

**Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso**



**Licenciatura en Ciencias con mención en Biología
Proyecto de Unidad de Investigación II**

DESARROLLO DE UNA VARIANTE DE KINDLING RÁPIDO PARA EL ESTUDIO DE EPILEPTOGÉNESIS HIPOCAMPAL EN RATAS

ALUMNO:

**Juan Carlos Sebastián Morales Zúñiga
Licenciatura en Ciencias con mención en Biología**

PROFESORES SUPERVISORES:

Christian Bonansco Herrera, Ph.D.

Marco Fuenzalida Núñez, Ph.D.

Manuel Roncagliolo Pastene, M.Sc.

VALPARAÍSO, Marzo 2012

ÍNDICE

I. Resumen	3
II. Marco Teórico	5
III. Planteamiento De Problema	12
IV. Hipótesis	15
V. Diseño Experimental Y Metodologías	17
VI. Resultados	21
VII. Discusión	27
VIII. Conclusión	30
IX. Fuente De Financiamiento	32
X. Referencias	34

I. Resumen

Resumen

La epilepsia es una patología en la cual existe una falla en el balance entre el sistema excitatorio e inhibitorio, lo cual conduce a una actividad hiper-sincrónica creciente y duradera. El *Kindling*, uno de los modelos experimentales de epilepsia más utilizados, se basa en protocolos de estimulación eléctrica repetida de distintas estructuras cerebrales, dentro de las cuales el complejo amigdalino es el más susceptible. A diferencia del protocolo clásico o lento (KL; ≥ 16 días), las variantes de *kindling* rápido (KR; ≤ 4 días) descritos hasta ahora requieren estimulación continua, a intensidades supra-umbrales, generalmente aplicadas directamente en estructuras hipocampales, condición que podría interferir con las bases celulares de epileptogénesis. A fin de optimizar la obtención de un modelo de epilepsia hipocampal, desarrollamos un protocolo de *kindling* abreviado o rápido (KR), estimulando repetidamente el núcleo basolateral del complejo amigdalino. El protocolo consistió en 10 trenes de pulsos de 10 seg de duración, a 50 Hz, a intervalos de 20 min, por día, durante 3 días, a intensidad subumbral y subconvulsivante, 20% bajo el umbral de generación de post-descargas (PD). El desarrollo del cuadro epileptoide fue evaluado a través de registros electroencefalográficos en corteza y amígdala, conjuntamente con el monitoreo visual sincronizado (i.e.: videograbación), para analizar los cambios conductuales de la rata durante la inducción, desarrollo y establecimiento del estado epiléptico (i.e.: escala de Racine). El protocolo de KR reproduce la evolución conductual, incremento progresivo de las postdescargas (PDs), y patrón EEG del KL. El protocolo de KR indujo *Kindled state* como el protocolo tradicional en 10 veces menos tiempo. El estado R5 se alcanza consistentemente en 30 estímulos, después de los cuales se manifiesta de manera permanente y define el establecimiento del *kindled state*. Produce actividad eléctrica inducida y creciente, en ambos hemisferios, con una cantidad variable de PDs. Existe una correlación positiva entre la duración de la PD y el estado de Racine asociado. Del análisis de la correlación entre el número de estímulos y la duración de la PDs se obtiene un modelo de la progresión, que permite predecir el estado de Racine dado número de estímulos. En conclusión, se dispone de un protocolo de KR que reproduce los resultados obtenidos por protocolos de mayor duración, pero en un tiempo sustancialmente menor, y manteniendo parámetros de inocuidad.

II. Marco Teórico

Marco Teórico

a) Epilepsia

La epilepsia es un síndrome neurológico crónico, que se caracteriza por una hipersincronía, hiperexcitación e hipoinhibición neuronal, que puede comprometer diversas estructuras, tanto corticales como subcorticales (McIntyre et al., 2002; Morimoto et al., 2004). Los cambios producidos por los ataques epilépticos generan cambios estructurales y funcionales en las zonas afectadas, tanto a nivel molecular (canales, receptores, rutas bioquímicas, etc), celular (cambios en la morfología de las sinapsis y el brote de terminales axónicos), como circuitales. En síntesis, la epilepsia puede producir una compleja y extensa reorganización de varias áreas cerebrales.

Según el territorio cerebral comprometido, los ataques epilépticos pueden ser divididos en focales (parciales) o generalizados. Según el compromiso de conciencia de estos episodios, se pueden clasificar como convulsiones simples o complejas. De los muchos tipos de epilepsia, la variante del lóbulo temporal o Mesial (*Temporal Lobe Epilepsy*, TLE) es la más común y resistente a tratamiento con drogas, y su foco reside en estructuras subcorticales pertenecientes al sistema septohipocampal (Morimoto et al., 2004), incluidas la formación hipocampal y complejo amigdalino (Esquemas 1 y 2). A través de estudios imagenológicos por resonancia magnética (MRI, *Magnetic resonance imaging*) y tomografía por emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*) se ha descrito atrofia hipocampal y disminución en la irrigación sanguínea local en etapas interictales, la cual aumenta durante los periodos ictales. Estudios en tejido hipocampal obtenidos de pacientes de TLE farmacoresistentes, han mostrado signos de esclerosis, con pérdida de células piramidales, astrogliosis reactiva, germinación axonal, además de reorganización neuronal. (Aroniadou-Anderjaska et al., 2008; Pekny et al., 2005). Para el estudio de este síndrome se han utilizado y desarrollado distintos modelos animales, entre los que se cuentan modelos farmacológicos (i.e.: pilocarpina; kainato) como electrofisiológicos (i.e.: modelo de tres cámaras; *kindling*).

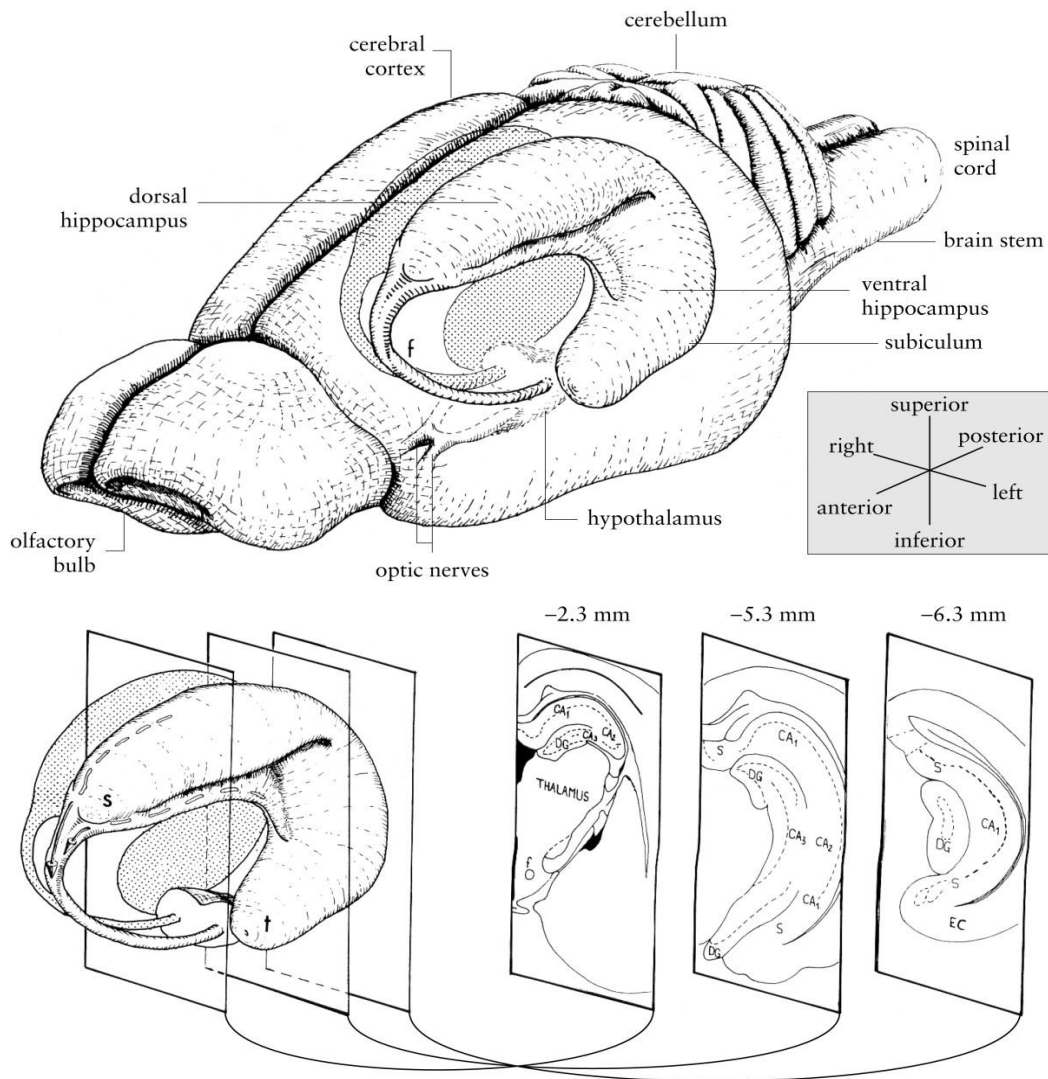
b) Modelos experimentales de epilepsia.

Dentro de los modelos experimentales, se han descritos varios tipos desarrollados tanto *in-vivo* como *in-vitro* (Mcnamara et al., 2006. ; Morimoto et al., 2004). Estos modelos son clasificados según el tipo de estimulación utilizada, en fármacológicos y eléctricos. Los modelos *in-vitro* carecen de la progresión y evolución temporal que caracteriza el desarrollo de un síndrome epiléptico, siendo esta su mayor desventaja, por lo que generalmente deben ser corroborados en estudios *in-vivo* (Peterson et al., 1998). Los modelos *in-vivo* son los que primero fueron desarrollados, y por tanto han sido más ampliamente utilizados por sus características sintomatológicas y similitud con la progresión del cuadro convulsivo observado en epilepsia. Dentro de ellos, los mas difundidos han sido *Status epilepticus* y *Kindling* (Goddard, 1967, 1983; Goddard et al., 1969, Lothman et al., 1972; Racine, 1972). En el presente trabajo nos centraremos en Kindling.

c) Kindling.

Kindling, es un modelo de epilepsia basado en estimulación eléctrica diaria en áreas subcorticales (Goddard, 1967; Goddard et al., 1969; Peterson et al., 1998). Los trabajos iniciales utilizaban un estímulo estándar para todos los sujetos (estímulo sinusoidal bifásico de 50 μ A, de 60 Hz, por 60 seg, una vez por día) (Goddard, 1967) en amígdala (núcleo basolateral, Esquema 3), y luego de generar crisis convulsivas generalizadas con reclutamiento motor alternante (convulsiones clónicas), eran evaluados los umbrales de post-descargas post-kindling y tasa de kindling. Esta forma de estudio necesariamente despreciaba toda condición previa al establecimiento del estado kindleado, además de la susceptibilidad propia de cada sujeto a la progresión del protocolo, independiente de las causas. Trabajos posteriores ya mencionan la existencia de umbrales de post-descarga previo y posterior al protocolo de kindling, además de un umbral teórico de kindling, que no necesariamente coincide con el umbral de post-descarga tanto pre o post kindling (Goddard, 1983).

Los sistemas cerebrales en los cuales puede ser realizado el protocolo de kindling, independiente del protocolo de kindling utilizado, presentan distinta susceptibilidad de inducción al kindling (Esquema 2), determinando diferencias radicales en las características del protocolo según la estructura estimulada, tales como frecuencia, intensidad y número de estímulos necesarios para inducir kindling y alcanzar el *kindled state* (Goddard et al., 1969; Morimoto et al., 2004).



Esquema 1. Diagrama del hipocampo. Disposición tridimensional del hipocampo de una rata. Abajo, secciones coronales de hipocampo a distintas distancias relativas al bregma. CA1-3, *cornu ammonis*; DG, *dentate gyrus*; EC, *entorhinal cortex*; S, *subiculum*; s, polo septal del hipocampo; t, polo temporal del hipocampo; f, *fornix*.

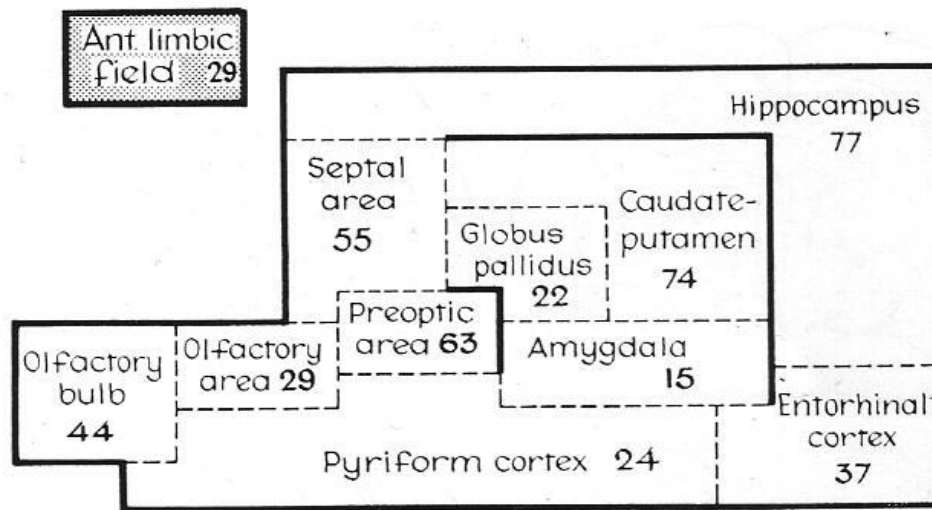
(Cheung et al., 2005)

De acuerdo a la descripción clásica de Racine, existe una escala conductual de 5 puntos (en amígdala) para evaluar la progresión del protocolo, llamada estados de Racine (*Racine stages*; Racine, 1972), donde el punto más alto (estado 5) corresponde a convulsiones generalizadas, clónicas y pérdida de control postural por parte del sujeto. En términos generales, los estados son los siguientes:

1. R1; Guiño del ojo, ipsilateral al electrodo de estimulación, junto con gesticulación oro-alimentaria, y contracciones faciales (*clonus facial*).

2. R2; Movimientos oscilatorios de la cabeza (*nodding*).
3. R3; Movimientos clónicos del tren anterior.
4. R4; Erección del cuerpo sobre los trenes posteriores.
5. R5; Pérdida del control postural y sacudidas generalizadas.

Cabe hacer notar que cada estado de Racine incluye a las etapas anteriores (i.e.: el estado 3 de Racine incluye las conductas del estado 2 y 1).



Esquema 2. Diagrama de susceptibilidad a kindling. Los números representan la cantidad media de trenes necesarios para producir la primera convulsión cuando se realiza kindling en cada una de esas regiones. (Goddard et al., 1969)

La relación que existe entre los estados de Racine y la duración de las PDs es ascendente, tanto para la duración (Bravo et al., 2009) de estas como su frecuencia (Tsuchiya et al., 2011; Bravo et al., 2009; Musto et al., 2009).

Actualmente, existen muchas variantes de protocolos de kindling. Agrupando todas, es posible diferenciar dos tipos globales de protocolos: Los tradicionales (lentos, o largos) (Goddard, 1967; Goddard et al., 1969; Bravo et al., 2009; Dragunow et al., 1985) y los abreviados (rápidos, o cortos) (Lothman et al., 1972; Rempe et al., 1997; Gilbert et al., 1981; Musto et al., 2009), no obstante los protocolos utilizados por el grupo de Lothman (1972) son considerados como protocolos de *status*

epilepticus a pesar de utilizar estímulos eléctricos, y ello se debe a que producen actividad convulsiva desde el inicio y constante, no de forma gradual y creciente como en los protocolos de kindling tradicionales. Los protocolos tradicionales son aquellos donde el sujeto es estimulado una o dos veces al día, con una duración total de >12 días. Estos presentan varios parámetros de inocuidad (que no están presentes en los abreviados), como son: intensidades de estimulación subumbral (pudiendo ser para PD como para convulsiones, o ambas), lugares de estimulación distinto de donde se realizarán los registros electrofisiológicos (registros de campo, *patch-clamp*, intracelulares, etc.), y la progresión del desarrollo hasta alcanzar *kindled state*. Los protocolos abreviados presentan además otras ventajas: principalmente el tiempo para alcanzar el *kindled state* (R5) es apreciablemente más corto, por lo que permite obtener un gran número de sujetos en poco tiempo, ya que obtener un sujeto desde el momento de la operación hasta el término del protocolo puede tomar hasta un mes, lo que es una limitante para procedimientos donde se evalúa kindling en distintas etapas del desarrollo de un sujeto (Gilbert et al., 1981), mientras que en la versión abreviada puede tomar solo una semana y media si se desea.

En síntesis, al elegir un protocolo debemos optar entre rapidez o inocuidad.

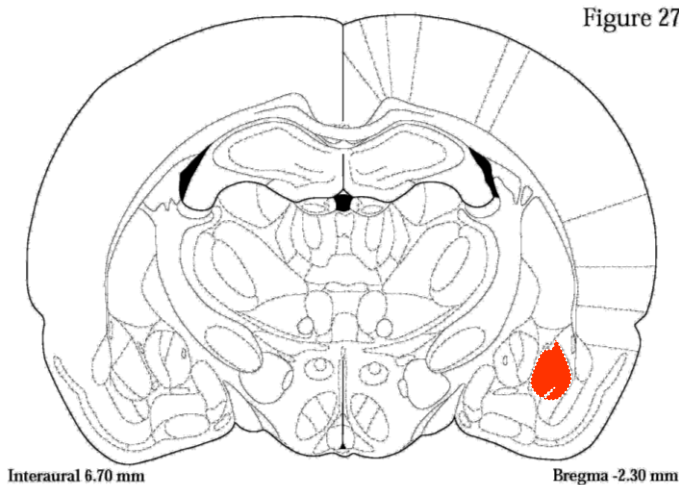


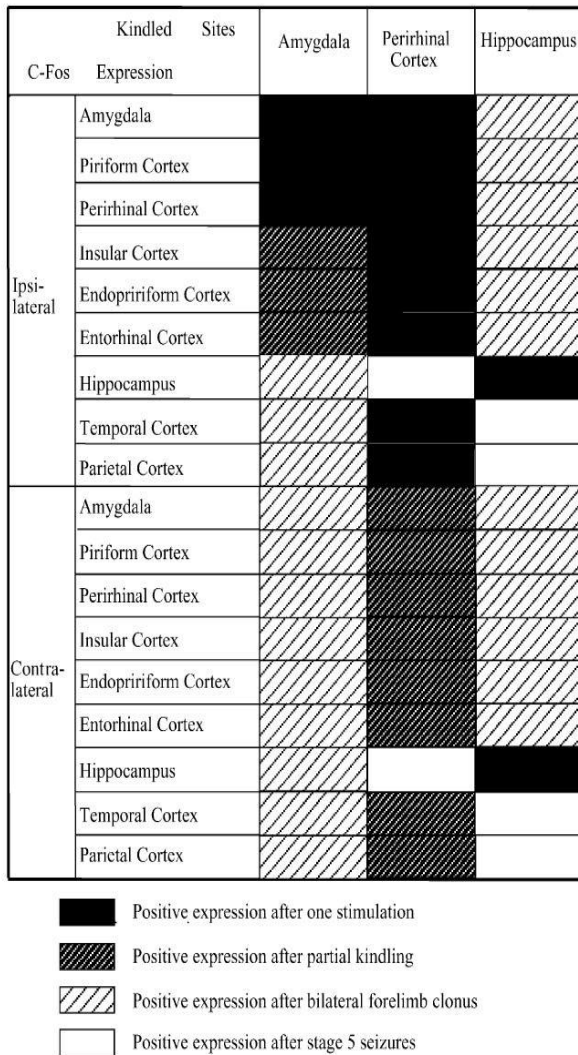
Figure 27

Esquema 3. **Sección coronal de encéfalo de rata.** El área resaltado encierra al núcleo basolateral de la amígdala (BLA, por sus siglas en inglés), que es una de las estructuras que requiere de menor cantidad de estímulos para llegar a estado 5 de la escala de Racine. Coordenadas coronales de -2,30 mm posterior al bregma; las escalas (vertical y horizontal) se encuentran en milímetros. (Paxinos et al., 2007)

d) Fenómeno de proyección.

Los sistemas cerebrales capaces de sostener un estado kindleado modifican a otros sistemas en el desarrollo del protocolo. Esto es evidenciado desde el punto de vista electroencefalográfico, electrofisiológico y molecular (Abe, 2001; Bertram, 2009 ;Corcoran et al.,2011; Schubert et al., 2005; Von Bohlen et al., 2004; Wierenga et al., 1999). Los cambios morfológicos y funcionales de las distintas estructuras del sistema límbico dependen del lugar de estimulación y del protocolo utilizado.

La conectividad entre el complejo amigdalario y el hipocampo ha sido evidenciada para el protocolo de kindling mediante estudios de expresión de genes tempranos como c-fos (Sato et al., 1998) o por expresión anómala de genes (Corcoran et al., 2011) y su patrón de expresión, dependiendo del lugar inicialmente estimulado (Figura 4). En la misma línea, estudios electrofisiológicos han demostrado la transferencia de alteraciones funcionales entre los núcleos amigdalinos y sus proyecciones a nivel cortical y sistema límbico, incluido hipocampo (Ishikawa et al., 2006; Abe, 2001; Pitkänen et al., 2000).



Esquema 4. Diagrama de expresión de C-Fos. La figura describe la expresión de el gen temprano C-Fos luego de distintos trenes aplicados. Ahi se aprecian tres distintas zonas de estimulación (Amígdala, Corteza peririnal e Hipocampo), y la detección es realizada tanto en el hemisferio ipsilateral como contralateral. (Sato et al., 1998)

III. Planteamiento del Problema

Planteamiento De Problema

De las características metodológicas de los protocolos antes mencionados, se identificó la problemática de determinar un patrón de estimulación enérgica, utilizando intensidades convulsivantes ($>200 \mu\text{A}$, $>20 \text{ Hz}$, >10 trenes por día), aplicada directamente en la estructura de interés (estimulación sobre la zona a registrar) o progresiva, utilizando intensidades subconvulsivantes ($<200 \mu\text{A}$, $<60 \text{ Hz}$, <4 trenes por día). Quedaron descartados aquellos protocolos lentos con intensidades de estimulación altas (supra-umbrales). Las inconveniencias de los primeros (i.e.: enérgicos) reside en no poder sortear las críticas de si en realidad la neuropatología se debe a un proceso inductivo o simplemente a un daño producido por las características de la estimulación aplicada. El segundo tipo de estimulación subconvulsivante, si bien salvan estas críticas, requieren un tiempo de presentación repetida del estímulo, inicialmente inocuo, durante un tiempo extremadamente prolongado.

Por lo tanto se hace necesario desarrollar un protocolo mixto, que rescate las mejores características de ambos, ya que de esta forma podría ser aplicado a distintas fases del desarrollo, permitiendo descartar daños producidos por el estímulo aplicado directamente sobre la estructura de interés.

Dadas las condiciones antes mencionadas, **¿es posible desarrollar un protocolo de inducción de kindling en amígdala, utilizando parámetros de estimulación subumbral repetida en un periodo de tiempo menor al utilizado tradicionalmente?**

De forma más específica, el protocolo a desarrollar debe reunir las siguientes características:

1. Intensidades de estimulación inferiores a $200 \mu\text{A}$,
2. Pulsos de una duración de 1 ms
3. Frecuencias de estimulación entre 20 y 60 Hz,
4. Si el tren de estimulación dura más de un segundo, los pulsos deberán ser de polaridad alternante para evitar interferencia por cargas capacitivas y problemas relacionados con el desgaste de los materiales del electrodo.
5. Intervalos entre estímulos mayores o iguales a 20 minutos, para permitir la recuperación entre estímulos del sujeto,
6. Una duración total del protocolo diaria no superior a 3 horas,

7. Una duración total no mayor a 5 días.

IV. Hipótesis

Hipótesis

La inducción de actividad epileptoide progresiva puede ser inducida por un protocolo de kindling de corta duración, modificando los parámetros de estimulación para hacerlos inicialmente inocuos.

a) Objetivo general:

Diseñar un protocolo de kindling de corta duración o abreviado, que a través de estimulación subumbral y subconvulsivante, permita el desarrollo de kindling.

b) Objetivos específicos:

1. Diseñar un protocolo de kindling rápido, variando los parámetros de estimulación eléctrica aplicada en el núcleo basolateral de la amígdala.
2. Comparar los resultados del protocolo de kindling rápido con los resultados obtenidos anteriormente en este laboratorio utilizando el protocolo tradicional.
3. Relacionar las características de las respuestas eléctricas obtenidas por registro electroencefalográfico (EEG) con la actividad conductual, que permita determinar la progresión epileptogénica.

V. Diseño experimental y metodologías

Diseño Experimental Y Metodologías

La inducción de kindling se realizará mediante estimulación eléctrica en la amígdala derecha. Para ello será realizado el monitoreo electroencefalográfico EEG de la actividad eléctrica en amígdala y en corteza parietotemporal, en paralelo al monitoreo conductual a través de videograbaciones. Adicionalmente, se realizará registros electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo, a través de registros de campo.

a) Animales

Ratas de la cepa Sprague Dawley de 120 días, con pesos aproximados entre 250 a 300 gr. serán intervenidas quirúrgicamente. Se utilizarán machos y hembras. Todos provenientes del bioterio de la facultad de ciencias de la Universidad de Valparaíso. Todos los animales han sido sometidos a condiciones de 12 hora de luz y 12 horas de oscuridad a 25°C de temperatura, además de alimentación *ad libitum*. Los animales seleccionados para cirugía serán sacados del bioterio y acomodados en una habitación distinta durante todo el protocolo, con las mismas condiciones, pero en cajas de plástico. Durante el protocolo los animales serán trasladados junto con la caja de plástico.

b) Cirugía estereotáxica

Los animales serán sedados con una combinación de Ketamina 10% (57,0 mg/Kg, Troy Laboratories, Australia) y Xilacina 2% (9,0 mg/Kg, Laboratorio Centrovét Ltda., Chile) administrados por vía intraperitoneal, para luego ser intervenidos dentro de un aparato de cirugía estereotáxica (David Kopf, modelo 900), según esquema de Paxinos (2007). La implantación de electrodos por cirugía estereotáxica fue realizada según el método de Cooley (2005). Los materiales quirúrgicos utilizados fueron esterilizados (Clorhexidina Gluconato, solución tópica 2%, Difempharma).

La estimulación se realizó con un electrodo bipolar trenzado, de acero inoxidable aislado con teflón (0,008 - 0,2 mm de diámetro, Plastics one inc.), posicionado en el núcleo basolateral del complejo amigdalino (coordenadas Br. -2.12 mm, ML. 5.0 mm, DV. 8.0 mm), el cual podrá ser utilizado también como electrodo de registro amigdalino. El registro EEG fue realizado bilateralmente en la corteza,

utilizando tornillos de acero inoxidable (1.45 mm de diámetro), los cuales se encontrarán dispuestos en corteza motora primaria M1 (1.45 mm de diámetro, Br. -2.12 mm, ML. \pm 2.0 mm, DV. 1.5 mm) y en corteza visual secundaria V2MM (Br. -6.12 mm, ML. \pm 2.5 mm, DV. 1.5). Una vez posicionados los electrodos, serán fijados con acrílico dental, para luego insertar los terminales en una base de plástico de 6 conectores (Plastics One Inc, USA). Una vez terminada la cirugía, los animales tendrán una semana de reposo para recuperación, y luego se procederá con la estimulación. Durante la primera semana pueden ser tomados los umbrales.

c) Sistema de registro

El registro de Amígdala será realizado a través de un amplificador diferencial análogo (AM-Systems, modelo 1700) con una ganancia de 1000x y filtrado 1Hz a 500Hz, para luego ser digitalizado a 1kHz de muestreo en un amplificador PoweLab 4/25T y con un filtro pasa bajo de 20 Hz, con un rango de 500 mV para señal de entrada única, y posteriormente dividido aritméticamente por 1000. Los electrodos de corteza serán conectados directamente al bio-amplificador PowerLab 25T con un rango de 2mV, con una tasa de muestreo de 1kHz y filtrados entre 1 Hz y 50 Hz, además de un filtro de corriente alterna casera (mains filter), a través del software LabChart v7 (Windows XP).

d) Protocolo de kindling rápido (KR)

El protocolo consistió en 30 trenes (estímulos), 10 por día, con un intervalo entre estímulos (IEE) de 20 minutos. Cada tren estaba compuesto por pulsos de 1 ms de duración a una frecuencia de 50 Hz, sin embargo para evitar interferencia capacitiva debido a la duración del tren, los pulsos fueron de polaridad alternada lo que causó una frecuencia aparente de 25 Hz en el análisis espectral. La amplitud de los pulsos fue ajustada para ser subconvulsiva y subumbral, 20 % debajo del umbral mínimo inicial de PD. Los umbrales fueron obtenidos incrementando las corrientes de estimulación empezando con 10 μ A, e incrementándola en un factor de 1.25 cada 10 minutos hasta la aparición de PD. Una vez que fue observada una PD, en cualquier canal, el umbral fue fijado a esa intensidad, y la intensidad de estimulación fue el nivel anterior (20% menos intensidad), por lo tanto el estímulo inicial fue inocuo. A pesar del hecho de que la intensidad inicial de la escala fue 10 μ A, el testeo para PDs fue empezado a 19.53 μ A, y todos los sujetos con PD sobre los 227.37 μ A fueron descartados.

La progresión convulsiva fue evaluada de acuerdo a los estados de Racine mediante inspección directa, y corroborada por revisión posterior de las videgrabaciones. La duración de la primera PD fue medida en cada estímulo fue anotada junto con su correspondiente estado de Racine.

f) Comprobación del lugar de estimulación

Mediante perfusión intra-cardiaca con paraformaldehído al 4%, será fijado el cerebro para posterior tinción de *Nissl*. Ello permitirá identificar el lugar donde el electrodo estimulará y si es consistente con los esquemas estereotáxicos utilizados.

a) Análisis de datos

El análisis de datos fue hecho con el software originlab, evaluando diferencias significativas mediante t-student sobre dos muestras con un nivel de significancia de 0.05, y además del test de normalidad Shapiro-Wilk. También fueron realizadas regresiones lineales con *Direct Weighting*. Estos análisis fueron realizados por igual a todos los datos, es decir que no fueron realizadas otras variantes. Durante la adquisición de EEG, el software LabChart fue utilizado para medir la duración de las PDs, mediante análisis espectral y de datos brutos del registro.

VI. Resultados

Resultados

a) Perfiles de estimulación y umbrales

Los Umbrales a partir de los cuales fueron obtenidas las intensidades de estimulación y utilizadas este estudio de KR (Figura 1.) han mostrado diferencias significativas de los obtenidos del protocolo tradicional (KL). Estos umbrales son significativamente más bajos en intensidad. Por lo tanto, la intensidad de los estímulos no fue la causa de la susceptibilidad de los sujetos al protocolo. Duraciones de estimulación mayores (i.e: >10 s), reducen la intensidad del estímulo en un 70%, disminuyendo la posibilidad de daño al tejido debido a shock eléctrico, y haciendo más factible el cambio por estimulación del tipo tetánica.

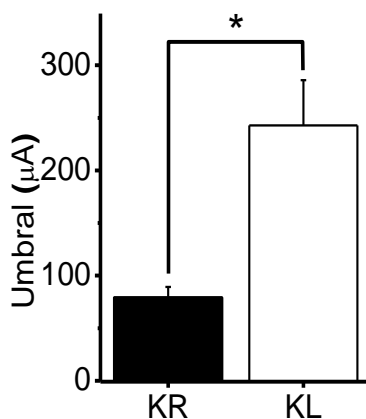


Figura 1. **Umbrales obtenidos para protocolo de KR y KL.** Cada columna corresponde a la intensidad promedio (e.e.) para los dos protocolos. Existe diferencia significativa entre los dos protocolos.

b) Análisis conductual y estados de Racine

Los sujetos mostraron respuestas convulsivas de intensidad creciente, causada por la estimulación aplicada (Figura 2). Los trenes (estímulos) necesarios para alcanzar R2 y R5 fueron comparados con los equivalentes para KL, respectivamente (Figura 3), no mostrando diferencia significativa entre ellos. La progresión conductual diaria aparentemente no alcanza Racine 5 si es promediado el avance entre los sujetos, debido a la fatiga entre algunas de los ataques, y esto es debido a que el intervalo entre estímulos no es suficiente para una recuperación completa entre ataques, además de la progresión asincrónica de los sujetos. Para sortear este problema (que no esta presente en KL debido a que el intervalo entre estímulos es de un día), por cada día el primer estado de Racine es considerado como

base y solo las respuestas posteriores iguales o mayores son usadas en la promediación, de esta arreglando el problema generado por respuestas con fatiga (Figura 2, RK). En la Figura 2 fueron comparadas las progresiones de KR y KL, mostrando similares avances a pesar del hecho que al KR le tomo menos de 3 días el alcanzar Racine 5.

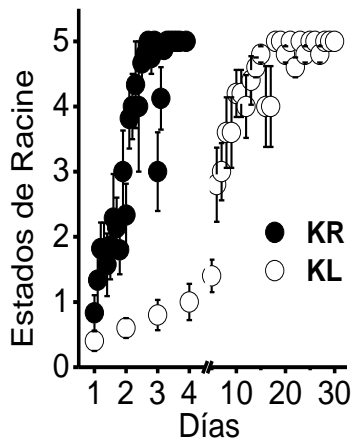


Figura 2. **Desarrollo temporal de los estados de Racine para protocolos de KR y KL.** El avance de ambos protocolos fue graficado contra los días de aplicación del protocolo, lo cual para el protocolo de KL implica también trenes, pero para el protocolo de KR no, ya que tiene 10 trenes por día.

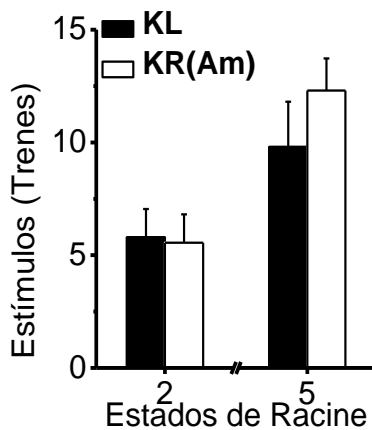


Figura 3. **Trenes necesarios para alcanzar estados 2 y 5, para KR y KL.** Comparación entre KR (en amígdala), y KL muestran que no existen diferencias significativas entre los estados 2 ni en los estados 5, pero si entre el estado 2 y 5 de cada protocolo.

c) EEG y duración de PDs

La duración de las PDs crece progresivamente hasta el 6^{to} tren (En los canales de amígdala las PDs presentan distribución normal), y desde el 7^{mo} tren hacia delante (exceptuando el intervalo entre 9 y 13 trenes) las PDs comienzan a variar abruptamente debido a la fatiga producida por los ataques, por lo tanto los patrones de duración de las PDs fueron asincrónicos entre los sujetos. Para sortear este problema, cada 5 trenes fueron tomados los máximos locales, y así mostrar el nivel máximo de progresión por intervalos. Los patrones de PD de KR son similares a los de KL, solamente más cortos (Figura 4). No hay diferencia significativa en la duración de las PDs por canales, desde el 3er estímulo

(datos no mostrados), debido a un rápido reclutamiento de las diferentes estructuras subcorticales sobre ambos hemisferios. No obstante, aunque algunos de los sujetos presentaron más de una PD, solo la primera PD fue considerada ya que solo durante esta son observadas convulsiones de tipo clónica.

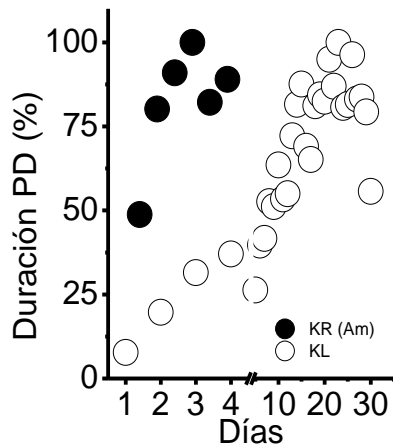


Figura 4. **Progresión de la duración de la primera PD para protocolos de KR y KL.** Para KR, fueron tomadas las duraciones máximas cada 5 trenes (estímulos). Para ambos, fueron normalizados tomando la máxima duración de una PD como 100%.

d) Correlación entre la escala de Racine y los parámetros de las PDs.

La progresión de la duración de las PDs en KR es menor que en KL, pero eso no implica un desarrollo incompleto del protocolo, porque el el *Kindled state* fue alcanzado, de acuerdo al análisis conductual. Comparaciones de las duraciones de las PD contra los estados de Racine no mostraron diferencias significativas entre los canales (amígdala, ipsi y contralateral), excepto por los canales 1 y 3 en amígdala los cuales mostraron diferencias significativas comparadas contra ipsi y contralateral (Figura 5). La duración de las PDs en función de los estados de Racine fueron comparados entre protocolos (para el canal de amígdala) mostrando diferencias significativas de Racine 3 a 5 (Figura 6). Además, en KR existió PD para estados 0 de Racine, lo cual no ocurrió para el KL, demostrando que las PDs no preceden necesariamente a un ataque, sin embargo todos los ataques tiene PDs.

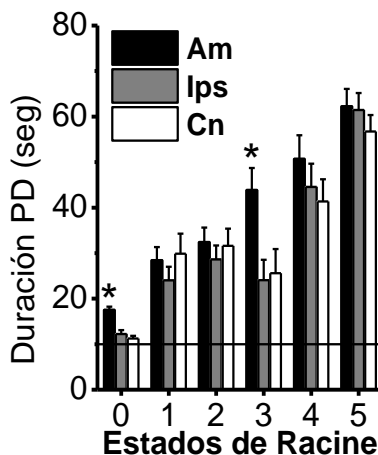


Figura 5. **Duración de las PDs para cada estado de Racine, por cada canal.** Duración promedio de la primera PD. Por estados, no se observan diferencias significativas excepto para el estado 0 en amígdala, y para el estado 3 también amígdala. A pesar de lo anterior, los canales de corteza no muestran diferencias significativas. La línea indica la duración del estímulo.

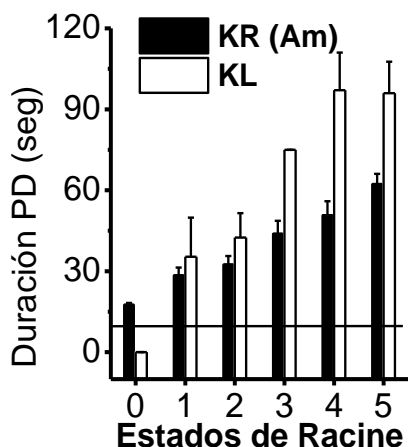


Figura 6. Comparación de la duración de las PD para protocolo de KR (en amígdala) y KL. Existen diferencias significativas para los estado del 3 al 5, entre ambos protocolos. El protocolo de KR posee PD en estado 0, mientras que KL no los tiene. La línea indica la duración del estímulo.

e) Modelo predictivo para el desarrollo epileptico

La evaluación de los estados de Racine es más propensa a errores debido a lo naturaleza cualitativa y subjetiva. Por ello realizamos un modelo predictivo basado principalmente en la progresión de las PD en función de los trenes, encontrando que para el rango del primer al sexto tren y del noveno al treceavo en amígdala existieron distribuciones normales para las muestras y de duración creciente con respecto al tren. Por ello mediante análisis de regresión lineal para esos intervalos se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla 1.

Rango (trenes)	Modelo		Pearson's r/Adj. R-square
	Intercepto [seg] (e.e.)	Pendiente[seg/tren] (e.e.)	
1-6	13.93184 (1.65219)	2.85923 (0.36235)	0.96935/0.92455
9-13	-33.82292 (20.45228)	6.59009 (1.807)	0.9033/0.75461

Tabla 1. Resultados para la regresión lineal por intervalos.

Procedimos de igual forma para las PDs en función del estado de Racine, obteniendo los resultados que aparecen en la tabla 2.

Modelo		Pearson's r/Adj. R-square
Intercepto [seg] (e.e.)	Pendiente[seg/tren] (e.e.)	
17.59119 (0.5279)	8.61853 (0.15536)	0.99163/0.97915

Tabla 2. Resultados de regresión lineal para PD vs. Racine.

Los modelos anteriores pueden ser utilizados como co-funciones por rangos, donde la variable independiente son los trenes de estimulación, y el resultado (la duración de las PDs) utilizado en la función inversa del modelo de la Tabla 2, para obtener el estado de Racine a un número de trenes determinado.

VII. Discusión

Discusión

Este estudio tuvo como propósito crear una variante de kindling rápido con parámetro de inocuidad. Para ello, debió mantener parámetros encontrados en protocolos lentos. Es decir, 1) 20% de intensidad de estimulación bajo el umbral de PDs, 2) un lugar de estimulación distinto a la región de interés (i.e.: hipocampo) y 3) evolución progresiva del síndrome epiléptico. Los resultados muestran que el protocolo desarrollado cumple satisfactoriamente con estos requerimientos. La progresión del KR fue un décimo del tiempo utilizado para KL. Debido a que el estímulo de KR es más largo (10 segundos), la intensidad fue reducida en un 70% comparada con el protocolo de KL.

El comportamiento convulsivante fue inducido en ratas adultas utilizando estímulos eléctricos, con intervalos cortos e intensidades inicialmente subconvulsivantes (cada sujeto poseía un umbral particular), alcanzando R5 en un periodo de menos de 3 días. Una vez que el animal alcanzó kindled state (todos los estímulos producen estados 5) no fueron observadas convulsiones espontáneas, incluso en aquellos que presentan más una PD, por lo tanto el foco epiléptico fue el electrodo estimulador durante el protocolo, y la lesión producida por la cirugía no causó comportamiento anormal ni comportamiento de tipo epileptoide en ninguno de los sujetos. El tren de KR (estímulo bipolar), fue configurado teniendo en cuenta la interferencia capacitiva debido a la estimulación unipolar de duraciones superiores a 2 segundos, y la consecuente degradación y producción de metales tóxicos libres sobre el tejido.

La progresión el protocolo fue dependiente del número de trenes en ambos protocolos, y no por la duración total de estos (Figuras 1 y 4). Este patrón de epileptogenesis demuestra que la progresión es dependiente de estimulación, y que la duración del tren es responsable de la intensidad del estímulo y el intervalo entre estímulos mínimo, sin embargo no está clara la relación entre la intensidad del estímulo y el intervalo entre estímulos.

La duración mayor de las PDs en el protocolo de KL para los estados de 3 a 5, es contrastada con el hecho de que para la misma cantidad de tiempo la duración máxima promedio del KR es mayor, y además cuando es considerada un subgrupo con varias PDs, y se realiza un grafico análogo a la Figura 5, la duración de las PD para estado 5 son de 90 segundos en promedio para canales de corteza, mientras que en el protocolo tradicional tienen en promedio para estado 5 una duración de 96 segundos. Dado lo anterior, es probable que para mayor cantidad de estímulos aumente el número de PDs por

estímulo y estas comienzan a fusionarse en una sola PD de larga duración. Es probable que en el kindled state, la aparición de PDs consecutivas por estímulo sea el reflejo de una susceptibilidad mayor por parte del tejido epileptoide en el núcleo BLA, y que la mayor duración individual de cada PD un incremento en la potenciación del tejido para mantenerse produciendo PDs, no obstante fue observado en varios sujetos una fusión entre las PDs individuales, sin incremento de la duración total del ataque. Lo anterior sugiere que esta condición puede ser la manifestación de otros núcleos acoplados, ubicados en otras zonas de proyección. Se ha descrito que las fusiones de PDs pueden corresponder a superposiciones temporales generadas desde distintos focos (Lothman et al., 1972).

A pesar de los resultados asincrónicos producidos por la fatiga posterior a una convulsión, fue posible elaborar un modelo de predicción de estados de Racine en función de PD y estas en función de los trenes en dos intervalos de trenes de estimulación. El primer intervalo presentó resultado de regresión con coeficiente de Pearson de 0.97, lo que indica que existe una actividad creciente y con buen ajuste, lo cual lo faculta como buen modelo predictivo ($r^2=0.92$), sin embargo el segundo rango presenta una variabilidad mayor y esto está reflejado en su $r^2=0.75$, lo que indica que no es tan bueno como el primer modelo, sin embargo igual es útil. Para el modelo de PDs en función de Racine, el modelo obtenido es altamente fiable y ofrece buena predictibilidad, y dado lo subjetivo de las observaciones conductuales permitiría determinar con más fiabilidad entre estados.

VIII. Conclusión

Conclusión

El protocolo de KR desarrollado en el presente estudio reproduce los resultados obtenidos por protocolos de mayor duración, pero en un tiempo sustancialmente menor, y manteniendo parámetros de inocuidad.

- El protocolo alcanza una cantidad de estados de Racine 5 igual o mayor a 3, en menos de tres días, lo cual lo faculta para inducir *kindled state* en los sujetos.
- Produce actividad eléctrica inducida y creciente, y que se propaga por ambos hemisferios, con una cantidad variable de PDs.
- Existe una correlación creciente entre la duración de una PD y su estado de Racine asociado.
- Es posible predecir mediante un modelo doble, a que estado de Racine es posible llegar dada cierta cantidad de trenes, en dos rangos disjuntos.

IX. Fuente De Financiamiento

Fuente De Financiamiento

Los costos asociados a esta investigación son los siguientes:

- ▲ Fondecyt 1100385; DIPUV 40/2007 CID-DIPUV Dr. Christian Bonansco Herrera.
- ▲ Fondecyt N° 11090059 Dr. Marco Fuenzalida Núñez.
- ▲ DIPUV 46/2007 CID-DIPUV Dr. Manuel Roncagliolo.

X. Referencias

Referencias

- Abe Kazuho.** 2001. Modulation Of Hippocampal Long-Term Potentiation By The Amygdala: A Synaptic Mechanism Linking Emotion And Memory. *Jpn. J. Pharmacol.* 86, 18 – 22
- Aroniadou-Anderjaska Vassiliki, Fritsch Brita, Qashu Felicia, Braga Maria F.M.** 2008. Pathology And Pathophysiology Of The Amygdala In Epileptogenesis And Epilepsy. *Epilepsy Res.* 78(2-3): 102–116.
- Aronica E., Van Vliet E., Mayboroda O., Troost D., Lopes Da Silva F., Gorter J.** 2000. Upregulation Of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype mGluR3 And mGluR5 In Reactive Astrocytes In A Rat Model Of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *European Journal Of Neuroscience*, Vol. 12
- Bertram E.** 2009. Temporal Lobe Epilepsy: Where Do The Seizures Really Begin? *Epilepsy Behav.* January ; 14(Suppl 1): 32–37.
- Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas Cá, Roncagliolo M, Fuenzalida M.** 2011. Glutamate Released Spontaneously From Astrocytes Sets The Threshold For Synaptic Plasticity. *Eur J Neurosci*, Apr;33(8):1483-92
- Bravo I., Romero F.** 2009. Susceptibilidad Del Mutante Neurologico Taiep A La Generación De Crisis Epilépticas Inducidas Por Kindling Amigdalino. Upla
- Cheung T., Cardinal R.N.** 2005. Hippocampal Lesions Facilitate Instrumental Learning With Delayed Reinforcement But Induce Impulsive Choice In Rats. *Bmc Neuroscience*
- Cooley R.K., Vanderwolf C.H.** 2005. Stereotaxic Surgery In The Rat: A Photographic Series. A. J. Kirby Co.
- Corcoran Me, Kroes Ra, Burgdorf Js, Moskal Jr.** 2011. Regional Changes In Gene Expression After Limbic Kindling. *Cell Mol Neurobiol.* Mar 19. [Epub Ahead Of Print]
- Ding S., Tommaso Fellin T., Zhu Y., Lee S., Auberson Y., Meaney D., Coulter D., Carmignoto G., Haydon P.** 2007. Enhanced Astrocytic Ca²⁺ Signals Contribute To Neuronal Excitotoxicity After Status Epilepticus. *The Journal Of Neuroscience*, October 3, • 27(40):10674 –10684
- Dragunow M, Goddard Gv, Lavery R.** 1985. Is Adenosine An Endogenous Anticonvulsant? *Epilepsia.* Sep-Oct;26(5):480-7.
- Gilbert Me, Cain Dp.** 1981. A Developmental Study Of Kindling In The Rat. *Brain Res.* Oct;254(3):321-8.
- Goddard G. V.** 1967. Development Of Epileptic Seizures Through Brain Stimulation At Low Intensity. *Nature* 214, 1020-1021
- Goddard G. V.** 1983. The Kindling Model Of Epilepsy. *Trends In Neurosciences*, Volume 6, Pages 275-279.
- Goddard G.V., McIntyre D.C., Leech C.K.** 1969. A Permanent Change In Brain Function Resulting From Daily Electrical Stimulation. *Exp Neurol.*25(3), 295-330
- Gomez-Gonzalo M., Losi G., Chiavegato A., Zonta M., Cammarota M., Brondi M., Vetri F., Uva L., Pozzan T., Curtis M., Ratto G., Carmignoto G.** 2010. An Excitatory Loop With Astrocytes Contributes To Drive Neurons To Seizure Threshold. *Plos Biology*, Volume 8 Issue 4 April
- Hamilton N., Attwell D.** 2010. Do Astrocytes Really Exocytose Neurotransmitters? *Nature Neuroscience* Volume 11 April
- Ishikawa A., Nakamura S.** 2006. Ventral Hippocampal Neurons Project Axons Simultaneously To The Medial Prefrontal Cortex And Amygdala In The Rat. *J Neurophysiol* 96: 2134 –2138
- Kam K., Nicoll R.** 2007. Excitatory Synaptic Transmission Persists Independently Of The Glutamate–Glutamine Cycle. *The Journal Of Neuroscience*, August 22, 27(34):9192–9200
- Lothman Ew, Bertram Eh, Bekenstein Jw, Perlin Jb.** 1972. Self-Sustaining Limbic Status Epilepticus Induced By 'continuous' Hippocampal Stimulation: Electrographic And Behavioral Characteristics. *Electroencephalography And Clinical Neurophysiology* Volume 32, Issue 3, March, Pages 295-299
- McIntyre Dc, Poulter Mo, Gilby K.** 2002. Kindling: Some Old And Some New. *Epilepsy Res.* Jun;50(1-2):79-92.
- Mcnamara J.O., Huang Y.Z., Leonard A.S.** 2006. Molecular Signaling Mechanisms Underlying Epileptogenesis. *Sci. Stke*, 10 October 2006, Vol. 2006, Issue 356, P. Re12
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine Rj.** 2004. Kindling And Status Epilepticus Models Of Epilepsy: Rewiring The Brain. *Prog Neurobiol.* May;73(1):1-60.
- Musto Ae, Samii Ms, Hayes Jf.** 2009. Different Phases Of Afterdischarge During Rapid Kindling Procedure In Mice. *Epilepsy Res.* Aug;85(2-3):199-205. Epub 2009 Apr 16.
- Osawa M, Uemura S, Kimura H, Sato M.** 2001. Amygdala Kindling Develops Without Mossy Fiber Sprouting And Hippocampal Neuronal Degeneration In Rats. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2001 Dec;55(6):549-57.
- Panatier A., Vallee J., Haber M., Murai K., Lacaille J., Robitaille R.** 2011. Astrocytes Are Endogenous Regulators Of Basal Transmission At Central

- Paxinos, G., Watson, C.** 2007. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 6 Edition.
- Pekny M., Michael Nilsson M.** 2005. Astrocyte Activation And Reactive Gliosis. *Glia* 50:427–434
- Perea G., Araque A.** 2007. Astrocytes Potentiate Transmitter Release At Single Hippocampal Synapses. *Science* Vol 317 24 August
- Peterson S.L., Albertson T.E.** 1998. *Neuropharmacology Methods In Epilepsy Research*. Crc Press
- Pitkänen A., Savander V., Ledoux J.** 1997. Organization Of Intra-Amygdaloid Circuitries In The Rat: An Emerging Framework For Understanding Functions Of The Amygdala. *Tins* Vol. 20, No. 11
- Pitkänen A., Pikkarainen M., Nurminen N., Ylinen A.** 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review.
- Racine R.** 1972. Modification Of Seizure Activity By Electrical Stimulation: Ii. Motor Seizure. *Electroencephalography And Clinical Neurophysiology* Volume 32, Issue 3, March, Pages 281-294.
- Rempe D. A., Bertram E. H., Williamson J. M., Lothman E. W.** 1997. Interneurons In Area Ca1 Stratum Radiatum And Stratum Oriens Remain Functionally Connected To Excitatory Synaptic Input In Chronically Epileptic Animals. *J. Neurophysiol.* 78: 1504–1515
- Sah P., Faber E. S. L., LOPEZ De Armentia M., Power J.** 2003. The Amygdaloid Complex: Anatomy And Physiology. *Physiol Rev* 83: 803– 834.
- Sato, T., Yamada, N., Morimoto, K., Uemura, S., Kuroda, S.,** 1998. A behavioral and immunohistochemical study on the development of perirhinal cortical kindling: a comparison with other types of limbic kindling. *Brain Res.* 811, 122–132.
- Schubert M., Siegmund H., Pape H., Doris Albrecht D.** 2005. Kindling-Induced Changes In Plasticity Of The Rat Amygdala And Hippocampus. *Learn. Mem.* 12: 520-526
- Tian G. F., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J., Oberheim N., Lou N., Wang X., Zielke R., Kang J., Nedergaard M.** 2005. An Astrocytic Basis Of Epilepsy. *Nature Medicine* Volume 11 Number 9 September
- Truccolo W., Donoghue J., Hochberg L., Eskandar E., Madsen J., Anderson W., Brown E., Halgren E., Cash S.** 2011. Single-Neuron Dynamics In Human Focal Epilepsy. *Nature Neuroscience* Volume 14 Number 5 May
- Tsuchiya K., Kogure S.** 2011. Fast Fourier Transformation Analysis Of Kindling-Induced Afterdischarge In The Rabbit Hippocampus. *Epilepsy Res.*
- Tuunanen J., Pitkänen A.** 2000. Do Seizures Cause Neuronal Damage In Rat Amygdala Kindling? *Epilepsy Research* Volume 39, Issue 2, 3 April , Pages 171-176
- Von Bohlen Oliver, Halbach, Schulze Katrin, Albrecht Doris.** 2004. Amygdala-Kindling Induces Alterations In Neuronal Density And In Density Of Degenerated Fibers. *Hippocampus* 14:311–318
- Wada J.A., Sato M., Corcoran M.E.** 1974. Persistent Seizure Susceptibility And Recurrent Spontaneous Seizures In Kindled Cats. *Epilepsia.* Dec;15(4):465-78.
- Wang C., Kang-Park M., Wilson W., Moore S.** 2002. Properties Of The Pathways From The Lateral Amygdal Nucleus To Basolateral Nucleus And Amygdalostriatal Transition Area. *J Neurophysiol* 87: 2593–2601
- Wierenga C., Wadman W.** 1999. Miniature Inhibitory Postsynaptic Currents In Ca1 Pyramidal Neurons After Kindling Epileptogenesis. *J Neurophysiol* 82:1352-1362