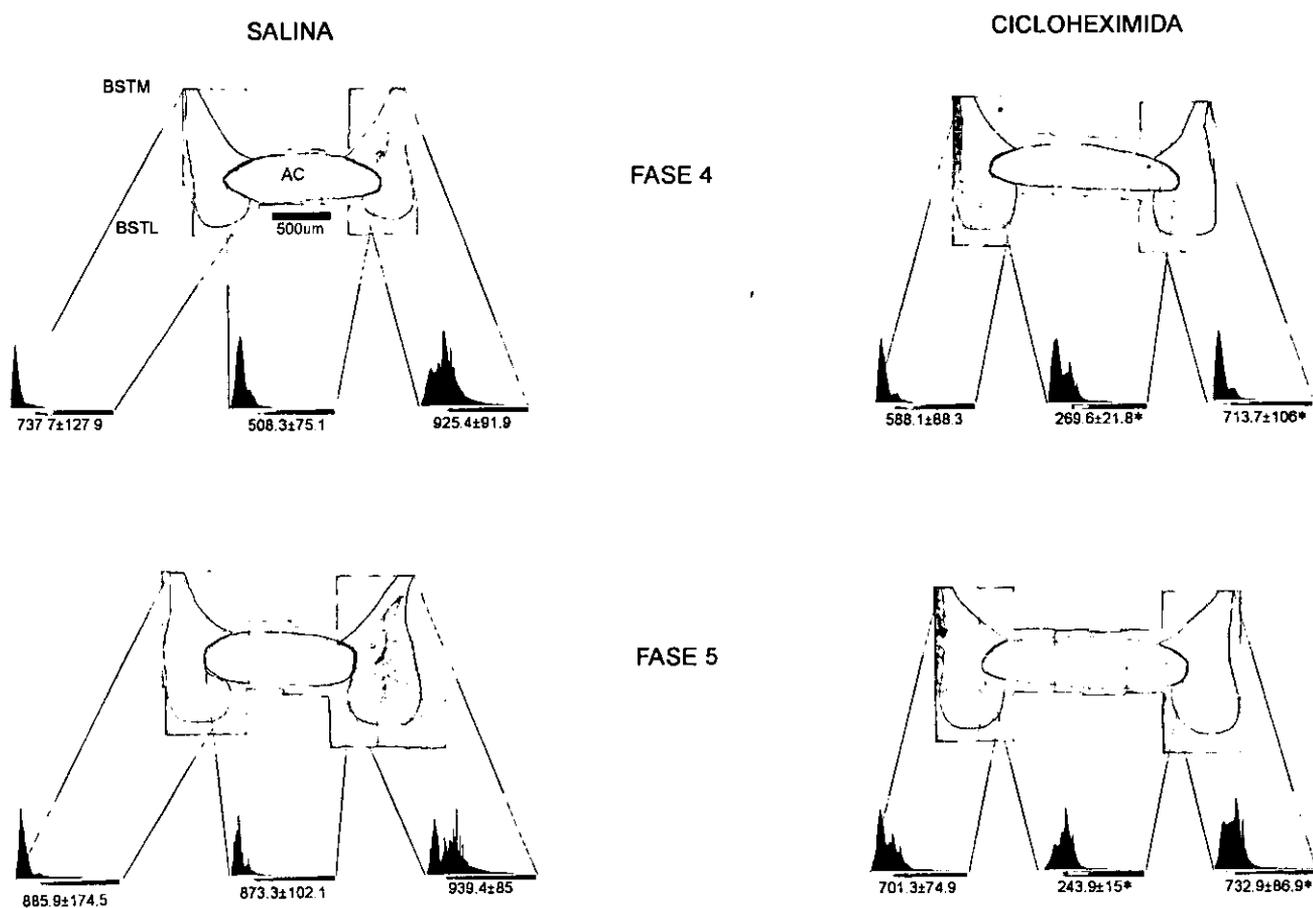


Figura 19. Fotomontaje en escala de grises de cortes coronales a un nivel de la comisura anterior (8.7mm interaural) en animales Fase 4 y Fase 5 Salina y Cicloheximida administrada crónicamente antes y durante cada estimulación. Los histogramas muestran la cantidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras analizadas. Los datos representan los valores de las medias \pm e.e. (n=6 animales por grupo) y están expresados en píxeles. En este fotomontaje el lado derecho corresponde al sitio de inyección en la amígdala. Abreviaciones: ac: comisura anterior; BSTL: núcleo lateral y BSTM núcleo medial del lecho de la estricta terminalis. * $p < 0.05$, U de Mann-Whitney, para cada fase y estructura.

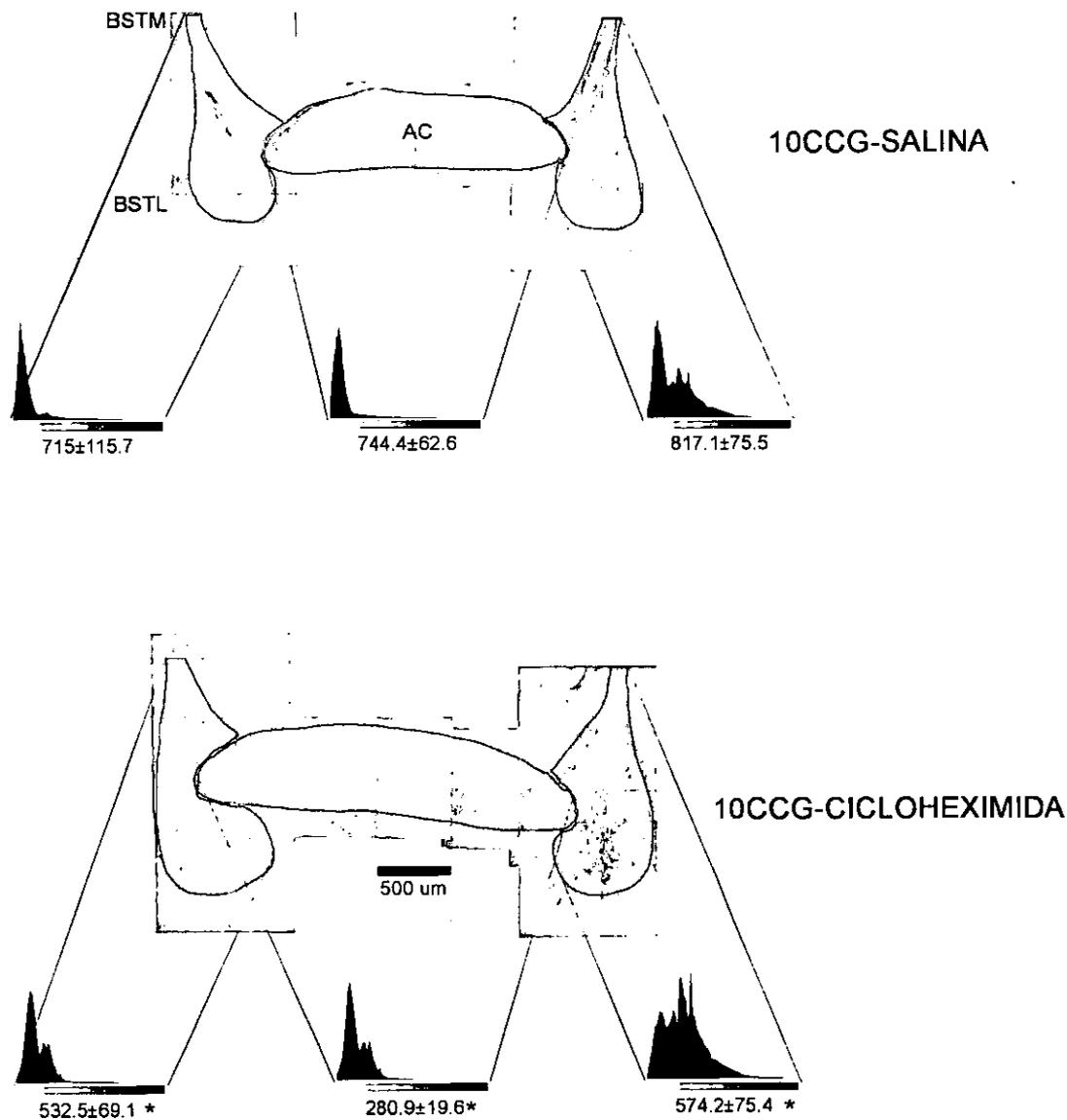


Figura 20. Fotomontaje en escala de grises de cortes coronales a un nivel de la comisura anterior (8.7mm interaural) en animales 10 CCG-Salina y 10 CCG-Cicloheximida administrada crónicamente antes y durante cada estimulación. Los histogramas muestran la cantidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras analizadas. Los datos representan los valores de las medias \pm e.e. (n=6 animales por grupo) y están expresados en píxeles. Nótese que en todas las estructuras del grupo 10 CCG-Cicloheximida, los valores obtenidos son más bajos. En este fotomontaje el lado derecho corresponde al sitio de inyección en la amígdala. Abreviaciones: ac: comisura anterior; BSTL: núcleo lateral y BSTM núcleo medial del lecho de la estria terminalis. * $p < 0.05$, U de Mann-Whitney, para cada estructura.

En relación con el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda y en ambos lados de la corteza prefrontal medial en los animales fase 4, fase 5 y 10 CCG de los grupos salina y cicloheximida administrada crónicamente. También, se obtuvo que en los animales tratados con cicloheximida, el número de neuronas disminuyó (ver tabla 6 y figuras 21, 22 y 23) a excepción de la corteza prefrontal medial ipsilateral en 10CCG (figura 22) y contralateral en los animales fase 4 y fase 5 (figura 23).

Tabla 6. Promedio de las neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda, corteza prefrontal ipsilateral y contralateral, en los grupos salina (S-K-S) y cicloheximida administrada crónicamente antes y durante cada estimulación (C-K-C) en las diferentes etapas del Kindling (fase 4, fase 5 y 10CCG).

NEURONAS MARCADAS CON HRP-WGA		MEDIA ± e.e		
ESTRUCTURA	CONDICIÓN	FASE 4	FASE 5	10CCG
AMIGDALA IZQUIERDA	SALINA	6.0±1.1 *p=0.006	15.7±0.9 *p<0.0001	100.7±2.7 *p<0.0001
	CICLOHEXIMIDA	0.0±0.0	0.0±0.0	20.7±2.4
CORTEZA PREFRONTAL IPSILATERAL	SALINA	49.0±4.6 *p=0.005	121.7±6.7 *p=0.003	290.7±5.8 p=0.5
	CICLOHEXIMIDA	21.7±1.3	66.3±4.9	285.0±5.5
CORTEZA PREFRONTAL CONTRALATERAL	SALINA	24.7±3.2 p=0.4	56.7±2.4 p<0.2	184.7±4.9 *p<0.0001
	CICLOHEXIMIDA	21.3±1.9	52.3±1.8	77±2.3

*p<0.05, t de Student.

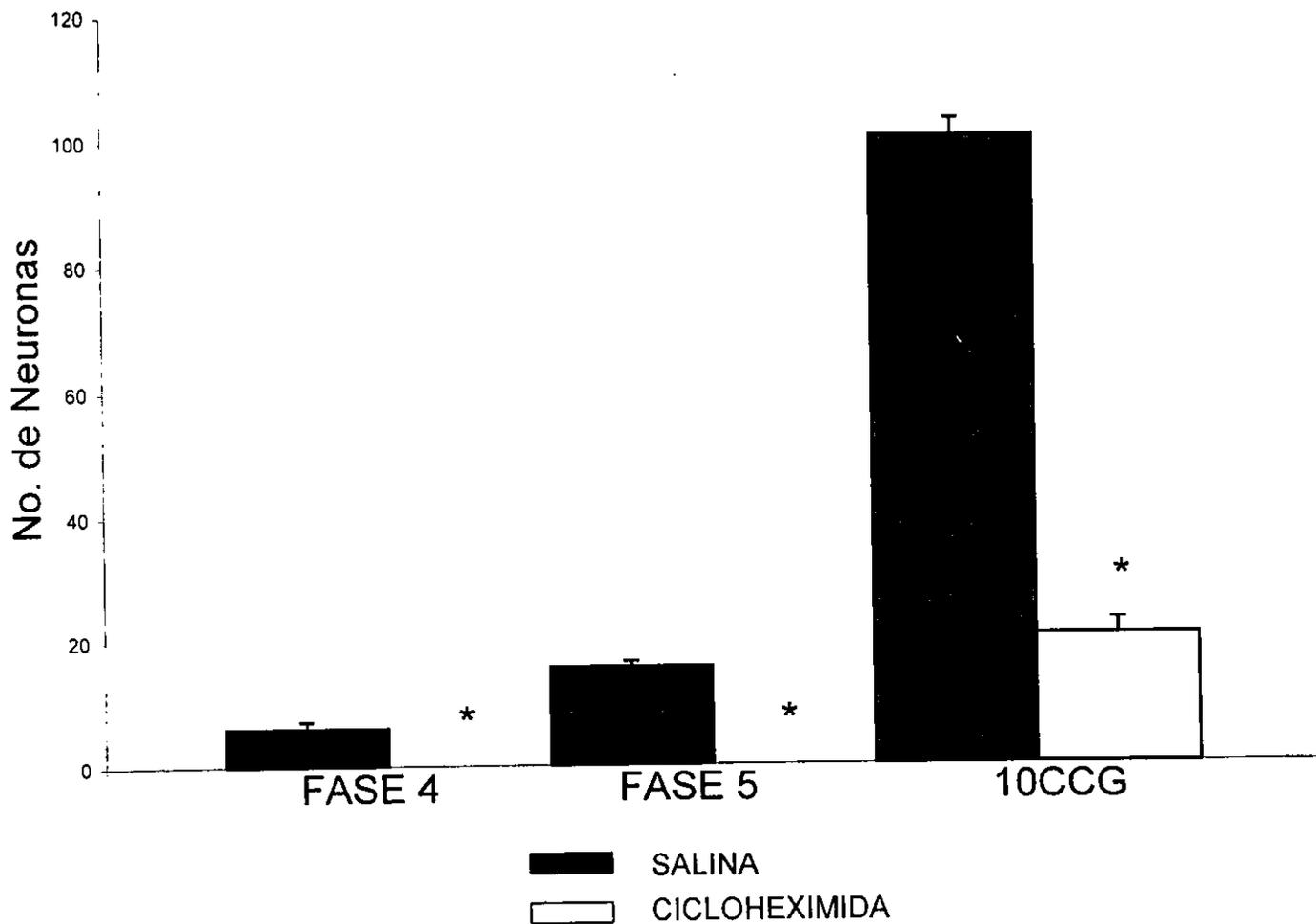


Figura 21. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la amígdala izquierda. Las barras en negro representan el promedio de las neuronas encontradas en los grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG control salina (S-K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados con cicloheximida administrada crónicamente antes y durante cada estimulación (C-K-C). Media \pm e.e (n=6, para cada grupo), *p<0.05, t de Student al comparar las fases respectivas.

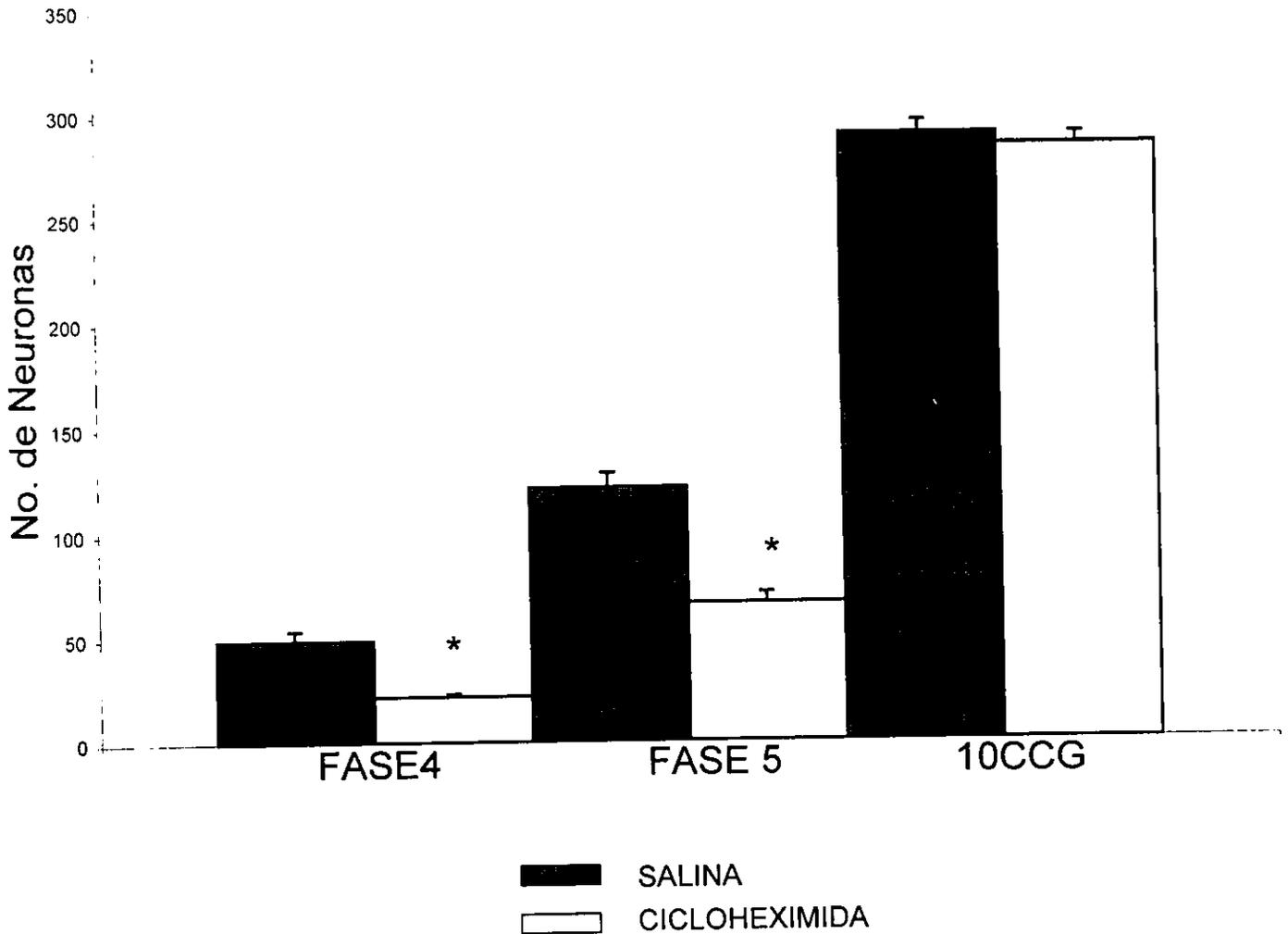


Figura 22. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza prefrontal medial ipsilateral. Las barras en negro muestran el promedio de las neuronas encontradas en los grupos control salina: fase 4, fase 5 y 10 CCG (S-K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados crónicamente con cicloheximida antes y durante cada estimulación (C-K-C). Media \pm e.e (n=6 para cada grupo), *p<0.05, t de Student al comparar las fases respectivas.

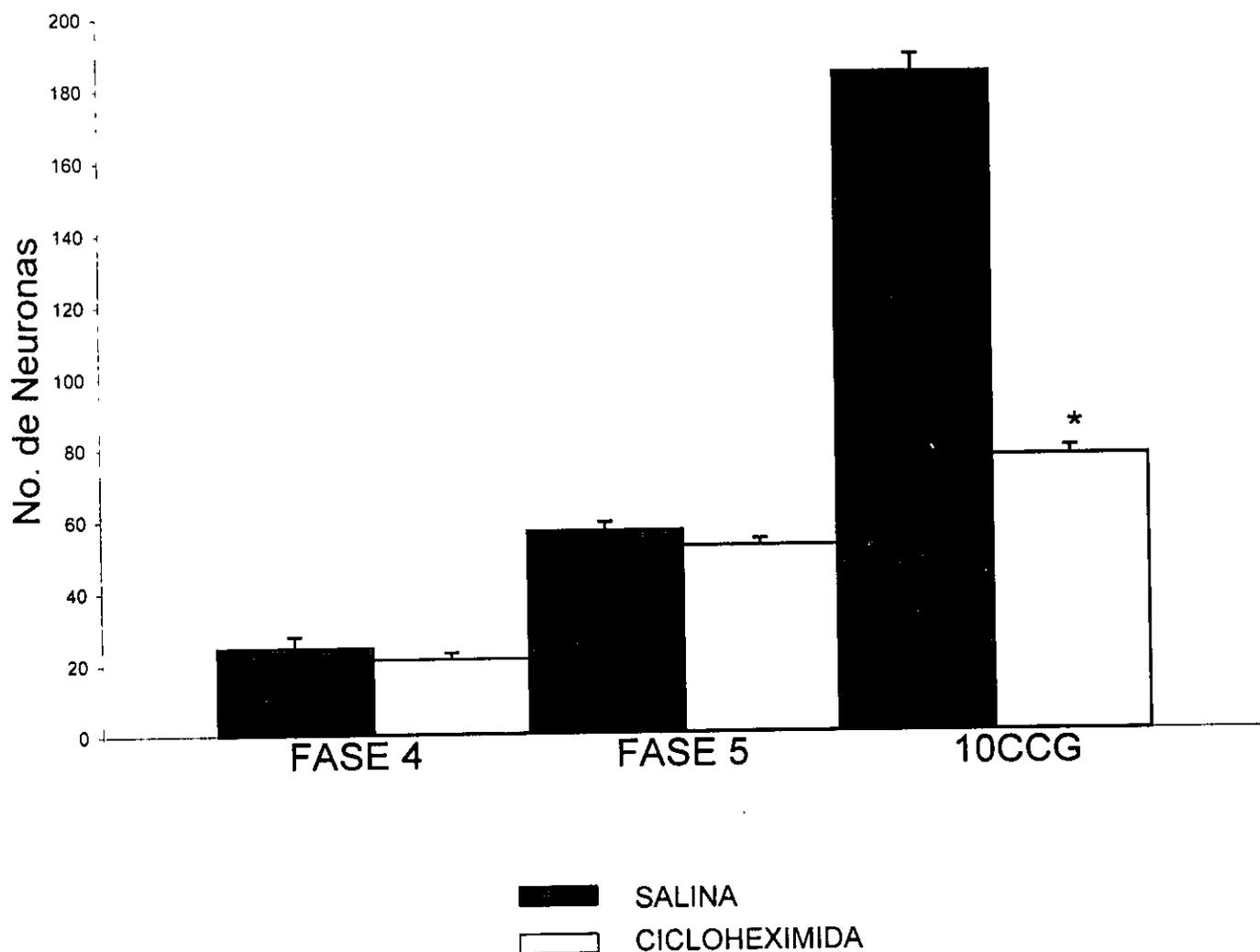


Figura 23. Número de neuronas marcadas con HRP-WGA, en la corteza prefrontal medial contralateral. Las barras en negro muestran el promedio de las neuronas encontradas en los grupos control salina: fase 4, fase 5 y 10 CCG (S-K-S). Las barras en blanco representan los promedios de las neuronas marcadas en los diferentes grupos fase 4, fase 5 y 10 CCG, tratados crónicamente con cicloheximida antes y durante cada estimulación (C-K-C). Media \pm e.e (n=6 para cada grupo). * $p < 0.05$, t de Student al comparar las fases respectivas.

DISCUSIÓN

La amígdala ha sido considerada como una estructura clave en la epilepsia del lóbulo temporal. Estudios neuroanatómicos indican que la amígdala está ampliamente conectada con numerosas estructuras subcorticales y corticales (DeOlmos et al., 1985). También, estudios electrofisiológicos han demostrado que la estimulación de los núcleos amigdalinos basolateral y corticomediales inducen un efecto funcional sobre estructuras subcorticales a través de la estría terminalis (Gloor, 1955 a,b). Sin embargo, como se mencionó anteriormente la posible conexión ínteramigdalina del núcleo basolateral mediante la comisura anterior y su posible participación en la propagación ínteramigdalina de la actividad epiléptica para la generación de un foco epiléptico secundario no había sido descrita. El presente trabajo aporta conocimientos sobre esta vía, al no encontrarse neuronas marcadas con HRP-WGA del lado contralateral al sitio de inyección cuando la comisura anterior es lesionada; tal y como lo señalan los resultados obtenidos en el grupo D (página 43, figura 10). De la misma forma, la presencia de neuronas marcadas, en ambos complejos amigdalinos en el grupo C, en el cual se realizó la inyección de HRP-WGA en la comisura anterior refuerzan esta descripción. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el grupo A, en el cual se inyectó HRP-WGA en el núcleo basolateral y se observan las neuronas en el lado contralateral y no muestran diferencias con el grupo C, señalando la participación de la comisura anterior en esta interconexión. Por otro lado, nuestros resultados muestran como poco probable que el cuerpo caloso y el fórnix estén participando en la conexión

interamigdalina del núcleo basolateral, tal y como lo demuestran los resultados del grupo B, ya que al lesionar parte de dichas regiones no disminuye el número de neuronas marcadas en la amígdala contralateral al sitio de inyección (figura 10).

Otra conexión importante del núcleo basolateral, es la que tiene con la corteza prefrontal medial (Cassell y Wright, 1986; Granato et al., 1991; Krettek y Price, 1997; McDonald, 1987; McDonald, 1991; Ottersen, 1982). El patrón de proyecciones corticales descritas en el presente estudio es muy similar al reportado en investigaciones previas sobre la proyección cortico-amigdalina, mediante el complejo basolateral (Cassell y Wright, 1986). Así, el número de neuronas marcadas con HRP-WGA observado en este estudio, fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral en la corteza prefrontal medial, en todos los grupos experimentales. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el curso preciso de estas fibras no ha sido establecido con exactitud; no obstante, nuestros resultados sobre el incremento del marcaje de HRP-WGA a lo largo de la parte dorsal de las fibras de la comisura anterior en su porción caudal; así como en las fibras de la estría terminalis ipsilateral y contralateral en los animales que presentaron 10 CCG (figura 11), muestran como estas fibras ascienden por ambos extremos del núcleo medial de la estría terminalis. Este resultado indica que las fibras se dirigen hacia la corteza prefrontal medial, en donde se encontraron cambios en el número de neuronas marcadas, en ambos lados, durante la instalación del kindling eléctrico amigdalino. De esta forma ambas estructuras (núcleo basolateral y corteza prefrontal medial) además de tener un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria como ha sido descrito (ver Casell y Wright, 1982), también son

importantes en la propagación y generalización de la actividad epiléptica, como se muestra en este trabajo de tesis.

Por otro lado, durante el desarrollo del kindling eléctrico amigdalino se presentan varias fases (Racine, 1972b), las cuales incluyen principalmente las fases tempranas o crisis parciales (fase 1,2 y 3) y fases tardías o crisis generalizadas (fases 4 y 5).

Así, se ha propuesto que estas fases involucran la participación de diferentes estructuras anatómicas (Engel et al., 1978; Martínez-Lorenzana, 1998). De esta forma el desarrollo del kindling involucra cambios en la excitabilidad del Sistema Nervioso Central. Los cuales pueden ser locales o pueden abarcar estructuras cerebrales distantes al sitio donde la descarga eléctrica ha sido iniciada y así ser responsables de la formación de focos epilépticos secundarios (Goddard et al., 1969; Racine, 1972b; Burnham, 1975; Fernández- Más et al., 1992). En el kindling amigdalino este fenómeno involucra la amígdala contralateral (Goddard et al., 1969) dando la posibilidad de que esta región trabaje como otro foco de actividad epiléptica. Teniendo en cuenta este concepto de formación de focos secundarios, nosotros realizamos la inyección del trazador neuronal HRP-WGA en una amígdala epiléptica y pudimos observar un incremento en el marcaje a lo largo de las fibras de la comisura anterior y en los núcleos BSTM y BSTL del lecho de la estría terminalis y en el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala izquierda. Así, las inyecciones tienen lugar en una región activa, facilitando la captura de HRP-WGA e incrementando el transporte como consecuencia de la hiperactividad epiléptica. Es importante señalar que estos

incrementos ocurren únicamente cuando la actividad epiléptica empieza a ser generalizada, es decir a partir de las fases 4 y 5 y más notablemente en los animales con 10 CCG (Martínez-Lorenzana, 1998).

Esto refuerza la idea de que al producir o iniciar la producción de un foco secundario, como efecto de la propagación de la actividad epiléptica se favorece los fenómenos de transporte que subyacen al incremento del marcado con HRP-WGA.

Con respecto a la corteza prefrontal, estudios realizados por Fernández-Más et al., (1992) mostraron que la corteza frontal es la primera estructura que responde con espigas claras a la activación de un foco epiléptico de la amígdala; siendo en primer lugar la corteza prefrontal ipsilateral, seguida por espigas en la corteza prefrontal contralateral. De esta forma, el efecto de transferencia interhemisférico es principalmente llevado a cabo a través de la estría terminalis y fibras precomisurales. Estos autores hacen mención de que la propagación de la actividad epiléptica a la amígdala contralateral del lóbulo temporal es un fenómeno tardío y se presenta después de la activación cortical. En relación con este punto, nuestro grupo de trabajo ha observado diferentes particularidades para cada estructura. Por ejemplo, el número de células marcadas en la amígdala izquierda en las fases 1, 2-3 y 4 decrementó, alcanzando valores similares a un control en la fase 5. En ambos lados de la corteza prefrontal medial, la cantidad de células marcadas incrementó progresivamente desde la fase 2-3, 4 y 5 y en animales con 10 CCG (Martínez-Lorenzana, 1998). La diferencia de estos resultados entre la corteza prefrontal medial y el complejo amigdalino, puede ser explicada de la siguiente manera: es bien conocido,

como ya se mencionó anteriormente, que el efecto de transferencia a la amígdala contralateral en el kindling amigdalino en el gato, es un fenómeno de aparición tardía comparado con la corteza prefrontal (Fernández-Más et al., 1992). Estos resultados corresponden con nuestros datos, en los cuales se observó un incremento en el número de neuronas marcadas en la corteza prefrontal medial a partir de la fase 2-3, pero no fue hasta que los animales alcanzaron 10 CCG que el número de células marcadas se incrementa en la amígdala contralateral. Por lo tanto estos resultados indican que la corteza prefrontal medial se activa tempranamente y presenta cambios en la cantidad de células marcadas antes que la amígdala contralateral, estos cambios se correlacionan con el desarrollo del kindling y por lo tanto con la propagación de la actividad epiléptica. En las fases tempranas en donde encontramos una disminución del número de células marcadas en la amígdala contralateral podría haber un efecto de inhibición local. Este dato tendría que ser corroborado con experimentos en que se valore la excitabilidad de la amígdala local a lo largo de la evolución del kindling amigdalino.

La posibilidad de que el proceso epiléptico puede activar nuevas vías que se encuentra normalmente "inactivas", puede explicarse por la participación de más neuronas marcadas con HRP-WGA en la amígdala y en la corteza prefrontal medial; así como el incremento de la densidad de fibras marcadas en la comisura anterior y en ambos lados del lecho de la estría terminalis en los animales epileptizados. Igualmente no se puede descartar un proceso de reclutamiento que involucre más unidades neuronales, relacionado con un aumento en la hiperactividad neuronal característica del fenómeno epiléptico. Así, los cambios plásticos descritos tales como

la formación de nuevas sinapsis o modificaciones en estructuras sinápticas pre-existentes, pueden estar acompañadas de las alteraciones del transporte axonal que aquí se describen. De la misma manera, algunos estudios han reportado incrementos en el tamaño de las terminales sinápticas, así como un gran número de vesículas activas relacionadas con el proceso de endocitosis (Geinisman et al., 1990; Langmeier et al., 1983). Ambos mecanismos sugieren un aumento en la captura de HRP-WGA en los animales con crisis generalizadas.

Como se ha visto la hiperactividad neuronal característica del kindling implica una serie de cambios plásticos. Estos cambios plásticos pueden incluir variaciones en el transporte axonal, produciendo un aumento en el marcaje de HRP-WGA como se muestra en este trabajo. En la epilepsia focal por penicilina, únicamente se ha observado la interrupción de marcaje de HRP-WGA en neuronas conectadas bidireccionalmente (Divac et al., 1984) y este fenómeno se ha relacionado con la degeneración neuronal. Estos resultados son contradictorios a los obtenidos en este trabajo, lo cual puede estar relacionado con el modelo utilizado y/o a las diferencias temporales de cada uno de los modelos de hiperexcitabilidad. Por lo tanto, este trabajo contribuye al estudio de la relación entre el marcaje por medio del transporte axonal y la hiperexcitabilidad neuronal producida en un modelo de epilepsia experimental.

En relación a la síntesis de proteínas, nuestros resultados difieren a los publicados por Jonec y Wasterlain (1979) en los cuales se reporta un retardo en el desarrollo del kindling, al administrar media hora antes de cada estimulación la cicloheximida, ya que con estas mismas condiciones experimentales se trabajó en este

estudio y no se encontró ningún cambio durante el desarrollo del kindling (ver gráfica 12). Esto puede explicarse, de la siguiente manera. La dosis de cicloheximida empleada en el trabajo realizado por Jonec y Wasterlain (1979) fue de 1.5 mg/kg. Sin embargo, en este estudio se utilizó dicha dosis pero la tasa de mortandad de los animales fue del 100%, por lo que se optó utilizar una dosis menor (1.0 mg/kg). Con esta diferencia, al administrar crónicamente la cicloheximida (1.0 mg/kg) durante 8 días antes y durante el desarrollo del kindling, sí se pudo observar un retraso en el progreso de las fases conductuales tempranas en los animales (ver figura 13A). Estos resultados se correlacionan con la disminución del transporte axonal por la cicloheximida, valorado por medio de la densidad de marcaje de HRP-WGA en las diferentes estructuras relacionadas con la propagación de la actividad epiléptica, provocada por la estimulación eléctrica amígdalina.

Ahora bien, la pregunta siguiente se dirige a que elemento (s) del mecanismo de transporte axonal se encuentran alterados; aumentando el transporte axonal durante la epilepsia experimental e inhibiéndole por la cicloheximida, y queda abierta para futuros experimentos. Únicamente se sabe, que la cicloheximida inhibe a la tirosina hidroxilasa (Squire et al., 1974), lo que hace pensar que este antibiótico podría estar inhibiendo la síntesis de algunos neurotransmisores, como es el caso de las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina), las cuales podrían estar involucradas en el retardo del desarrollo del kindling eléctrico. Sin embargo, los estudios del kindling demuestran que las catecolaminas no juegan un papel importante en su desarrollo (Kalichman, 1982 y McNamara et al., 1987).

Por otro lado, no se descarta la participación de la síntesis de alguna proteína involucrada en el transporte axonal o proteínas de membrana, que sean requeridas para la transmisión neuronal o la generación de cambios plásticos producidos por la estimulación eléctrica amigdalina. Sin embargo, únicamente se sabe que la cicloheximida tiene efectos inhibitorios sobre la proteína sinexina (Cardenas et al., 1995) y que una disminución de la proteína sinapsina I, aumenta sorprendentemente la susceptibilidad a la crisis por estimulación eléctrica amigdalina (Li et al., 1995).

Sin lugar a dudas, el estudio experimental realizado en el presente trabajo de doctorado genera muchas preguntas, que hacen necesario seguir estudiando dichos cambios tanto del transporte axonal como la síntesis de proteínas, para poder dilucidar que elementos celulares se encuentran implicados en la propagación y generalización de la actividad epiléptica. De esta manera se podrían conocer mecanismos celulares o bien subcelulares que participan en los procesos y desarrollo de la epilepsia.

BIBLIOGRAFIA

Aird R.B, Masland R.L. and Woodbury D.M. (1984). *The Epilepsies. A critical Review*, Raven Press, New York.

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.), *Adv. Neurol.* Raven Press, New York, pp 489-500.

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. Neurophysiol.*, **68**:551-569.

Brady S, Colman R. and Brophy P. (1999). Subcellular organization of the nervous system: organelles and their functions. In: Zigmond M., Bloom F., Roberts J., Landis S. C., Squire R. (Ed.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, pp71-106.

Brailowsky S, Silva-Barrat C. and Naquet R. (1989). Actualización por temas: elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*. **12**: 53-61.

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 (1975): 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. and Corcoran M.E. (1980). Kindling in the seizure-prone and seizure-resistant Mongolian gerbil. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **49**: 360-365.

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 and Corcoran M. E. (1981). Kindling with low-frequency stimulation: Generality transfer and recruiting effects. **Exp. Neurol.**, **73**: 219-232.

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 Res.**, **517**:236-244.

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.

Cardenas M, Kuijpers A.J, Pollard H.B. (1995). Effect of protein synthesis inhibitors on synexin levels and secretory response in bovine adrenal medullary chromaffin cells. **Bioch. Biophys. Acta**, **1234**:255-260.

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.

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.

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.

Delgado J.M and Sevillano M: (1961). Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat . **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.** **13**: 722-733.

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 Res.**, **311**:189-193.

Dolivo M, Meurant C. and Verdán 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 Res.**, **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 Res.**, **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 Res.**, **13**:23-34.

Fifková E, Anderson C, Young S. and Harreveld A. (1982). Effect of anisomycin on stimulation-induced changes in dendritic spines of the dentate granule cells. **J. of Neurocytol.**, **11**: 183-210.

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 Res.**, **513**:175-179.

Geinisman Y, Morrell L.T and Morrell F. (1993). Structural synaptic substrates of kindling and long-term potentiation. In: Morrell (Ed.). **Kindling and synaptic plasticity**. Birkhauser. Pp. 124-159.

Girgis M. (1981). Kindling as a model for limbic epilepsy. **Neuroscience**, **6**: 1695-1706.

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 the 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.

Greenough W.T, Armstrong T.A, Comery AH, Humphreys A.G, Kleim J, Swain R.A. and Wang X. (1994). Plasticity-related changes in synapse morphology. In: Selverston A.I. and Ascher P. (Eds.), **Cellular and molecular mechanisms underlying higher neural functions**. John Wiley and Sons, pp211-222.

Guilbaud G, Bernard J.F, Besson 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-Lara M. (1989): Serotonin dependent (Na⁺/K⁺) ATPase in kindling rats: A study in various brain regions. **Brain Res.**, **480**: 403-406.

Hernández R.J. and Condés-Lara M. (1992): Brain Na⁺/K⁺ ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and kindled rats. **Brain Res.**, **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.

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.

Jones L.S, Grooms S.Y, Lapadula D.M. and Lewis D.V. (1992). Protein synthesis inhibition blocks maintenance but not induction of epileptogenesis in hippocampal slice. **Brain Res.**, **599**: 338-344.

Joy R.M. (1985). The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizures. **Fundamental and Applied Toxicology**, **5**:41-65.

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 Ca² (+) -dependet release of endogenous GABA in area CA 1 of rat hippocampus. **Brain Res.**, **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 Res.**, **545**: 33-40.

Karlsson J.O. (1979). Proteins of axonal transport: interaction of rapidly transported proteins with lectins. **J. Neurochem.** **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.

Kelly R.B. (1994). Protein targeting and synaptic plasticity. In: Selverston A.I. and Ascher P. (Eds.), **Cellular and molecular mechanisms underlying higher neural functions**. John Wiley and Sons, pp257-264.

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). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, **172**:687-722.

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.

Leech C.K and McIntyre D.C. (1976). Kindling rates in inbred mice: analog to learning?. **Behav. Biol.**, **16**:439-452.

Le Gal La Salle G. (1981). Amygdaloid kindling in the rat: regional differences and general properties. In **Kindling 2**: Wada J.A. (Ed.). Raven Press, New York. pp 31-47.

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.

Li L, Chin L-H, Shupliakov O, Brodin L, Sihra T, Hvalby V, Zheng D, McNamara J, Greengard P. and Andersen P. (1995) Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **92**:9235-9239.

Litchy W.J. (1973): Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase of frog sartorius nerve in vitro. **Brain Res.**, **56**:377-381.

Martínez Lorenzana G. (1998): Determinación del transporte axonal en las fibras comisurales amigdalinas, durante el kindling eléctrico amigdalino. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Fisiológicas, UACPyP-CCH, 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. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. **Neuroscience**, **44**:1-14.

McNamara J.O, Byrne M:C, Dasheiff R.M and Fitz J.G. (1980). The kindling model of epilepsy: a review. In: **Progress in Neurobiology**, **15**: 139-159.

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.

McNamara J.O. (1995): Analyses of the molecular basis of kindling development. **Psychi. and Clin. Neurosci.**, **49**: 5175-5178.

Mesulam M. (1982): **Tracing neuronal connections with horseradish peroxidase**. John Wiley & Sons, New York, London.

Morrell F, Tsuru T.J, Hoepfner 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.

Morrell F and Tsura N. (1976). Kindling in the frog: development of spontaneous epileptiform activity. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, **40**: 1-11.

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.

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.

Paxinos G. and Watson C.H. (1982): **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, London.

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

Racine R.J. (1972b): Modification of seizure activity by electrical stimulation II motor seizure. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, **32**:281-294.

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

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

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

Role L.W, Ascher P, Catterall W.A, Curran T, Heinemann S, Jonas P, Kelly R.B, Muller W, Seeburg P.H, Selverston A.I and Sudhof T.C. (1994). Group Report: What molecular mechanisms are likely to be central for plasticity in the operation of the nervous system?. In: Selverston A.I. and Ascher P. (Eds.), **Cellular and molecular mechanisms underlying higher neural functions**. John Wiley and Sons, pp 303-318.

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.

Squire L.R, Kuczenski R. and Barondes S.H. (1974). Tyrosine hydroxylase inhibition by cycloheximide and anisomycin is not responsible for their amnesic effect. **Brain Res.**, **82**:241-248.

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

Sutula T.P, Cavazos J.E, Woodard A.R. (1994). Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: Implications for memory dysfunction and the development of epilepsy. **Hippocampus**. **4**:254-258.

Talavera 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 Res.**, **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-Guardiola A. (1981): Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. **Neurosci. Lett.**, **21**: 39-43.

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

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

Wada J.A. (1978). The clinical relevance of kindling: species, brain sites and seizure susceptibility. In: **Limbic mechanisms**. Livingston K.E. and Hornkewicz (Eds.). Plenum, New York. Pp 369-388.

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

Effects of kindling in wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in neurons of the interamygdaloid pathway in rats

Guadalupe Martínez-Lorenzana^a, Esther Talavera-Cuevas^{a, b},
Marcela Sánchez-Alvarez^a, Miguel Condés-Lara^{a, b, *}

^aDepartamento de Neurofisiología, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, 76001, Qro. Mexico

^bDivisión de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Mexico D.F

Received 8 November 1999; received in revised form 11 January 2000; accepted 11 January 2000

Abstract

This paper describes in kindled rats an increment in wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in anterior commissure, bed nuclei of stria terminalis and amygdala. Three groups of animals were analyzed: control, sham-operated and kindled animals with ten convulsive generalized seizures. Results show that kindled animals have an increase in fiber labeling in anterior commissure and in the bed nuclei of stria terminalis, as well as a greater number of labeled neurons in amygdala. This label enhancement is related to the hyperexcitability of neurons produced by epilepsy, and could be associated to the propagation and formation of secondary foci and related plastic changes occurring during kindling. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase; Kindling; Epilepsy; Amygdala; Rat; Retrograde transport

Kindling is an experimental model of epilepsy that is established by the administration of repetitive subconvulsive electrical stimuli in specific brain regions, inducing behavioral and electroencephalographic changes that culminate in convulsive generalized seizures [8]. Morell et al. [14,15] suggested that in kindling the abnormal electrical activity might alter protein synthesis and that axonal transport is important in the generation of secondary epileptic foci. Thus, protein synthesis and axonal transport are fundamental in the propagation and generalization of epileptic activity. Therefore neuronal hyperexcitability produced by kindling involves mechanisms related to axonal transport [7,11,15]. Also, neuronal activity has an influence on both horseradish peroxidase (HRP) uptake [2,9,19] and on its axonal transport [6,12]. However, the relation between labeling by means of axonal transport and neuronal hyperexcitability induced by some model of experimental epilepsy has been poorly explored [5].

With this background in mind, the aim of the present paper was to determine whether neuronal hyperactivity

produced by kindling induced changes on the labeling of the interamygdaloid pathway.

Male Wistar rats weighing 280–310 g were used. They were individually housed on a 12 h light-dark cycle with food provided ad libitum. The animals were divided into three groups, as follows: (a) control: consisting of six naive rats; (b) sham-operated: six rats implanted but not stimulated; this group received the same handling schedule as the kindled animals without electrical stimulation; and (c) the kindled group: six rats presenting ten generalized seizures. Under pentobarbital anesthesia (40 mg/kg, i.p.), a bipolar electrode was stereotaxically implanted into the left basolateral amygdaloid nucleus [16]. The electrodes and connectors were fixed to the skull by means of dental acrylic. Kindling stimulation was initiated 5 days after surgery and the amygdala was stimulated twice daily (08:00 and 15:00 h), 5 days per week. The electrical stimulation consisted of 1 s train of rectangular pulses lasting 1 ms at 60 Hz with an intensity between 20–80 μ A. The progressive development of kindling was observed by an increase in the frequency and duration of the afterdischarge, as well as by progressive behavioral changes. The behavioral changes were classified according to Racine stages [17] as follows: I, contralateral facial clonus, arrest; II, bilateral facial clonus plus head nodding; III, forelimb clonus;

* Corresponding author. Tel.: +52-5-623-4042; fax: +52-42-340-344.

E-mail address: condes@servidor.unam.mx (M. Condés-Lara)

IV, rearing; and V, rearing and falling. The electrical stimulation was repeated until the rats reached ten stage V seizures. Subsequently animals within the three experimental groups were anesthetized and mounted on the stereotaxic apparatus, in order to inject by pressure 15 nl wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) (Sigma) in 10% saline solution into the right basolateral amygdaloid nucleus. In the case of kindled animals, WGA-HRP was injected immediately after the last generalized seizure. In brief, the injections were delivered by means of a syringe connected to a micropipette (tip diameter 15 μm). Following a survival time of 48 h, the animals were anesthetized, perfused intracardially with a Ringer solution followed by a fixation solution (5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) and cryoprotected in 10% sucrose solution. The brains were frozen and coronally sectioned into 40 μm thick slices and processed with TMB [13]. Then the sections were mounted and counterstained with 0.1% safranin.

The presence of WGA-HRP stained neurons at the amygdaloid complex and fibers of the anterior commissure (ac) and at the medial (BSTM) and lateral (BSTL) bed nuclei of the stria terminalis (8.7 mm interaural) was analyzed. A single blind experiment was designed in which the slides with the sections were randomly chosen and given to one of the authors who carried out the neuronal counts and the assessment of the density of stained fibers, ignoring which experimental situation was under analysis. Amygdaloid sections were analyzed using a semi automatic image processing system (Histoscan, S BIOCROM, France) [3,10], and the number of labeled cells was obtained. To study label density in ac, BSTM and BSTL, photomountings of dark field photomicrographs were made. These were scanned and compared to varying shades of grayscale with the program Scion-image. Histograms showing the amount of label for the different brain regions were obtained. Analyses of variance were used to evaluate the statistical significance of the label present on the brain regions studied in the different experimental groups.

The size of the WGA-HRP injection site in the basolateral nucleus was similar for all the animals included in this study which presented a stain diameter of 500 μm . This diameter size has been reported [4] when 15 nl WGA-HRP have been injected in the central nervous system. Besides, a round-shaped region surrounding the injection site was observed which was due to the local WGA-HRP transport in the amygdaloid complex [13]. We will be referring to ipsilateral or contralateral WGA-HRP labeled cells and fibers with respect to the injection site at the right amygdala.

The amount of labeled cells in the left amygdaloid complex was larger in the kindled group than in the control group. In control animals, we found 17.66 ± 4.35 cells (mean \pm SE) per slice ($n = 9$) whereas in the kindled group, 106.60 ± 24.53 cells (mean \pm SE) were counted on each slice ($n = 9$). In the sham-operated group no labeled cell bodies were found in this structure. The difference

between control and kindled WGA-HRP labeling neurons in the left amygdala was statistically significant ($P < 0.002$).

When the kindled group was compared with control or sham-operated groups, an increase in labeling was evident in anterior commissure, BSTM and BSTL nuclei in both ipsilateral and contralateral sides in the kindled group. These differences in labeling are evident in the histograms of Fig. 1. The means and standard errors of WGA-HRP labeling for the different brain structures in the three experimental groups are indicated for each histogram. The kindled group showed a characteristic labeling all along the dorsal portion of anterior commissure. Moreover, the lateral regions on both sides of the ac, both sides of BSTM, and on the ipsilateral side of BSTL present a characteristic WGA-HRP stain. No significant differences were found in WGA-HRP labeling when control and sham-operated groups were compared. These results are illustrated in Fig. 1.

In the case of the sham-operated group, we did not find any labeled neurons in the left amygdala. This situation could be explained by the fact that the presence of the stimulating electrode destroys the surrounding tissue [8]. Therefore, the injection of WGA-HRP does not label this region. Whereas in kindled rats, although the neurons surrounding the electrode are damaged, the neighboring second order neurons could be activated by electrical stimulation [8].

This paper shows that electric amygdaloid kindling enhances the number of labeled neurons interconnecting both amygdaloid complexes. It is well established that the epileptic processes are accompanied by the formation of secondary epileptic foci [1,8,17]. In the amygdaloid kindling this phenomenon involves the contralateral amygdala [8], giving rise to the possibility that this region works as another focus of epileptic activity. In this way we performed the WGA-HRP injections in an epileptic amygdala and observed an increase in the labeling. Thus, the injections took place in an active region, thus facilitating the WGA-HRP uptake and transport enhanced by the epileptic hyperactivity. The possibility that the epileptic process may activate pathways, which are normally present but 'inactive', could be illustrated by the participation of more WGA-HRP labeled neurons in the left amygdala, as well as densely stained fibers reaching both sides of BSTM. We claim for a recruiting process involving more neuronal units in order to enhance the neuronal hyperactivity characteristic of epileptic phenomena. In addition plastic changes such as new synaptic formations or modifications in pre-existent synaptic structures could be responsible for the alterations in axonal transport. In the same way, some studies have reported an increase in the size of the synaptic terminals, as well as a larger number of active vesicles related to endocytosis [7,11]. Both mechanisms suggest that a larger WGA-HRP uptake could be present in epileptic animals.

Neuronal hyperactivity characteristic of epilepsy implies a series of modifications that are described as plastic

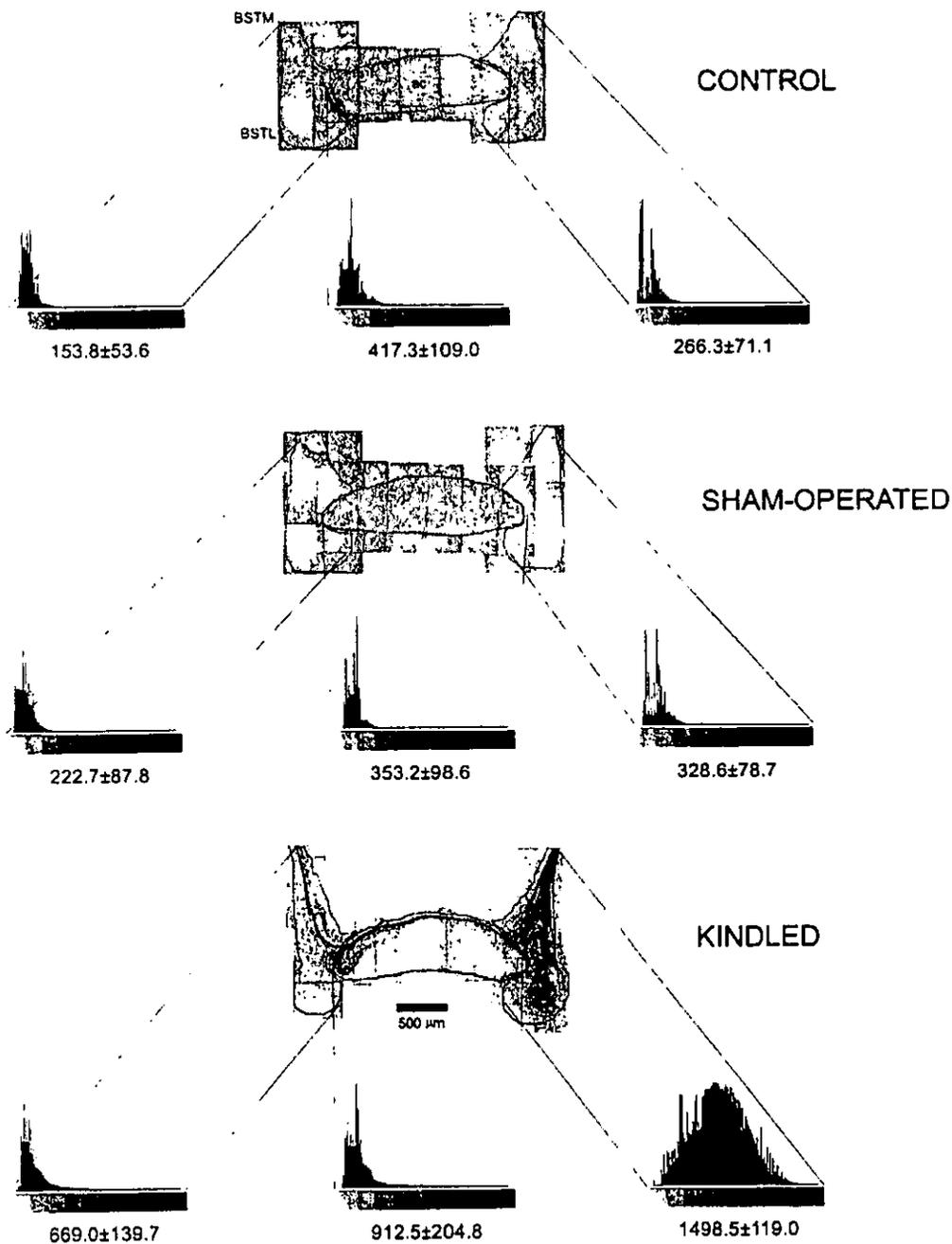


Fig. 1. Grayscale photomounting of coronal sections at the anterior commissure (8.7 mm interaural) in control, sham-operated and kindled animals. The histograms show the amount of WGA-HRP label in the different analyzed structures. Data represent values of means \pm SE. ($n = 6$ animals by group) and are expressed in pixels. Notice that for all structures in the kindled group, the values obtained are the highest. In these photomountings the right side corresponds to the injection site at the amygdala level. Abbreviations: ac, anterior commissure; BSTL, lateral nucleus of stria terminales; and BSTM, medial bed nucleus of stria terminales.

changes [18]. These plastic changes could include variations in axonal transport producing an enhancement of WGA-HRP labeling as it is shown in this work. In epilepsy WGA-HRP labeling of bi-directionally connected neurons has been hindered in cortical focal seizures induced with

penicillin. This phenomenon has been associated to neuronal degeneration [5]. This contradictory finding could be due to the model used and/or to the temporal differences used in each hyperexcitability model.

This work contributes to study the relation between label-

ing by means of axonal transport and the neuronal hyperexcitability produced in an experimental epilepsy model. However, a remaining question needs to be addressed to know at what time during the development of the epileptic process the plastic changes started.

This work was partially supported by a CONCYTEQ grant. We thank Dr. Fernando Barrios for technical assistance with the computerized image processing.

- [1] Burnham, W.M., Primary and 'transfer' seizure development in the kindled rat. *Can. J. Neurol. Sci.*, 2 (1975) 417–428.
- [2] Cooke, C.T., Cameron, P.U. and Jones, D.G., Stimulation-induced uptake of horseradish peroxidase by rat cortical synapses. *Neurosci. Lett.*, 1 (1975) 15–18.
- [3] Corkidi, G., *Système d'Analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo2000* Thèse de Doctorat. Université Paris XII, France, (1989).
- [4] Chan, S.H., Chan, J.Y. and Ong, B.T., Anatomic connections between nucleus reticularis rostroventrolateralis and some medullary cardiovascular sites in the rat. *Neurosci. Lett.*, 71 (1986) 277–282.
- [5] Divac, I., Petrovic-Minic, B. and Mogensen, J., Focal cortical seizures prevent HRP and HRP-WGA labeling only in neurons bidirectionally connected to the cortex. *Brain Res.*, 311 (1984) 189–193.
- [6] Dolivo, M., Meurant, C. and Verdan, C., The retrograde axonal flow depends on neuronal activity. *Experimentia*, 33 (1977) 778.
- [7] Geinisman, Y., Morrell, L.T. and Morrell, F., The brain's record of experience: kindling induced enlargement of the active zone in hippocampal perforated synapses. *Brain Res.*, 513 (1990) 175–179.
- [8] Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K., A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, 25 (1969) 295–330.
- [9] Heuser, J.E. and Reese, T.S., Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.*, 57 (1973) 315–344.
- [10] Hirsch, E.C., Lejeune, O., Colliot, G., Corkidi, G. and Tajani, N., Computer Methods in Nuclei Cartography. In P.M. Conn (Ed.), *Methods in Neurosciences*, Vol. 10, Academic Press, New York, 1992, pp. 83–87.
- [11] Langmeier, M., Fischer, J. and Marês, J., Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained afterdischarge during kindling. *Epilepsia*, 24 (1983) 616–627.
- [12] Litchy, W.J., Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase of frog sartorius nerve in vitro. *Brain Res.*, 56 (1973) 377–381.
- [13] Mesulam, M., *Tracing Neuronal Connections with Horseradish Peroxidase*, Wiley, New York, 1982, pp. 251.
- [14] Morrell, F. and Morrell, L.T., Kindling as a model of neural plasticity. In J.A. Wada (Ed.), *Kindling*, Vol. 3, Raven Press, New York, 1983, pp. 17–35.
- [15] Morrell, F., Tsuru, T.J., Hoepfner, T.J., Morgan, D. and Harrison, W.H., 'Secondary epileptogenesis in frog forebrain: effect of inhibition of protein synthesis. *Can. J. Neurol. Sci.*, 2 (1975) 407–416.
- [16] Paxinos, G. and Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, London, 1982.
- [17] Racine, R.J., Modifications of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizures. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 32 (1972) 281–294.
- [18] Racine, R.J., Tuff, L. and Zalde, J., Kindling, unit discharge patterns and neuronal plasticity. *Can. J. Neurol. Sci.*, 2 (1975) 395–405.
- [19] Turner, T.P., Effect of pentobarbital on uptake of horseradish peroxidase by rabbit cortical synapses. *Exp. Neurol.*, 54 (1977) 24–32.

Different wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in structures related to the development of amygdaline kindling in the rat

Miguel Condés-Lara^{a,c,*}, Esther Talavera-Cuevas^{a,c},
Jorge Larriva-Sahd^b, Guadalupe Martínez-Lorenzana^a

^aDepartamento de Neurofisiología, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, 76001, Qro. México

^bDepartamento de Neurobiología del Desarrollo, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, 76001, Qro. México

^cDivisión de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, México D.F., México

Received 28 September 2000; received in revised form 27 November 2000; accepted 30 November 2000

Abstract

The anterior commissure, medial and lateral bed nuclei of the stria terminalis and both sides of the medial prefrontal cortex showed a progressive increasing of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling (WGA-HRP) in successive stages of amygdaline kindling, after 48 h of a right amygdala WGA-HRP injection. In contrast, during the first stages the number of labeled cells in the contralateral amygdala was reduced, reaching control values after the first generalized seizure. The present paper indicates that these structures are involved in the propagation and generalization of the epileptic activity. Our findings show that both sides of the medial prefrontal cortex can be activated before the contralateral amygdaloid complex, during the development of the amygdaline electrical kindling in the rat. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Epilepsy; Kindling development; Amygdala; Medial prefrontal cortex; Wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase; Retrograde transport; Rat

Amygdaline electrical kindling (AEK) is a suitable experimental model of temporal lobe epilepsy. The development of kindling coexists with changes in the excitability of the central nervous system. These changes may be either local or may involve the recruitment of cerebral structures distant from the site where the discharge was initially produced [2,7,8,19]. Furthermore, development of AEK has been classified in five stages with distinct behavioral and electrophysiological characteristics, culminating with generalized seizures [19]. These stages include early stages or partial seizures (stages I, II and III) and later stages or generalized seizures (stages IV and V). It has been proposed that these stages involve the participation of different anatomical structures [6]. In one of our studies [13], we described changes in the wheat germ agglutinin-horseradish peroxi-

dase (WGA-HRP) labeling in different structures in fully kindled animals. However, until now it is not known when during the development of AEK the increase in WGA-HRP labeling starts. Therefore, in the present study we quantify the WGA-HRP labeling in different cerebral structures at different stages of the AEK development.

Male Wistar rats were individually housed on a 12 h light/dark cycle with food and water provided ad libitum. A bipolar electrode was stereotaxically implanted into the left basolateral amygdaloid nucleus [18]. Procedures for surgery and for kindling stimulation are described elsewhere [13]. The progression of AEK development was observed by an increase in the frequency and duration of the after-discharge, as well as, by the appearance of progressive behavioral changes. These were classified according to Racine stages [19] as follows: I, contralateral facial clonus and/or arrest; II, bilateral facial clonus plus head nodding; III, forelimb clonus; IV, rearing; and V, rearing and falling. Twenty-five animals were divided into five groups ($n = 5$), as follows: (A) rats reaching behavioral stage I; (B) rats reaching beha-

* Corresponding author. Tel.: +52-5-623-4042; fax: +52-42-340-344.

E-mail address: condes@servidor.unam.mx (M. Condés-Lara).

vioral stages II–III; (C) rats reaching behavioral stages IV; (D) rats reaching their first stage V; and (E) control rats. Subsequently each animal was anesthetized and mounted in the stereotaxic apparatus, in order to inject by pressure 15 nl WGA-HRP (Sigma) in 10% saline solution into the right basolateral amygdaloid nucleus. In all cases, WGA-HRP was injected immediately after the animal achieved the respective characteristic behavioral stage according to the group. Following a survival time of 48 h, the animals were anesthetized, perfused intracardially. See procedures in Ref. [13]. The brains were frozen, coronally cut in 40 μm thick sections, and processed with TMB [16].

The number of WGA-HRP labeled neurons within the amygdaloid complex, both medial prefrontal cortex, and fibers of the anterior commissure (ac), medial (BSTM) and lateral (BSTL) bed nuclei of the stria terminalis (8.7 mm interaural) were determined. A single blind study was carried out in which the histological sections were randomly chosen and given to one of the authors. The observer performed neuronal counts and the evaluation of the density of stained fiber bundles. To determine the number of labeled neurons, sections of the amygdaloid and medial prefrontal cortex were analyzed by a semi-automatic image processing system (Histoscan. S BIOCROM, France) [4,10]. The fiber labeling density within the ac, BSTM and BSTL, was evaluated from dark field photomicrographs, used to reconstruct the regions under study. The reconstructions were scanned and the degree of labeling was obtained by comparing them with predetermined control grayscale intensities by the program Scion-image. The different degrees of density were expressed numerically and histograms showing the amount of labeling for the different brain regions were obtained. The data were statistically examined by an analysis of variance (ANOVA). Whenever a difference was found between groups within a given specific region, the values were submitted to post-hoc Tukey test. $P < 0.05$ were considered significant.

Special attention was paid to the site and the size of the WGA-HRP injection in the basolateral nucleus for all the animals included in this study. The stain size diameter was 500 μm [13]. We will be referring to ipsilateral or contralateral WGA-HRP labeled cells and fibers with respect to the injection site in the right amygdala. The location of medial prefrontal cortex was made following the scheme suggested by Krettek and Price [11].

The number of labeled cells in the left amygdaloid complex in the different stages was variable. In group A we did not find labeled cellular bodies; in group B we found 2.20 ± 0.97 cells; in group C we found 3.30 ± 1.00 cells; in group D we found 17.40 ± 3.50 cells; and in group E control, we found 17.66 ± 4.35 cells (mean \pm standard error). These data were obtained from 12 tissue sections.

The amount of labeled cells in the medial prefrontal cortices in the groups was as follows. In group A no labeled cells were found; in group B 50.00 ± 11.20 and 23.30 ± 6.60 labeled cells were found; in group C we

found 60.60 ± 13.80 and 10.10 ± 2.60 cells, and in group D we found 127.80 ± 27.90 and 62.30 ± 12.50 cells ipsilaterally and contralaterally, respectively (mean \pm standard error) per section ($n = 24$). In all cases the greater number of labeled cells was observed on the ipsilateral side of the medial prefrontal cortex. The labeled cells number in the ipsilateral and contralateral medial prefrontal cortex in B, C and D groups were statistically significant increased ($P < 0.05$) when compared with the number of the E control group labeled cells (11.10 ± 3.61 cells in the ipsilateral side and 5.40 ± 1.60 in the contralateral one).

A progressive increase in fiber labeling was significant ($P < 0.05$) on both sides of anterior commissure, BSTM and BSTL nuclei. This increase was proportional to the development of kindling stages. These results are presented in Fig. 1.

The amygdaloid complex has been regarded as an important structure in temporal lobe epilepsy. It is thought that this is in part due to its highly differentiated structure and widespread connections with both cortical and subcortical regions [5]. The basolateral nucleus of the amygdala is connected with the medial prefrontal cortex [9,11,14,15,17], which is considered the main area of cortico amygdaloid reciprocal projections [3,17]. The pattern of cortical projections described in the present study is closely similar to that reported in a previous investigation on prefrontal-amygdaloid projection [3]. The number of medial prefrontal cortex WGA-HRP labeled cells was higher on the ipsilateral side than on the contralateral in all experimental groups. These data indicate a preferential ipsilateral projection. However, these structures are involved in other functions as they are part of the so-called 'basolateral limbic circuit' and they have been assigned a prominent role in memory and learning (see Ref. [3] for review).

Studies using the AEK in cats by Fernández-Mas et al. [7] demonstrated that the first cortical structure responding with clear spiking to the amygdala focus was the ipsilateral prefrontal cortex, followed by spiking in the contralateral prefrontal cortex. The interhemispheric transfer is mainly conducted through stria terminalis, pericommissural fibers and by the anterior part of corpus callosum to a lesser extent. The propagation to the contralateral temporal lobe amygdala is a late phenomenon, and it is involved after the cortex has been reached. Our results show variations in the WGA-HRP labeled fibers in the anterior commissure, in BSTM and BSTL nuclei, as well as the amount of labeled cells in amygdala and medial prefrontal cortex. These results indicate that these cerebral structures are associated with the propagation and generalization of the epileptic activity. In other words these structures are closely related to the installation of the AEK in the rat.

It is well known that the epileptic process is accompanied by the formation of secondary epileptic foci [2,8,19]. In the amygdaloid kindling in rats this phenomenon involves the contralateral amygdala [8,19], given the possibility that this

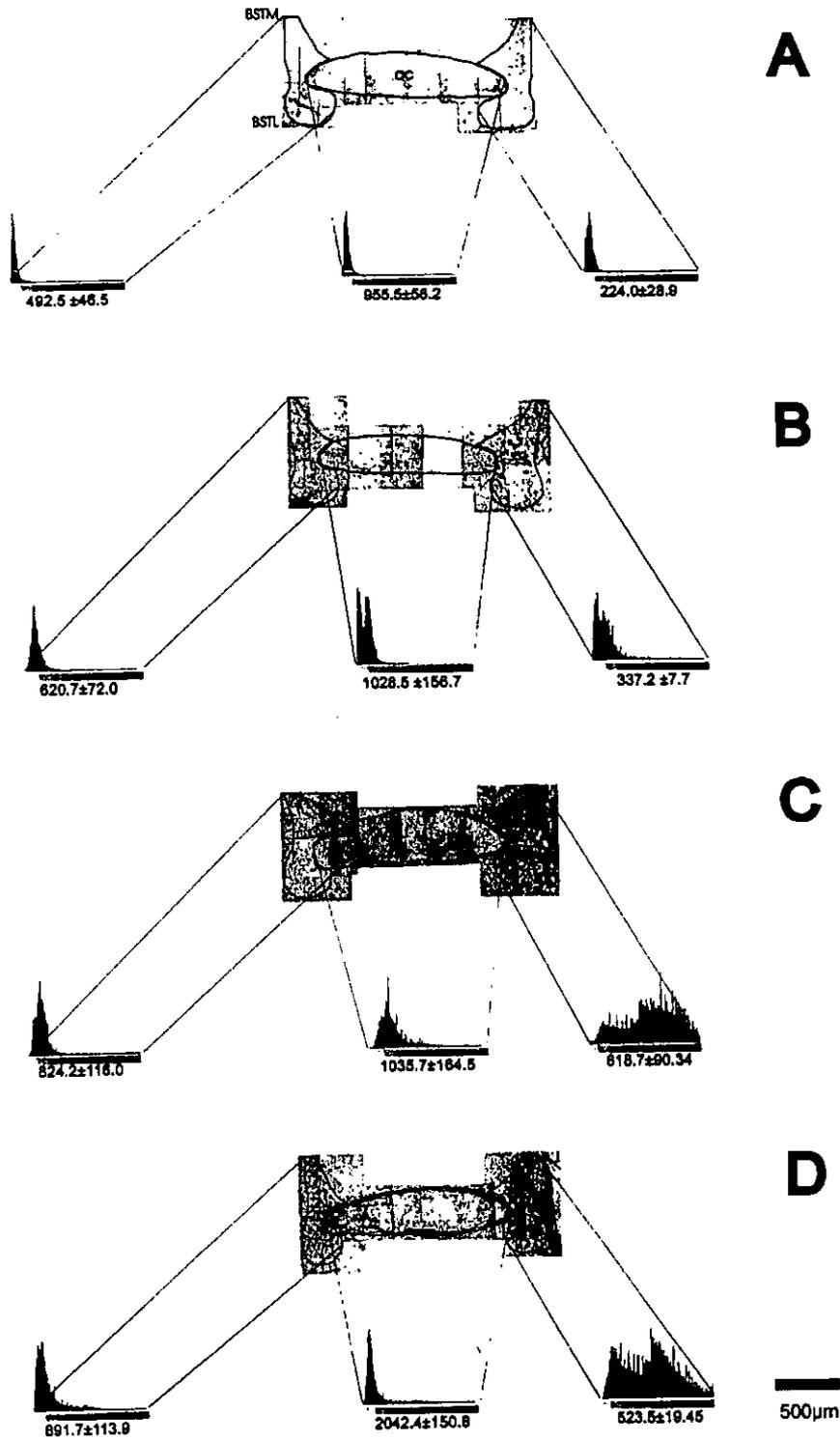


Fig. 1. Grayscale photomounting of coronal sections through the anterior commissure (8.7 mm interaural) in different experimental groups: (A) stage I; (B) stage II–III; (C) stage IV; (D) stage V. The histograms show the amount of WGA-HRP label in the different analyzed structures. Data represent values of mean \pm SEM ($n = 5$ animals per group) and they are expressed in pixels. Notice a labeling increase in all structures along the development of kindling stages. The right side corresponds to the injection site at the amygdala level.

region could be working as another epileptic focus. Since the basolateral nucleus is a subcortical and cortical link of interhemispheric communication, its possible participation as a secondary focus cannot be ruled out. In the present work, each analyzed structure presented different particularities with regard to the kindling development. For example, the number of WGA-HRP labeled cells in the left amygdala decreased in stages I, II–III, IV reaching values similar to that of the control group and stage V. On the other hand, in both sides of the medial prefrontal cortex the amount of labeled cells increased progressively through stages II–III, IV and V. These differential results between medial prefrontal cortex and amygdaloid complex labeling could be explained in the following way. In amygdaline kindling in cats, transfer effect to the contralateral amygdala is a late phenomenon compared with the prefrontal cortex [7]. These results are in agreement with our data, since an increase of labeled cells was observed first in the medial prefrontal cortex since stages II and III, but it is not until animals reach ten generalized seizures that the number of labeled cells increases dramatically in the contralateral amygdala [13]. All these results indicate that the medial prefrontal cortex is activated earlier and presents changes in the amount of labeled cells before the contralateral amygdala, as a consequence of epileptic activity propagation. Moreover, the decrease of WGA-HRP labeled neurons in the contralateral amygdala suggests a possible inhibitory control mechanism of the epileptic activity. Likewise, it is known that the medial prefrontal cortex plays an important role in the propagation of the epileptic activity [1,7,12]. Although our results do not confer an excitatory or inhibitory role to the studied structures, they do provide direct information about which structure presents modifications as a consequence of the propagation (prefrontal cortices) and generalization (amygdala) of the epileptic activity.

In fact, during the first stages of kindling development (I and II–III), there is an absence or a small amount of WGA-HRP labeled cells and fibers in the contralateral amygdala. It is possible that at these early stages other structures could be active and participating in the development of kindling by modifying their axonal transport. This is in agreement with the results obtained by Engel et al. [6] who found an increase in 2-[14C]deoxyglucose uptakes in partial and generalized seizures observed by using autoradiographic techniques. The increases were bilateral in the lateral nucleus of the stria terminalis, as well as in both amygdalae. Anyway, it is feasible that other cerebral structures, as well as other neuronal pathways could be participating in the propagation and establishment of the AEK in the rat. Finally, WGA-HRP transport could be a good tool to determine those structures closely related with the propagation and generalization of the epileptic activity.

This work was partially supported by CONCyTEQ grant

(M.C.L.). We thank Dr Fernando Barrios for technical assistance with the computerized image processing.

- [1] Bertashius, K.M., Propagation of human complex-partial seizures: a correlation analysis, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 78 (1991) 333–340.
- [2] Burnham, W.M., Primary and 'transfer' seizure development in the kindled rat, *Can. J. Neurol. Sci.*, 2 (1975) 417–428.
- [3] Cassell, M.D. and Wright, D.J., Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat, *Brain Res. Bull.*, 17 (1986) 321–333.
- [4] Corkidi, G., *Système d'Analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo, Thèse de Doctorat, Université Paris XII, France, (2000) 1989.*
- [5] DeOlmos, J., Alheid, G.F. and Beltramino, C.A., Amygdala, In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Academic Press, Sydney, 1985, pp. 223–334.
- [6] Engel Jr., J., Wolson, L. and Brown, L., Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling, *Ann. Neurol.*, 3 (1978) 538–544.
- [7] Fernández-Mas, R., Martínez, A., Gutiérrez, R. and Fernández-Guardiola, A., EEG frequency and domain mapping study of the cortical projections of temporal lobe amygdala afterdischarge during kindling in the cat, *Epilepsy Res.*, 13 (1992) 23–34.
- [8] Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K., A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation, *Exp. Neurol.*, 25 (1969) 295–330.
- [9] Granato, A., Santarelli, M. and Minciacchi, D., Bihemispheric organization of amygdalo-cortical projections in the rat, *Neurosci. Lett.*, 127 (1991) 53–56.
- [10] Hirsch, E.C., Lejeune, O., Colliot, G., Corkidi, G. and Tajani, N., Computer Methods in Nuclei Cartography, In P.M. Conn (Ed.), *Methods in Neurosciences*, Vol. 10, Academic Press, New York, 1992, pp. 83–87.
- [11] Krettek, J.E. and Price, J.L., Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat, *J. Comp. Neurol.*, 172 (1977) 687–722.
- [12] Lieb, J.P., Dasheiff, R.M. and Engel Jr., J., Role of the frontal lobes in the propagation of mesial temporal lobe seizures, *Epilepsia*, 32 (1991) 822–837.
- [13] Martínez-Lorenzana, G., Talavera-Cuevas, E., Sánchez-Alvarez, M. and Condés-Lara, M., Effects of kindling in wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase labeling in neurons of the interamygdaloid pathway in rats, *Neurosci. Lett.*, 281 (2000) 135–138.
- [14] McDonald, A.J., Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 262 (1987) 46–58.
- [15] McDonald, A.J., Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat, *Neuroscience*, 44 (1991) 1–14.
- [16] Mesulam, M., *Tracing Neuronal Connections with Horseradish Peroxidase*, Wiley, New York, 1982, p. 251.
- [17] Ottersen, O.P., Connections of the amygdala of the rat IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 205 (1982) 30–48.
- [18] Paxinos, G. and Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, London, 1982.
- [19] Racine, R.J., Modifications of seizures activity by stimulation II. Motor seizures, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 32 (1972) 281–294.