$\left(\right)$ Electric Electric 1208 < · · Catter and and a < < TOUC WE TUN ((3) Ci (C 0 CO.C 1110 all a acc < < < Call A SALAHFORMARION ((((A COLOR ARCHIVO HISTORICO 1 116 - 515 [((" (



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



UNIDAD XOXHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PARTICIPACIÓN DEL NÚCLEO DENTADO Y DEL NÚCLEO INTERPÓSITUS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA KINDLING AMIGDALINO DE LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE DOCTORA EN

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

M. en Pb. María del Carmen Rubio Osornio

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES DE TESIS:

DR. CARLOS PAZ TRES

DRA. MARÍA DEL SOCORRO RETANA MÁRQUEZ

ASESORA

DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

México, D.F.

Mayo, 2011



El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93. El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en Pb. María del Carmen Rubio Osornio

Matricula 207181401

México, D.F. 3 de Mayo del año 2011

Sinodales: Dra. María de Socorro Retana Márquez (Presidenta)

Dra. Marisol López López (Vocal) Maux	ohlophop
Dr. Carlos Paz Tres (Vocal)	al)
Dr. Aurelio Jara Prado (Vocal)	
Dra. Petra Yescas Gómez (Vocal)	- Rufe

Este trabajo fue dirigido por el Dr. Carlos Paz Tres Jefe del Departamento de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS. Y por la Dra. María del Socorro Retana Márquez del Departamento de Biología de la Reproducción del la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y la asesoría de la Dra. Marisol López López del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma metropolitana Unidad Xochimilco. Al posgrado de Ciencias Biológicas y de la Salud por las facilidades otorgadas durante la realización del Doctorado y por la oportunidad de presentar este proyecto.

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES DE TESIS:

Dr. Carlos Paz tres

Investigador en Ciencias médicas "F" Jefe del Departamento de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

Dra. María del Socorro Retana Márquez

Profesor titular "C" del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

ASESOR

Dra. Marisol López López

Profesor titular "C" del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma metropolitana Unidad Xochimilco.

SINODALES

Dr. Aurelio Jara Prado

Investigador en Ciencias médicas "C" Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

Dra. Petra Yescas Gómez

Investigodor en Ciencias médicas "C" Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

AGRADECIMIENTOS

Al programa de posgrado de la Universidad Autónoma Metropolitana y al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, por darme la oportunidad de realizar mis estudios doctorales.

Al Dr. Carlos Paz Tres, Dra. María del Socorro Retana Márquez y a la Dra. Marisol López López, por la dirección de este trabajo.

A los miembros del Jurado:

Dra. Petra Yescas Gómez, al Dr. Aurelio Jara Prado, por sus valiosos comentarios para el enriquecimiento de este trabajo y al Dr. Daniel Mota Rojas de la Comisión.

A la Dra. Reyna Fierro por su gran apoyo.

A Lic. Ernesto Olivares por su asistencia administrativa.

DEDICATORIAS

Ofrezco este trabajo especialmente a ti mi señor Dios.

A ti, mi hija Aranza, por ser el motivo de mi vida.

A mis padres Manuel Rubio Piñeira y Olivia Osornio Basurto. Gracias por todo lo que me dieron y enseñaron.

A mis Hermanos Manuel, Gabriel, Moisés, Miguel, por haber compartido conmigo algún momento de la existencia. Quiero agradecer especialmente a Moisés por estar cerca en la realización de este trabajo.

A ustedes Adoratrices Perpetuas del Santísimo Sacramento, especialmente a Sor Guadalupe por todo su apoyo.

A mis padrinos: Caritina y Francisco, por toadas sus consideraciones.

A todos aquellos amigos que han caminado conmigo algún momento de mi vida.

A todos mis amigos y compañeros del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, especialmente a los del departamento de Neurofisiología, particularmente a la M. en Pb. Verónica Custodio Ramírez por su gran apoyo.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

El secreto de los grandes corazones se encierra en una palabra: Perseverar (Víctor Hugo)

INDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	7
Definición de epilepsia	7
Incidencia de epilepsia	8
Clasificación de epilepsia	8
Las anomalías de EEG y epilepsia	9
Epilepsia experimental	11
Modelos de epilepsia	12
Modelo del kindling	13
Metodología del kindling	16
Ventajas del kindling como modelo de epilepsia	17
Mecanismos del Kindling	18
Cambios estructurales con el kindling	19
Sistemas de neurotrasmisión y kindling	20
Cerebelo	22

Localización del cerebelo	23
División del cerebelo	23
Morfología del cerebelo	
Núcleos del cerebelo	29
Función cerebelosa	
Cerebelo y Epilepsia	34
Acido kaínico	35
JUSTIFICACIÓN	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
MÉTODOS.	40
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIÓNES	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
LISTA DE ABREVIATURAS	

.

.

ARTÍCULO DE TESIS

EFFECTS OF KAINIC ACID LESION OF THE CEREBELLAR
DENTATE AND INTERPÓSITUS NUCLEI ON AMYGDALOID
KINDLING IN RATS. Brain Res. Bull. (2011): 85: 64–67

ARTÍCULO DE REVISIÓN

• IN VIVO EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistr. (2010): 10: 298-309

RESUMEN.

Estudios clínicos y experimentales sugieren que el cerebelo participa en la actividad epiléptica, sin embargo, estudios que utilizaron lesión o estimulación cerebelosa han mostrado resultados contradictorios. Tal controversia se puede explicar por los diferentes modelos experimentales de epilepsia utilizados y las inconsistencias en la lesión y/o en los parámetros de estimulación. En el presente trabajo se utilizó el modelo de epilepsia kindling de la rata, lesionamos mediante ácido kaínico el núcleo dentado y el núcleo interpósitus del cerebelo, teniendo en cuenta su capacidad para lesionar cuerpos neuronales sin lesionar las fibras de entrada, de salida o de paso. Se realizaron análisis histológicos a fin de establecer el tamaño de las lesiones y las condiciones de las células después de la lesión. Los resultados muestran que la lesión en ambos núcleos dentado e interpósitus facilita la latencia a presentar cada estado conductual de acuerdo con la escala de Racine (1972). No encontramos cambios significativos en la duración de la actividad epiléptica durante la fase inicial del kindling. Sin embargo, una vez que las ratas con lesión en el núcleo dentado y núcleo interpósitus llegaron a la fase-5 de la escala de Racine (1972), se observó una reducción significativa en la duración de la actividad epiléptica. Las lesiones específicas del núcleo dentado y del núcleo interpósitus fueron confirmadas por métodos histológicos

convencionales. Además, con la lesión de ácido kaínico se eliminó la posibilidad de lesionar fibras eferentes o aferentes del núcleo dentado y del núcleo interpósitus de ratas; lo cual, se determinó comparando el número de células intactas que permanecen en la corteza cerebelosa, específicamente en la monocapa de células de Purkinje, núcleos pontinos y oliva inferior. Además, se descartó la posibilidad de propagación del ácido kaínico hacia las células de la capa CA3 del hipocampo. Estos hallazgos permiten concluir que las lesiones circunscritas en los núcleos dentado e interpósitus del cerebelo ejercen efectos inhibitorios en las crisis generalizadas del modelo kindling amigdalino de la rata.

INTRODUCCIÓN.

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes después de la demencia de Alzheimer. En general se estima que la prevalencía de este desorden afecta a más del 1% al 1.5% de la población a nivel mundial (Kwan et al., 2006). Aproximadamente el 30% de los pacientes no responden a trotamientos farmacológicos (So y Perry., 1981). La fisiopatología de la epilepsia aun no es clara, las investigaciónes en modelos experimentales de epilepsia permiten inferir acerca de los procesos fisiopatológicos más comunes. En la epilepsia como en la epileptogénesis, los mecanismos no han sido comprendidos en su totalidad. Sin embargo, gracias a los modelos de epilepsia se sabe que la activación de neuronas cerebrales puede ser resultado de un aumento de la neurotrasmisión excitadora o fallas en las funciones inhibitorias, (Leach, et al., 1985; Brailowsky, et al., 1989). También se ha propuesto que con las crisis epilépticas otros sistemas de neurotrasmisión se encuentran alterados como el de la acetilcolina, serotonina y dopamina entre otras (McNamara et al., 1980). Asimismo, también esta reportado que existen alteraciones en los canales iónicos como: los de Na⁺, K⁺ y Ca⁺⁺. (Mrimoto et al., 2004). Clínicamente se sabe que las causas de este desequilibrio en los sistemas de neurotrasmisión es de origen multifactorial (Engel et al., 2001). El modelo de epilepsia por kindling es uno de los más estudiados. Da lugar a cambios

electrográficos, conductuales y de neurotrasmisión similares a los que se producen en la epilepsia del humano (McNamaro, 1994).

La estrategia terapéutica más utilizada paro el tratamiento de esta enfermedod es farmacológica (Porter et al., 1984), aunque tombién se han planteado diferentes alternativas quirúrgicas (Engel et al., 1986), entre las que se encuentra la estimuloción (Sramka y Chkhenkeli, 1990), o lesión del cerebelo (Poz et al., 1985; Rubio et al., 2004). En muchos casos se ha podido contrarrestar las crisis epilépticos (Sramka y Chkhenkeli, 1990). Sin embargo, en muchos casos sigue siendo imposible detener la presentoción de esta alteración (Cooper et al., 1976; Davis et al., 1992). Par lo que el objetivo del presente trabajo es determinar la participación del núcleo dentado (ND) y del núcleo interpósitus (NI) en el desorrollo del modelo kindling amigdalino de la rata.

ANTECEDENTES.

Definición de epilepsia.

No existe una enfermedad específica que se llame epilepsia sino más bien es un grupo de trastornos que comparten mecanismos fisiopatológicos semejantes, que son generados en diferentes regiones del encéfalo, con distintas manifestaciones electroencefalográficas y conductuales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la epilepsia como una afección neurológica crónica, recurrente y repetitiva, de fenómenos

paroxísticos ocasionados por descargas de neuronas cerebrales. Quien desarrolla crisis epilépticas, tiene cambios paroxísticos electroencefalográficos y conductuales ocasionados por la activación desordenada de un grupo de neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC).

Incidencia de epilepsia.

La incidencia a nivel mundial de la epilepsia es del 1 al 1.5% de la población y en países como México se estima que en promedio de 10.8 a 20 por cada 1,000 personas padecen algún tipo de crisis epiléptica (García., 2002).

Clasificación de epilepsia.

Clínicamente, la epilepsia, se considera un síndrome que puede presentarse en un importante número de padecimientos del SNC. Jackson (1952) fue uno de los primeros en dar una base científica de la clasificación de la epilepsia. Gastault (1970), fue un pionero en la clasificación de las epilepsias en una forma estructurada. En 1980 se propuso la nomenclatura de Santa Mónica, incluyendo el status epilépticus de tipo convulsivo y no convulsivo igualmente en parcial y generalizado. Posteriormente, se propuso la Clasificación Internacional de las Crisis Epilépticas y Síndromes Epilépticos (LICE., 1981), que sólo hacía referencia al tipo de crisis; después, se hizo la clasificación de síndromes epilépticos presentado en Hamburgo por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (LICE., 1989) separando la clasificación en epilepsia sintomática e idiopática y síndromes especiales.

La clasificación de la LICE en 1996, es la misma clasificación de crisis focales, generalizadas y de carácter indeterminado, crisis sintomáticas criptogénicas e idiopáticas, las cuales estrictamente deben tener un componente genética (Jahnson y Sander., 2001). La más reciente revisión de la LICE (2005-2009) se ha simplificado en crisis generalizadas para las convulsiones que tienen participación bilateral de los hemisferios y crisis focales que se limitan a uno de los hemisferios. El concepto de epilepsia genética, se aplicará para daños estructurales-metabólicos, y crisis desconocidas, reemplaza a los términos de idiopática, sintomática, y criptogénico, así como algunas crisis que se consideraban síndromes (Berg *et al.*, 2010).

Anomalías de EEG en la epilepsia.

El electroencefalograma (EEG) es la herramienta más usada para el diagnóstico de las epilepsias (Nidermeyer et al., 1987). En las descargas epilépticas la actividad EEG se sincroniza y estos patrones son reconocidos como actividad epiléptica (Driver y McGillervray., 1982). En las crisis epilépticas se ha reconocido el estado ictal que determina lo sucedido dentro de la crisis, el estado interictal es entre crisis y crisis y el estado postictal es después de la crisis. En el estado interictal las anomalías más típicas en el EEG son espigas aisladas o agrupadas en poliespigas (Lieb et al., 1981; Klass y Westmoreland., 1985). Algunas veces las anomalías no son

específicas de actividad lenta theta o delta, difusa o localizada, sino también en algunos momentos de la crisis hay enlentecimiento del ritmo alfa (Engel., 1986). La estimulación luminosa intermitente puede provocar la aparición de puntas ondas típicas de las crisis epilépticas (Naquet y Meldrum 1972).

Las crisis generalizadas empiezan con una actividad muy rápida y de bajo voltaje, difícil de discernir, puede dar la sensación de un aplanamiento del trazo electrográfico (Fisher., 1992). Progresivamente, estas ondas disminuyen de frecuencia y aumentan en amplitud; entre 10 a 15 ciclos por segundo (c/s), generalmente se producen durante la fase tónica. Luego esta actividad rápida se imbriça con ondas lentas, cada vez más lentas y numerosas. En la fase clónica es sincronía habitualmente con una descarga de puntas. Al acabar la crisis el trazado queda con bajo voltaje durante unos segundos, mostrando solo ondas muy lentas a menos de 0,5 c/s, progresivamente, la frecuencia aumenta y el trazado adquiere un aspecto normal o basal (Dichter., 1989).

La mayoría de las anormalidades en el EEG y la conducta de los pacientes con crisis epilépticas pueden ser reproducibles gracias a los modelos animales. En la figura 1 se muestran los diferentes componentes de la actividad epiléptica.



Figura 1. Trazos electrográficos que caracterizan cada uno de los componentes del EEG durante la actividad epiléplica.

Epilepsia experimental.

Por la alta incidencia de la epilepsia en la población y para entender los mecanismos de generación y modulación que subyacen a esta patología y ante la limitación natural que existe al intentar estudiar la epilepsia en humanos, ha sido necesario el desarrollo de diferentes modelos de epilepsia. En general, los modelos experimentales de epilepsia se dividen en crónicos y agudos, los agudos se inducen por la aplicación de drogas convulsivantes o por estimulación eléctrica, y los crónicos como el modelo del kindling que reproduce de mejor forma la fisiopatología de la epilepsia de los humanos.

Existen diferentes modelos de epilepsia, los modelos de crisis parciales, modelos de crisis generalizadas, modelos genéticos y modelos de estatus epilepticus de acuerdo con la Clasificación propuesta por Fisher (1989),

Presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Diferentes modelos de epilepsia propuestos por Fisher (1989)

MODELOS DE CRISIS PARCIALES
Neocorticales:
Estimulación eléctrica aguda
Administración de metales
Kindling neocortical
Límbicas:
Estimulación eléctrica aguda
Aplicación de metales
Administración local o sistémica de ácido kaínico
Kindling
MODELOS DE FENÓMENO EPILÉPTICO GENERALIZADO DE TIPO
CONVULSIVO
Electroshock máximo
Pentilentetrazol
Flurotil
Estimulación audiogénica
Modelos de fenómeno epiléptico generalizado de tipo parcial
Pentilentetrazol bajas dosis
Penicilina
Aplicación de bicuculina
Gama-hidroxibutirato
Estimulación subcortical
MODELO GENÉTICOS
Genética: fotosensible Papio papio
Convulsiones audiogénicas en los ratones.
Rata con epilepsia genética
Ratones transgénicos
MODELOS ANIMALES DE ESTATUS EPILÉPTICO (SE)
Pilocarpina
Acido Kaínico

Cabe resaltar que únicamente se hará una descripción amplia del modelo del kindling que fue el modelo utilizado en la elaboración de este trabajo.

Modelo del Kindling.

El kindling provoca la aparición de crisis secundariamente generalizadas del tipo clónico y tónico-clónico, y probablemente también crisis clónicas primariamente generalizadas (Schmutz., 1987). La importancia principal del modelo kindling, se demuestra en la similitud que tiene en compartir mecanismos que subyacen a la epilepsia humana (Schmutz., 1987; Adamec et al., 1990). Otra importancia del kindling como modelo de epilepsia, es que muchos de los fármacos anticonvulsivos utilizados en el tratamiento de la epilepsia son también capaces de retardar el proceso del kindling y reducir la severidad de las convulsiones (Suyaga et al., 2010; Fugiwara et al., 2010). El kindling ha servido para estudiar los mecanismos que inducen el fenómeno ictal, interictal y postictal, especialmente el proceso que provoca la descarga de neuronas en forma sincronizada (Sutula et al., 1988).

En 1961, Delgado y Sevillano observaron que la estimulación eléctrica repetida en el hipocampo del gato producía crisis convulsivas. Los estudios realizados por Goddard (1969) pusieron en manifiesto que la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad, aplicada en varias áreas

subcorticales del cerebro de la rata podía inducir crisis epilépticas. Los cambios progresivos que derivaron de la estimulación se definen como el efecto kindling (Goddard et al., 1969). La técnica kindling puede ser empleada en una gran variedad de especies, como en el perro [Wauquier et al., 1976), el conejo (Tanaka ., 1972), el gato (Wada et al., 1974), y el mono (Baba et al., 1987), entre otros. En ratas, las áreas más susceptibles para inducir kindling son: el neocórteza anterior, el bulbo olfatorio, el área preóptica, la corteza piriforme, la corteza entorrinal, el hipocampo, el área septal la amígdala, y algunas zonas del tálamo (Goddard et al., 1969). Dentro del sistema límbico, el área más susceptible a desencadenar crisis epilépticas fue la amígdala (Am), ya que el número de estímulos necesarios para inducir una convulsión generalizada fue significativamente menor que las otras estructuras del sistema límbica. La Am se divide en diferentes núcleos, el núcleo basolateral amigdalino que es en el que se reproducen las crisis tipo kindling, tiene una amplia gama de conexiones recíprocas con la corteza, así como la amplia distribución de eferentes hacia el estriado, lo que parecen distinguir el complejo amigdalino basolateral del resto de la Am. Todos los núcleos del complejo basolateral reciben aferencia de la corteza piriforme, corteza insular agranular, y la corteza pre-limbica. Todos los núcleos de la Am basolateral proyecta a la corteza insular y la corteza agranular pre-limbica y a la corteza entorrinal (Price et al., 1981; Carlsen et al., 1985; Groenewegen., 1984).

Los estudios en animales han sugerido que la Am es aún más susceptible a generar actividad convulsiva que el hipocampo (Goddard et al., 1969). Algunos trabajos han mostrado que después de la estimulación de la Am se muestra más rápido aumento de glutamato extracelular, lo que sugiere que existe una participación temprana de la Am en el desarrollo de de las crisis convulsivas (Lallement et al., 1991). El núcleo basolateral de la Am juega el papel más importante en la iniciación y propagación de las convulsiones. La activación de las neuronas del núcleo basolateral es principalmente responsable de la generación de las crisis convulsivas generalizadas (Fitz y McNamara., 1979), incluso en modelos animales en donde las convulsiones son evocadas en regiones extra-amígdalares (White y Price, 1993a, 1993b,). Por otra parte, la estimulación eléctrica prolongada en el núcleo basolateral amigdalino también provoca estatus epileptucus (Mohapel et al., 1996). Así, los hallazgos clínicos con estudios en animales indican que la Am juega un papel prominente en la patogenia y la sintomatología de la epilepsia. Además de que varios estudios han confirmado que las crisis pueden ser inducidas por medio de la inyección repetida de glutamato y aspartato en la Am (Mori y Wada., 1987).

Metodología del kindling.

Las crisis parciales y generalizadas se pueden estudiar con la aplicación dioria de estímulo eléctrico, con una intensidad que va desde 200 hasta 500 µA en las estructuras límbicas, se provoca una actividad electroencefalográficas y conductual cada vez más complejas. Después de 15 a 25 estímulos, la duración de la actividod epiléptica (EEG), llamada Posdescarga (PD) se registra en todo el cerebro, y un comportamiento generalizado de tipo tónico-ctónico (Goddard et al., 1969). En la figura 2 se muestra el registro de EEG del desarrollo normal del modelo kindling.



Figura 2. Registro de EEG del desarrollo normal del modelo kindling, el numero de K representa el número de estímulo. En el primer canal se observa el registro corticográfico, en el segundo canal el registro del núcleo basolateral amigdalino, la flecha indica el artefacto del estímulo. Se observa un desarrollo progresivo del modelo hasta obtener crisis generalizadas a todo el encélalo como es el ejempio de la k18.

Racine et al., (1972) caracterizaron que la respuesta del comportamiento en el modelo kindling en cinco estados de comportamiento que es progresivos y acumulativos: El primero de los estados conductuales, se refiere a los movimientos faciales tales como el parpadeo o movimientos masticatorios; el segundo estado conductual, se caracteriza por los movimientos oscilatorios de la cabeza; el tercer estado, se define por los movimientos de tipo mioclónico de las extremidades anteriores; el cuarto estado de conducta, se caracteriza por la erección corporal, el animal se para sobre sus miembros posteriores; el quinto estado conductual, es una crisis generalizada tónico-clónicas en donde existe pérdida de la postura.

Ventajas del kindling como modelo de epilepsia.

Los cambios descritos en el SNC son los cambios a largo plazo y pueden ser permanentes (Racine et al., 1972). Dentro de las ventajas que ofrece este modelo es que las crisis parciales se pueden estudiar en los primeros estadios y posteriormente las crisis generalizadas (Kalichman 1982). Los animales de experimentación muestran una evolución y un cambio generalizado con características morfológicas similares a las presentadas por los pacientes humanos con crisis parciales secundarias generalizadas (LICE., 1989). Otra ventaja importante de este modelo es que, debido a que utiliza estimulación eléctrica, los posibles efectos colaterales de los modelos químicos pueden ser controlados.

Mecanismos del Kindling.

Los mecanismos básicos que median la excitabilidad neural se asocia a un desequilibrio de los eventos químicos o eléctricos que abren canales de Na⁺⁺ que permiten el influjo de iones al interior de las neuronas, produciendo una despolarización que al llegar a un umbral determinado genera un potencial de acción constituido por una fase de despolarización. Posteriormente, el potencial de acción se vuelve al potencial de reposo estableciendo una carga de reposo de la membrana. Durante la despolarización y la repolarización hay una corriente lenta de iones de K⁺. En la fase de repolarización el potencial puede exceder el valor de reposo en dirección negativa (hiperpolarización) se presenta una excitación del grupo neuronal, que finalmente se traduce en una crisis epiléptica (Engel., 1989), Figura 3.



Figura 3. El potencial de acción se vuelve ol potencial de reposo estableciendo una carga de reposo de la membrana. Durante lo despolorización y la repolorización hoy una corriente lenta de iones de K⁺. En esta fase de repolorización el potencial puede exceder el valor de reposo en dirección negativa, produciéndose uno descarga neuronol.

Cambios estructurales con el kindling.

Inicialmente se propuso que el kindling se producía como consecuencia de daño tisular o cambios morfológicos que acontecían durante la estimulación eléctrica; sin embargo, durante un tiempo hubo reportes que indicaban todo lo contrario, ya que el análisis del área cercana a la colocación de los electrodos, (utilizando la técnica de Nissl) no se encontraron diferencias entre los animales estimulados y los que no recibieron estimulación (Racine et al., 1975). Usando la técnica de Golgi no hallaron cambios en la morfología de las células piramidales del hipocampo. El tejido adyacente al electrodo, el tamaño, la ramificación dendrítica, así como el número y el tamaño de las espinas dendríticas tampoco mostraron alteraciones. Por otro lado, Goddar y Douglas (1975) examinaron el área cercana al electrodo localizado en la Am y no hallaron efectos de degeneración del tejido, este estudio fue más fino, puesto que se utilizó la microscopía electrónica. La estimulación cortical a ratas y mediante estudios de microscopia electrónica no halló daños en las regiones sinápticas de los sitios estimulados (Racine y Zaide 1978). Estos datos eliminaban la posibilidad de que el kindling se presentará como una consecuencia de daño tisular en el sitio de estimulación o en áreas cercanas. Sin embargo, no se descartaba la hipótesis de cambios morfológicos más sutiles o cambios a nivel plástico como el crecimiento axonal. La variedad de técnicas histológicas han aportado evidencias en

este sentido, después de estimular ciertas zonas del cerebro, se presentan cambios a nivel plástico. Se tienen evidencias de que en las fibras musgosas del giro dentado presenta brote axónico o sprouting, así como la reorganización de conexiones sinápticas, después de estimulaciones eléctricas para la inducción del modelo del kindling, así como en otros modelos experimentales de epilepsia (Represa *et al.*, 1989; Cavazos *et al.*, 1991), este sprouting también se presenta en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Houser *et al.*, 1990). Además de estos mecanismos plásticos observados, hay otro tipo de alteraciones celulares y moleculares inducidas en el giro dentado durante el desarrollo del kindling que incluyen entre otras, cambios en la forma de las espinas dendríticas de las células granulares del hipocampo (Geinisman *et al.*, 1991), alteraciones en las corrientes de Ca²⁺, así como en la composición iónica del medio extracelular (Mody *et al.*, 1990).

Sistemas de neurotrasmisión y kindling.

En términos generales, se ha propuesto que la estimulación en el sistema límbico produce elevación de la liberación de glutamato y GABA desde las terminales presinápticas en la hendidura sináptica. El glutamato estimula los receptores postsinápticos AMPA, esta despolarización es reducida inmediatamente por la inhibición recurrente del receptor GABA_A (Joy et al., 1984). La activación de los receptores AMPA y en particular los

receptores NMDA desencadena cascadas intracelulares que llevan a cambios funcionales y reorganización eventual sináptica del glutamato (McNamara et al., 1987; Croucher et al., 1990). En el desarrollo del kindling, la inhibición mediada por GABA se hace más frecuente en varias estructuras cerebrales, incluyendo el sistema límbico en la región del hipocampo en la capa CA1 y Am (Morimoto et al., 1993; Morimoto et al., 2004).

La participación de Acetilcolina (Ach) en el proceso del kindling se basa en el hecho que se puede producir crisis epilépticas por la administración de agonista colinérgicos, como el carbacol. Al parecer se desarrolla una hipersensibilidad neuronal a la Ach desde las primeras estimulaciones eléctricas del kindling (McNamara *et al.*, 1980; Ferencz *et al.*, 1997). Con la aplicación iontoforetica de Ach, se observa minutos después la aparición de la actividad epiléptica y guarda una estrecha relación con la duración de ésta; es decir, a mayor duración de la posdescarga, mayor es la respuesta de la célula a la Ach. (Lupica y Berman 1988).

Se han realizado diversos estudios para dilucidar la participación de la dopamina (DA) en la crisis epilépticas, se sabe que destruyendo los grupos neuronales dopaminérgicas con 6-hidroxidopamina se desarrolla el modelo del kindling más rápido. (Corcoran y Mason en 1980). También está reportado de que existe un incremento significativo en la densidad de los receptores D1 y D2 para DA en el núcleo acumbens ipsilateral, al estimular

eléctricamente la capa CA1 del hipocampo (Csernansky et al., 1988). Estudios in vitro, reportan que la administración de DA en neuronas de la capa CA1 del hipocampo de cobayos producía hiperpolarización, sugiriendo que la DA parecía ejercer control en la disminución de las descargas epilépticas (Suppes et al. 1985).

La serotonina (5-HT) también ha sido estudiada en las crisis producidas por el modelo del kindling (Siegel y Murphy., 1979), se sabe que la disminución de la acción de la 5-HT facilita el proceso de kindling en el foco epiléptico, aumentando la gravedad de las crisis e intensificando la predisposición a las mismas (Jobe *et al.*, 1999). En estructuras como el hipotálamo y la Am que contiene gran cantidad de receptores a 5-HT también existe un decremento de 5-HT en ratas con crisis inducidas por kindling amigdalino (Munkenbeck y Schwark 1982).

Cerebelo.

Localización.

El cerebelo es la estructura encefálica que se origina de los engrosamientos ectodérmicos del metencéfalo. El nombre de cerebelo proviene del latín que quiere decir "cerebro pequeño", se trata de una masa nerviosa voluminosa, que en la rata tiene un peso aproximado de 300 mg, se encuentra ubicado en la parte posterior del cuarto ventrículo, posterior e inferior a la base del cráneo (Ghez y Fahn., 1985). Se localiza por

debajo de la parte posterior del cerebro (Voogd., 1967). Tiene una forma ovoide, ligeramente aplanado (Jansen y Bodard., 1954).

División del cerebelo.

El cerebelo está dividido en su porción medial por el vermis cerebelosos y dos laterales denominados hemisferios cerebelosos, que están cubiertos por una fina capa de sustancia gris, plegada en numerosas circunvoluciones. (Voogd., 1998). La corteza cerebelosa está compuesta por un gran número de láminas o folias, que en la rata son 20 (Braitenberg y Atwood, 1958), orientadas de manera transversal. Cinco profundos surcos dividen al cerebelo en lóbulos y lobulillos (Larsell., 1937; Larsell 1952) Figura

4.



Figura 4. Esquema del cerebelo de la rata en donde^vse muestra su división, en su porción medial el vermis y dos laterales denominados hemisferios cerebelosos. La corteza cerebelosa esta compuesta por un gran número de láminas o folias. Desde el punto de vista filogenético, el cerebelo puede dividirse en tres porciones: arqueocerebelo, paleocerebelo y neocerebelo (Herrick., 1924). Esta división es de gran interés porque cada una de las porciones posee cierta identidad funcional y clínica.

El arquicerebelo es la porción filogenéticamente más antigua y se corresponde con el lóbulo floculonodular, surge durante el desarrollo filogenético al mismo tiempo que el aparato vestibular del oído interno. La mayoría de aferencias que recibe provienen de los núcleos vestibulares y se corresponde en gran medida con el vestíbulocerebelo. Es capaz de modular la actividad de los tractos que descienden desde los núcleos vestibulares a la médula espinal y de las motoneuronas a que inervan los músculos extrínsecos del globo ocular. Gracias a ello el vestibulocerebelo se encarga de controlar y regular el equilibrio corporal y los movimientos oculares (Ghez y Fahn., 1985).

El paleocerebelo es más reciente que el arqueocerebelo y está integrado por la pirámide, la úvula, el lobulillo central con las alas, el culmen y el lobulillo cuadrangular. La mayoría de las aferencias que recibe provienen de la médula espinal y tiene cierta correspondencia con el espinocerebelo, que controla las porciones dístales de las extremidades superiores e inferiores, especialmente las manos, los pies y los dedos (Ghez y Fahn., 1985).

El neocerebelo es la parte más reciente evolucionada y está formado por la totalidad del lóbulo posterior a excepción de la pirámide y la úvula. La mayoría de las aferencias que recibe provienen de la corteza cerebral a través de los núcleos del puente. Lleva a cabo las funciones cognitivas (percepción visuoespacial, procesamiento lingüístico y modulación de las emociones), la planificación general de actividades motoras secuenciada

y el aprendizaje motor (Ghez y Fahn., 1985; Kingsley., 2000; Timmann., 2007) Figura 5.



Figura 5. Esquema del cerebelo en donde se muestra la división filogenético, se pueden observarse las tres porciones: arquicerebelo, paleocerebelo y neocerebelo.

Morfología del cerebelo.

La corteza cerebelosa es una estructura uniforme en todas sus partes y se extiende a través de la línea media. La corteza está compuesta por tres capas bien definidas que contienen cinco diferentes tipos de neuronas, partiendo de la superficie: la capa molecular, la monocapa de las células de Purkinje, y la capa granulosa (Ramón y Cajal., 1911). La capa molecular cuenta con dos tipos diferentes de neuronas, arborizaciones dendríticas de células de las capas más profundas y numerosos axones delgados que corren paralelos al eje longitudinal de las láminas. En la capa molecular se hallan las células en cesta y las células estrelladas (Fox et al., 1967; Larsell, 1967). Las dendritas de estas células se limitan a la capa molecular, lo mismo que los axones de las células estrelladas. Las prolongaciones de ambas células se orientan en un plano sagital (transversal con respecto al eje longitudinal de las folias). Los axones de las células estrelladas establecen cantactos sinápticos con las células de Purkinje. Las células en cesta localizadas en las partes profundas de esta capa, en proximidad a los cuerpos de las células de Purkinje, dan origen a dendritas que hacienden en la capa molecular y emiten axones amielínicos que forman arborizaciones terminales en torno del soma de muchas células de Purkinje visto desde un plano sagital, una sola célula en cesta puede establecer relaciones sinápticas con diez células de Purkinje (Jeager et al., 1988). La capa molecular contiene dendritas de las células de Purkinje y de Galgi

tipo 2 y los axones transversalmente orientados de las células granulosas, provenientes de las fibras paralelas (Palay y Chan-Palay., 1974).

La monocapa de las células de Purkinje consta de numerosas células grandes (50 µm) de disposición uniforme a lo largo de la superficie de la capa granulosa.(Raman et al., 2001). Cada célula da origen a un complicado árbol dendrítico que se abre como un abanico aplanado, orientado en ángulo recto con respecto al eje longitudinal de las láminas.. Los axones de las células de Purkinje son mielínicos, pasan a través de la capa granulosa y sustancia gris, y establecen contactos sinápticos con los núcleos cerebelosos profundos (Raman et al., 2000). Las colaterales de las células de Purkinje establecen contactos sinápticos con células de Golgi tipo 2 en la capa granulosa (Brainsterberg et al., 1958). Los estudios histoquímicos indican que la mayor parte de las células de Purkinje contiene ácido gama-aminobutirico (GABA) (Llinas., 2004), que actúa como el principal neurotransmisor.

La capa granulosa consta de núcleos cromáticos densamente agrupados, que en los preparados teñidos con la técnica de Nissel se asemejan a linfocitos. Estas células tienen de 5 a 8 µm de diámetro, y presentan gránulos de cromatina reunidos en proximidad a la membrana nuclear. Los núcleos de las células granulosas parecen desnudos debido a la delgadez del citoplasma circundante y a la ausencia de los gránulos de Nissel discretos. Las células granulosas son glutamatérgicas. Cada una de las
células de granulosas da origen a cuatro o cinco dendritas cortas dentro de los glomérulos. Los axones de las células granulosas son fibras amielínicas que ascienden en forma vertical en la capa molecular y se bifurcan en ramas que corren de manera paralela al eje longitudinal de la lámina. Estas fibras paratelas se hallan en toda la capa molecular, donde se orientan en forma perpendicular a las expansiones dendríticas sagitales en forme de abanico de las células de Purkinje. Los axones de las células granulosas establecen contactos sinápticos con las prolongaciones espinosas de las células de Purkinje. Las células de Golgi tipo 2 se encuentran sobre todas las partes superiores de la capa granulosa, poseen núcleos vesiculares, cuerpos definidos son GABAérgicas. Las dendritas de estas células se extienden a lo largo de toda la corteza cerebelosa y sus arborizaciones no se limitan a un solo plano. En la capa molecular, las fibras paralelas establecen contactos con las dendritas de las células de Golgi, en tanto que las arborizaciones axónicas son densas dentro de la capa granular por debajo del cuerpo celular. Los axones de estas células terminan dentro de los glomérulos cerebelosos Figura 6.



Figura 6. Organización celular de la corteza cerebelosa. Obsérvese fibras eferentes desde las diferentes zonas cerebrales.

Núcleos del cerebelo.

Localizados profundamente en la masa cerebelosa en la rata hay tres núcleos: dentado, interpósitus y fastigial. La morfología de los núcleos del cerebelo varia en diferentes especies (Herrick., 1924), en roedores el núcleo interpósitus se ha dividido en dos partes en anterior y posterior (McCrea et al., 1978) el núcleo lateral o núcleo dentado se divide también en dos partes ventrocaudal y rostral (Voogd., 1967). Estos núcleos a través de las fibras musgosas reciben axones de diferentes estructuras. De la corteza cerebelosa específicamente la inhibición de las células de Purkinje (Ito., 1984; Raman et al., 2001), y de diferentes estructuras cerebrales, como el núcleo vestibular (Voogd., 1967), locus coeruleus (Snaider et al., 1975), núcleos pontinos (Angaut et al., 1985), tallo cerebral (Brodal et al., 1972) y núcleo reticular (Kitai et al., 1976), oliva inferior (De Zeeuw et al., 1989). Es claro que todas las señales que entran y salen del cerebro pasan por los núcleos cerebelosos (Raman et al., 2000). Estos núcleos contienen principalmente dos tipos de neuronas (Czubayko et al., 2001): glutamatérgicas y aspartatérgicas (Monaghan et al., 1986).

El núcleo del fastigial es una masa gruesa con forma de cometa, ubicada casi en la línea media, justo por encima del techo del IV ventrículo del cual está separado por una delgada capa de sustancia blanca, fue caracterizado por Goodman et al., (1963).

El ND o núcleo lateral es el de mayor tamaño y la población de células varía dependiendo de la especie, tiene forma de bolsa con pliegues abierta hacia delante y hacia la línea media. La abertura se denomina hilio del ND y por él salen la mayor parte de las fibras que forman el pedúnculo cerebeloso superior Figura 6A.

Las fibras de salida del cerebelo que comprenden el ND y el NI cruzan a nivel del tubérculo cuadrigémino inferior, dejan colaterales en el núcleo de

Darkschewjsch (Angut., 1970) ascienden para cruzar al núcleo rojo contralateral (Toyama et al., 1967), las fibras proyectan hacia los núcleos talámicos ventral posterior y ventral lateral (Yoshida et al 1967; Shinoda et al 1985), para finalmente proyectar a la corteza motora primaria; los impulsos de la corteza motora son trasmitidos a niveles espinales por el haz corticoespinal (Shinoda et al., 1982).

Una vía que se origina en las estructuras de la línea media del cerebelo (vermis) y pasa después a través de los núcleos del techo hacia las regiones bulbares y pontinas del tallo encefálico. Este circuito funciona en íntima relación con el aparato del equilibrio y la postura cuerpo.

Una vía que se origina en las áreas intermedias a cada lado del cerebelo, entre el vermis y los hemisferios cerebelosos, pasa después a través del núcleo interpósitus hasta el núcleo ventrolateral del tálamo y de ahí a la corteza motora, a varias estructuras de la línea media del tálamo y de ahí a los ganglios básales y al núcleo rojo, formación reticular y núcleo de Darkewich. Este circuito funciona para coordinar las actividades entre las dos primera vías cerebelosas de salida, para ayudar a coordinar las interrelaciones entre el control postural subconsciente del cuerpo y el control consciente voluntario de la corteza motora Figura 7B.



Figura 7. A) Esquema de corte sagital en donde se muestra la localización de los núcleos dentodo e interpósitus del cerebelo, B) Esquema de las vías de las fibras de los núcleos cerebelosos en color rosa se representan los oxones del núcleo dentado y en azul los oxones de la s células del núcleo interpósitus.

Función cerebelosa.

El cerebelo no inicia el movimiento, sino que contribuye a la coordinación, la precisión y la sincronización exacta, recibe información de los sistemas sensoriales y de otras partes del cerebro y la médula espinal, e integra estos insumos a la actividad de motricidad fina sintonía (Fine 2002). La regulación del tona muscular y el mantenimiento del equilibrio, las señales generadas por casi todos los tipos de receptores se proyectan al cerebelo. Los sistemas eferentes del cerebelo provienen en gran parte, aunque no de forma exclusiva de los núcleos cerebelosos y ejercen sus principales influencias sobre núcleos del tronco del encéfalo en múltiples niveles. El cerebelo está unido al bulbo, a la protuberancia y al mecencéfalo, por tres pares de pedúnculos cerebelosos Figura 8.



Figura 8. El cerebelo esta unido al bulbo, a la protuberoncia y al mecencéfalo, por tres pares de pedúnculos cerebelosos superior, medio e inferior.

El cerebelo actúa en el control motor sólo en relación con las actividades motoras que se inician en alguna otra parte del sistema nervioso. Pueden originarse en la médula espinal, la formación reticular, los ganglios basales o en áreas motoras de la corteza cerebral. El cerebelo es especialmente importante para controlar las contracciones de los músculos agonistas y antagonistas durante los cambios rápidos de posición del cuerpo dictados por los aparatos vestibulares. Al parecer, ésta es una de las principales

Cerebelo y epilepsia.

Se ha propuesto que el cerebelo participa en la actividad epiléptica (Cooper et al., 1976, Davis et al., 1992., Sramka y Chkhenkeli., 1990). Existen evidencias clínicas y experimentales que apoyan la participación del cerebelo en el fenómeno epiléptico. Sin embargo, hasta el momento no se conocen los mecanismos por los cuales el cerebelo participa en la epilepsia. Se ha reportado que la cerebelectomia total aumenta la duración de la actividad epiléptica llamada posdescarga (PD) provocada por el modelo de epilepsia kindling (Paz et al., 1985). Contradictoriamente también está reportado que la cerebelectomía no tiene influencia sobre el kindling provocado por el modelo de pentilentetrazol (Raines y Anderson., 1976). Las ratas que sufren lesiones electrolíticas en el ND requieren menor cantidad de estímulo para alcanzar la etapa 3 y 5 de la escala propuesta por Racine (Min et al., 1998). Las lesiones del ND en el desarrollo del modelo kindling y cuando se usa un modelo de epilepsia focal inducido por penicilina también facilitan la actividad epiléptica (Tsuru et al., 1992). La estimulación del ND puede interrumpir la descarga epiléptica (Sramka y Chkhenkeli, 1990; Hutton et al., 1972), también facilita las convulsiones producidas por el modelo de cobalto de la epilepsia (Babb et al., 1974). Existen reportes de que la estimulación eléctrica del NI facilita la actividad epiléptica cortical inducida por la aplicación de cobalto (Dow et al., 1962). Sin embargo, otros autores encuentran que dicha estimulación inhibe las

convulsiones producidas por el modelo de epilepsia producido por penicilina (Hutton et al 1972). En otros estudios no se observado respuesta en la evolución de kindling (Min et al., 1998). La lesión o estimulación de la principal eferencia cerebelosa que contiene las fibras de los ND y NI, reduce la duración PD amigdalina registrados durante la fase de generalización (Paz et al., 1991; Rubio et al., 2004). Teniendo en cuenta estas evidencias, el objetivo de este estudio fue comprender la participación del ND y del NI destruyendo específicamente sus cuerpos neuronales con AK (McGere et al., 1978), en el desarrollo del modelo kindling amigdalino.

Acido kaínico.

Dentro de las sustancias neurotóxicas más estudiadas se encuentra Ak, clasificado entre las neurotoxinas que actúan sobre receptores específicos y a la cual se le ha brindado gran interés desde su descubrimiento, ya que ha servido principalmente para la creación de modelos experimentales de epilepsia (Kemppainen et al., 2006; Taniura et al., 2006). Este aminoácido natural fue aislado e identificado de varias algas marinas, setas, hongos y otras plantas japonesas. Por ejemplo, se obtiene del alga Digenea simplex, la cual ha sido incluida durante muchas décadas en la farmacognosia japonesa por sus excelentes propiedades antiáscaris. El nombre de Ak significa monstruo de los mares (McGeer., 1981). En los primeros siete días después de la administración del AK vía intracerebral, se observa pérdida neuronal progresiva a nivel de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, así como efectos neurogénicos; después de 14 días y hasta 60, los daños más significativos se presentan en CA3, como se ha descrito para el patrón de daños en animales adultos, concluyendo que la administración de la referida neurotoxina, provoca tanta apoptosis neuronal como neurogénesis, para reemplazar las neuronas perdidas por apoptosis, en el área CA3 del hipocampo (Dong et al., 2003).

El AK es un agonista del glutamato (Olney et al., 1974) que actúa sobre receptores glutamatérgicos (Hollman et al., 1989), con alta afinidad para el ácido kaínico (receptores no-NMDA del tipo kainato), asociado a un canal iónico. (Ben Ari et al. 2000). El efecto neurotóxico del ácido kaínico podría ocurrir al ejercer su acción sobre receptores no-NMDA, localizados en la región postsináptica, a nivel de las dendritas de las neuronas (Coyle, 1983; Rothman, 1985); o bien, al actuar sobre receptores presinápticos (autorreceptores) que son receptores ionotrópicos de glutamato. Como ligandos, comparte agonistas son receptores AMPA; de hecho, a veces se hace referencia a los receptor no NMDA. Como otros receptores de glutamato, se encuentran en la membrana de neuronas y presentan una respuesta excitatoria de la célula que los presentan (Lerma., 2003). Al

vacuolizaciones citoplásmicas y un edema en las mitocondrias, que finalmente provocan la muerte celular (Coyle, 1983).

Por lo que se sabe, sobre los mecanismos fisiopatológicos de las lesiones descritas en las terminales postsinápticas parecen estar relacionados con la entrada masiva de Na+ y sobre todo de Ca²⁺, acompañado de agua (Rothman, 1985; Choi, 1987), hacia el interior de la célula a través de los canales iónicos asociados al receptor no-NMDA, con la correspondiente pérdida de la homeostasis del Ca2+ (Choi, 1990) y la degeneración neuronal subsiguiente (Pujol et al., 1993). Estas lesiones, se traducirán en alteraciones electrofisiológicas en los registros electroencefalográficos.

También se ha señalado que el AK causa daño selectivo a los cuerpos celulares dejando intactas fibras de entrada de paso y de salida frente a las fibras de paso (McGeer *et al.*, 1978). Las inyecciones de AK en el NI y en el ND del conejo, causan la completa desaparición de los cuerpos neuronales y sus axones, pero las fibras de y las terminales aferentes que van hacia los núcleo permanecen intactas (Lavond *et al.*, 1985).

JUSTIFICACIÓN.

Las lesiones electrolíticas dirigidas a estructuras cerebrales no solo destruyen los núcleos celulares sino también las fibras de entrada, fibras provenientes de otras estructuras y las fibras de salida hacia otras estructuras. Hay pérdida completa de la zona lesionada sin tener

circunscrita la zona de lesión, siendo difícil discriminar si los resultados que se obtienen son debidos a la extensión de la lesión o al daño retrógrado en otras estructuras. En este trabajo se estudió especificamente la participación del ND y del NI del cerebelo en la epilepsia ya que estos núcleos están formados por neuronas excitadoras y sus axones que establecen contactos sinápticos con estructuras cerebrales relacionadas con la actividad epiléptica como lo es el tálamo y la corteza motora contralateral.

Los resultados de este trabajo de investigación podría contribuir al desarrollo de nuevos métodos terapéuticos efectivos, para tratar a aquellos pacientes que no responden a los tratamientos farmacológicos convencionales que corresponden aproximadamente el 30% del total de los paciente con epilepsia y la lesión de los ND y NI del cerebelo podía ser una alternativa terapéutica para este tipo de pacientes

HIPÓTESIS.

El cerebelo participa en las crisis epilépticas. El núcleo interpósitus y el núcleo dentado son la principal eferencia cerebelosa y están formados por neuronas excitadoras, sus axones establecen contactos sinápticos con estructuras cerebrales relacionadas con la actividad epiléptica. Al lesionar estos núcleos selectivamente con ácido kaínico se inhibirá la epileptogénesis producida por el kindling eléctrico amigdalino en la rata.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

 Evaluar el efecto de la lesión circunscrita inducida con ácido kaínico en el Núcleo Dentado y el Núcleo Interpósitus del cerebelo en el desarrollo del modelo Kindling amigdalino de la rata.

Objetivos específicos:

- Evaluar la duración de la actividad epiléptica en animales con lesión del ND y del NI.
- Determinar el tiempo que tardan los animales con lesión del ND y del NI en presentar cada uno de los estodos conductuales.
- Corroborar que no hubo lesión por la microinyección de ácido kaínico en hipocampo y cerebelo así como, lesión retrograda a los núcleos pontinos y de la oliva inferior.

MÉTODOS.

Diseño Experimental.

Las ratas estarán divididas en cuatro grupos:

- Grupo control, únicamente inducción del modelo kindling n=10
- Con inyección de vehículo (solución salina) en el núcleo dentado n=10
- Lesión con AK del núcleo dentado n=10
- Lesión con AK del núcleo interpósitus n=10

Animales.

Para este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 250 a 300 gr. Se mantuvieron en cajas estándar de bioterio (26 x 36 x 16 cm) con comida y agua ad *libitum*, un periodo de luz oscuridad de 12:12, y bajo condiciones ambientales de temperatura entre 20 y 23°C.

Equipo.

Para las cirugías se utilizó un aparato estereotáxico David Kopf para ratas, electrodos bipolares de acero inoxidable, material quirúrgico y farmacéutico convencional. Para los registros electrofisiológicos se utilizó

una caja de acrílico translúcida dividida en tres compartimientos (80 x 34 x 38 cm), un estimulador Grass S88 y un polígrafo Grass 78D.

Cirugías.

Este proyecto contempló 4 grupos: 1) grupo control al que únicamente se les desarrolló del modelo experimental de epilepsia; 2) grupo sham al que además de la cirugía para la colocación de electrodos para el desarrollo del modelo kindling se les administro una inyección de solución salina en el núcleo dentado; grupo 3) grupo con lesión en el núcleo dentado; 4) grupo con lesión en el núcleo interpósitus. Para realizar las cirugías cada una de las ratas se anestesiaron con ketamina (100mg/kg), se colocaron en un aparato esterotáxico (David Köpf), se hizo una incisión en dirección antero posterior y se expusieron las cisuras craneanas realizando trepanaciones quirúrgicas para la colocación de electrodos dirigidos hacia la corteza sensorimotriz derecha, al el núcleo amigdalino basolateral con coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el atlas (Paxinos y Watson., 1982). Anterior 2.8 mm, lateral 5 mm y 8.5 mm ventral. La lesión se hizo por medio de una microinyección estereotáxica de 1.0µl AK (5nM) a una velocidad de 0.1 ul/min. Las coordenadas para la lesión del ND fueron las siguientes: lateral 3.4, anterior 2.3, altura 4.0 mm; para la lesión del NI con 0.8µl AK (5nM) lateral 2.5 mm, anterior 2.3 mm y altura 4.0 mm. Con estas mismas coordenadas se hizo la microinyección de solución salina en las

ratas del grupo sham. Se utilizó un tornillo que se fijo al cráneo como referencia. Una vez terminada la cirugía los electrodos se soldaron a microconectores y se fijaron al cráneo con acrílico dental.

Registro electrofisiológico.

Los registros electroencefalográficos se realizaron de la siguiente manera: el miniconector de la rata se unió mediante cables flexibles al polígrafo y mediante un interruptor al estimulador. Las condiciones del polígrafo utilizadas fueron 50 μ V de amplificación, un ancho de banda de los filtros de 1 a 30 Hz y una velocidad del papel de 10 mm/seg. Para el estimulador fueron 5 V, con pulsos cuadrados de 1 mseg. a 60 Hz.

Protocolo experimental.

Diez días después (período de recuperación) y el tiempo que tarda en ejercer el AK su efecto excitotoxico, las ratas se colocaron en cajas transparentes de acrílico (22.5X30X30) se conectaron mediante cables flexibles a un polígrafo Grass de 12 canales 78D. y se estimularon diariamente con un estimulador Grass S88.

Una vez obtenido en su totalidad el kindling después de 10 crisis tónico clónicas generalizadas las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y sacrificadas mediante el sistema de perfusión intracardiaca, con

solución de formol al 10%. Los cerebros fueron removidos y conservados en formol para hacer proceso histológico.

Cuantificación celular.

Se eligieron seis áreas representativas de las estructuras que envían proyecciones a la DN e IN, de la siguiente manera: del hemisferio lateral del cerebelo, para probar la población de células de Purkinje; del núcleo principal de la oliva inferior y de la oliva accesoria dorsal, que envían fibras a el DN e IN, respectivamente, y de los núcleos pontinos, que envían fibras a los dos el DN y al NI. Seis otras áreas del hipocampo CA3 fueron escogidos para evaluar posible la difusión de AK sistémica. En total, 30 zonas para cada rata fueron fotografiadas y analizadas por el software Image-Pro. La estimación del tamaño del marco de las células de Purkinje y las células piramidales fue de 520 µm2, mientras que el tamaño del marco de la oliva inferior y núcleos pontinos fue de 105 µm2. Los valores se expresan como media ± error estándar.

Análisis estadístico.

Se encontraron diferencias significativas para la duración de PD amigdalina y el número de células en las estructuras cerebrales fueron determinadas por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía de medidas repetidas. Comparaciones posteriores en las diferentes condiciones se

hicieran utilizando una prueba de comparación múltiple de Tukey. El punto de corte para el nivel de significación de p <0,05. El número de estímulos necesarios para llegar a cada una de los estados conductuales como una comparación entre los grupos se determinó mediante un ANOVA seguido de una prueba post-hoc Friedman, el nivel de significación fue de p <0,01.



Síntesis de la metodología.

RESULTADOS.

Este trabajo reporta el efecto de la lesión del ND y NI cuyos axones forman la principal vía de salida de información del cerebelo en el desarrollo del modelo de epilepsia kindling, después de la inyección del AK en el ND y en el NI no se encontró ninguna alteración en la coordinación motora en general, en el equilibrio o la postura después de haber hecho las lesiones en los núcleos del cerebelo, ni signos de actividad epiléptica en registros EEG obtenido antes de la estimulación de kindling (registro basal) figura 9.



Figura 9. Registro electroencefalográfico tomada de una rata con lesión en el núcleo dentado. El primer canal muestra el registro cortical y el segundo canal el registro amigdalino, la flecha muestra la actividad de EEG basal y no se observa actividad epiléptica normal antes del primer estímulo paro la inducción del modelo kindling.

Después de la lesión con AK en el ND y el IN, el análisis histológico realizado con la técnica hematoxilina-eosina reveló la presencia de fibras, sin cuerpos celulares, en la zona de lesión. La corroboración de la zona de lesión, se hizo por medio de cortes histológicos de 40µm obtenidos por medio de un micrótomo de congelación y procesados con la técnica histológica procedimiento rápido (Guzmán et al., 1958), mostrando que el ND y el NI fueron totalmente lesionados observándose en la amplificación de la zona de lesión únicamente fibras, cuando los comparamos con el hemisferio contralateral respectivomente como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Sección coronal del cerebelo procesodo con lo técnica de procedimiento rápido. (A) núcleo interpósito (I). (B) núcleo dentado (D). Los rectángulos muestran micrografías de un corte sagital (40X) teñido con hematoxilina-eosina, indicando la presencio de fibras en el lado lesionado con ácido Kaínico (K), y los cuerpos celulares en el lado no lesionado.

No se encontraron efectos en la duración de la PD ni en la latencia a presentar los estados conductuales entre las ratas lesionadas en NI el ND. Esta observación se debe probablemente al hecho de que estos dos núcleos no difieren sustancialmente en sus conexiones neuroanatómicas como se muestra en la figura 11.



Figura 11. Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata indicando las vías anotómicas de la amígdala y cerebelo. Se puede observar que el núcleo dentado y el núcleo interpóstus tienen las mismas conexiones neuroanatómicas.

No se encontró diferencia entre los grupos en la duración de la PD límbica en la evolución del modelo kindling. Sin embargo, una vez que los animales presentaron el estado de generalización se encontraron diferencias considerables en la duración de la actividad epiléptica cuando los grupos se compararon con el grupo control. El día de estímulo 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 (F = 15,58; 25,88; 18,96; 13,96; 7,67; 12,18; 14,76; 25,49; 8,75, P <0,01) Figura 12.



Figura 12. Duracián de la PD Amigdalina en las crisis límbicas y durante 10 crisis generalizadas. Grupo control (círculos negros), grupo Shom (triángulo), grupo con lesiones ND (círculos grises), y grupo con lesiones en el NI (circulos blancos). Los valores se expresan como media ± el errar estondar. La significación estadístico se determinó mediante el onálisis de varianza de medidas repetidas una vío. Seguido de una prueba de Tukey (p <0,01).

Se encontraron diferencias significativas (P <0,01) entre los grupos en el

número de estímulos necesarios para llegar a cada una de las etapas de

comportamiento descritas por Racine y col. (1972). Figura 13.



Figuro 13. Estados conductuales de acuerdo con lo escala de Racine. Grupo control (barras negro), grupo sham (barras rayados), grupo con lesión del ND (barras grises), y el grupo con lesión en el NI (barras blancas). Los rotas lesionadas en el ND y el NI necesitaron un menor númera de estímulos requeridos para llegar a cada estado conductual del kindling, en comparación con los grupos control y shom. Los valores se expresan como media ± el error estándar. La significancia estadística se determinó medionte el análisis varianza de una vía seguido por una pruebo de significancia de Friedman (p <0.01).

La cuantificación de las células en el hipocampo, el núcleo Pontinos, la corteza cerebelosa, la oliva inferior y los núcleos pontinos no mostraron variación significativa en el número de células cuantificadas por los campos. Tabla 1 y Figura 14. Tabla 2

Cuantificación del número de células en el hipocampo, núcleos pontinos,

oliva inferior y corteza cerebelosa.

Número de células por área:

Células Purkinje, células piramidales (520µm²), y células de los núcleos

pontinos, Células de la oliva inferior (105 µm²).

	Grupos			
	Control	Sham	Lesión deł Núcleo Dentado	Lesión del Núcleo Interpósitus
Células de Purkinje	11±1.2	9 ± 1.0	7±1.2	10± 0.73
Células Piramidales (CA3)	37 ± 2.8	44 ± 4.8	46 ± 0.8	43 ± 8.2
Células de los Núcleos pontinos	33 ± 3.1	40 ± 7.5	30 ± 3.1	41 ± 3.7
Células de la Olive inferior	18 ± 3.5	17 ± 4.0	12±1.0	16 ± 3.0

Los valores son expresados ± la media del error estándar. No existen diferencias en el número de células contadas por área. La significancia estadística se determinó mediante el análisis varianza de una vía seguido por una prueba de significancia de Tukey (p <0.01).



Figura 14 A. Fotomicrografías (2x) representativas de los diferentes grupos experimentales; A) Hipocampo, B) Cerebelo. El recuadro muestra la zona en donde se hizo la cuantificación celular.



Figura 14 B. Fotomicrografías (10x) representativas de los díferentes grupos experimentales; A) células de núcleos pontinos, B) células de la oliva inferior. El recuadro muestra la zona en donde se hizo la cuantificación celular.

DISCUSIÓN

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, el tratamiento es preferencialmente formacológico aunque en el 30% de los pacientes sigue siendo imposible frenor esta olteración. Para estos pacientes refractarios a medicamentos se han propuesto tratamientos quirúrgicos para la resección de la zona epileptogénica (Engel., 1982), pero en muchos de los casos existen limitaciones para la realización de estos procedimientos. Existe un gran interés en determinar si la manipulación cerebelosa (por estimulación o lesión) puede contrarrestar las crisis epilépticas. (Cooper et al., 1976, Davis et al., 1992).

En este trabajo se seleccionó al modelo del kindling eléctrico amigdalino ya que su desarrollo gradual y progresivo permite determinar los cambios conductuales, electrográficos e histológicos que acompañan al proceso epiléptico (Goddard et al., 1969).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis planteada previamente de que el cerebelo participa en las crisis epilépticas y que una de las vías por las que ejerce su efecto es a través del ND y del NI que son la principal eferencia cerebelosa. Estos núcleos están formados por neuronas excitadoras (glutamatérgicas y aspartatérgicas), sus axones estoblecen contactos sinápticos con estructuras cerebrales relacionadas con la actividad epiléptica como el tálamo y la corteza sensoriomotora proponiendo que

una vez que son lesionadas las células de estos núcleos selectivamente con AK se inhibiría la epileptogénesis producido por el kindling eléctrico amigdalino en la rata.

En este estudio se utilizó la lesión del ND y del NI producida por el AK, teniendo en cuenta su capacidad de lesionar los cuerpos neuronales sin doñar a las fibras de entroda, de paso o de solida (Coyle et al., 2004). El volumen y lo dosis inyectada de AK en el ND y en el NI fue normalizado en nuestro laboratorio. Los resultados histológicos del presente estudio confirman que la destrucción de los cuerpos neuronales del ND y del NI se hizo de manera total y sin lesionar las fibras como ha sido descrito en estudios previos, en donde se han utilizado conejos para determinar la de estos núcleos cerebelosos en pruebas participación de condicionamiento (Katz y Steinmetz, 1997; Lavond et al., 1985; Anderson et al., 1994). También demostramos que la dosis y el volumen utilizado no provocan alteración en la actividad motora de los animales ni tampoco alteraciones en el registro basal del EEG en la corteza sensoriomotora contralateral a las lesiones (aquí proyectarían las fibras de los núcleo lesionados), los registros se hicieron diez días posteriores a la inyección del AK, lo que confirma que este tiene un efecto local (McGere et al., 1978). No se realizaron pruebas para la detección de muerte celular en este protocolo experimental ya que los animales fueron sacrificados después de de que se habían obtenido 10 crisis tónico-clónicas generalizadas cuando

el AK ya ejerció su efecto excitotóxico. Está reportado que la muerte celular por efecto del AK ocurre durante los primeros seis días después de haber sido inyectado (Ben-Ari et al., 1981).

Hasta ahora, el papel que tienen estos núcleos del cerebelo en las crisis epilépticas no ha sido bien definido. Algunos autores han sugerido que la lesión electrolítica del ND tiene un efecto supresor de la actividad epiléptica, mientras que el NI no tiene participación en este proceso (Tsuru et al., 1992; Hutton et al., 1972). Otros autores atribuyen un papel facilitador de los núcleos sobre la crisis epilépticas (Babb et al., 1974; Dow et al., 1976). En nuestra condición experimental se hicieron las lesiones circunscritas al ND y al NI, en el desarrollo del modelo kindling eléctrico amigdalino que tiene dentro de sus ventajas el poder estudiar tanto las crisis parciales como las crisis generalizadas. En este estudio se incluyeron los animales que tuvieran 10 crisis generalizadas, ya que se consideró importante analizar la participación de las fibras de los ND y del NI en la epilepsia cuando el modelo kindling estuviera establecido. La lesión del ND y NI tuvo principalmente un efecto inhibitorio sobre las crisis generalizadas, lo cual concuerda por lo menos para el ND con lo reportado por el grupo de Tsuru (1992). Quienes atribuyen a este núcleo un papel supresor de la actividad epiléptica. Sin embargo, difícilmente se podrían hacer comparaciones entre los resultados de las lesiones electrolíticas y las lesiones con AK

debido a que las lesiones electrolíticas no se circunscriben a la lesión, además de que dañan todo tipo de fibras.

Nuestros hallazgos muestran que no existen diferencias significativas en la duración de la actividad epiléptica y la latencia a presentar cada uno los estados conductuales del modelo entre los grupos de ratas con lesiones en el ND y los de lesión en el NI. Las conexiones neuroanatómicas entre estos dos núcleos no difieren sustancialmente. Las fibras del ND y del NI pasan a través de la formación reticular mesencefálica, y en este estudio se excluye la posibilidad de afectar a esta estructura, debido a que se sabe que la formación reticular desempeña un papel importante en la propagación de la actividad epiléptica, pero no tiene influencia en la duración de la PD (Ferrnandez-Guardiola et al., 1972). Posteriormente los axones del ND y del NI hacen contactos sinápticos en el núcleo rojo en donde también hemos descartado la posibilidad de que esta estructura tenga participación en este modelo experimental ya que está reportado que la lesión de este núcleos, retrasa significativamente la aparición de las etapas 5 y 6 del modelo kindling en gatos (Paz y Reygadas., 1987), lo que es contrario a nuestros resultados. El ND y NI también establecen contactos sinápticos en el núcleo de Darkschewisch y en núcleo intersticial de Cajal, que son núcleos que están involucrados en el control del movimiento ocular. Las fibras de los ND y NI en el tálamo establecen contactos sinápticos principalmente con las neuronas del núcleo ventral medial y el

ventral lateral. Adicionalmente el NI proyecta al núcleo ventral posterior (Haroian et al., 1981), este núcleo está inervado por neuronas somatosensoriales (Killackey et al., 2003), con cual se descarta la posibilidad de que este núcleo participe en el fenómeno epiléptico.

No se encontraron diferencias en la duración de la PD en las crisis límbicas, de las ratas con lesión en el ND y del NI cuando fueron comparadas con el control, lo anterior muy probablemente debido a que no existe comunicación directa entre las eferencias de los ND y NI y el complejo amigdalino. La única comunicación probada por medio de potenciales evocados entre el complejo amigdalino y los núcleos del cerebelo es con el núcleo fastigial (Heath y Harper., 1974). Como se sabe el núcleo fastigial es básicamente de entrada al cerebelo (Ito., 1984), por lo que se puede hipotetizar que mientras no haya generalización de la actividad epiléptica inducida por el kindling a estructuras como el tálamo y la corteza sensoriomotora entre otras, el cerebelo no ejerce ningún efecto sobre las crisis focales producidas en la Am.

En este trabajo se observó que una vez que las crisis son generalizadas al tálamo y a la corteza sensoriomotora la duración de la PD es de menor duración muy probablemente debido a que las fibras de las células de los ND y NI del cerebelo son principalmente glutamatérgicas y aspartatérgicas (Monaghan *et al.*, 1986). Al ser lesionadas dejan de ejercer su efecto excitatorio sobre las estructuras del cerebro anterior.

En el tálamo ND y NI dejan sus colaterales principalmente en el núcleo ventral lateral y al ventral anterior (Ito., 1984), y se ha demostrado por medio de inyecciones de peroxidasa de rábano que este último proyecta al subiculum (Sikes *et al.,* 1977), estructura que en rebanadas de tejido humano epiléptico ha demostrado generar actividad epiléptica (Cohen *et al.,* 2002). Más aún, se sabe que las lesiones tálamicas son capaces de disminuir la frecuencia de las descargas de espigas de las crisis generalizadas tanto en animales como en el humano (Braisloswky *et al.,* 1997). También se sabe que estos núcleos tálamicos envían influencias excitatorias a la corteza sensoriomotora (Sabatino *et al.,* 1988). Por lo tanto se puede inferir que las fibras del ND y del NI participan en el fenómeno epiléptico a través de las conexiones con el tálamo y la corteza sensoriomotora disminuyendo las crisis generalizadas.

Los resultados de este trabajo muestran también que se requiere un menor número de estímulos para alcanzar cada uno de los estados conductuales. El núcleo basolateral amigdalino tiene proyecciones directas a la corteza motora y al tálamo (Ito., 1984). En el tálamo las fibras de los núcleos del cerebelo y las amígdalinas convergen principalmente en los núcleos parafascicular y ventromedial (Anderson y DeVito., 1987., Sadikot y Rymar., 2009). Estos núcleos cuyas fibras son dirigidas hacia la corteza motora son clasificados como núcleos motores (Marini et al., 1996). Por lo tanto, las fibras de los núcleo lesionados no establecen contactos

sinápticos con estos núcleos tálamicos ni con la corteza motora (Mason et al., 2000; Rispal-Padel y Latrille 1974). Por lo anterior una menor latencia para presentar cada una de las etapas de comportamiento en los grupos lesionados puede ser debida a las conexiones directas entre el núcleo amigdalino basolateral y la corteza motora (Vergnes et al., 1987).

Uno más de los objetivos de este estudio fue determinar el número de células de Purkinje, del hipocampo, de los núcleos pontinos y de la oliva inferior, utilizando la técnica histológica de hematoxilina-eosina. Se utilizó un método de análisis de imágenes para determinar de forma precisa la cantidad de células, no se encontraron diferencias en el número de células cuantificadas por campo de las diferentes estructuras cerebrales que envían sus axones al ND y al NI. Asimismo se confirmó que la células que van desde los núcleos principal de la oliva inferior y del dorsal accesorio de la oliva, envían fibras al ND e NI, respectivamente (Ruigrok y Voogd., 2000) y a los núcleos pontinos (Brodal y Jan., 1992). También se corroboró el número de células del hipocampo para evaluar la posible difusión sistémica del AK, ya que ahí se encuentra el mayor número de receptores a kainato (Ben-Ari et al., 1988). Tampoco se encontró ninguna diferencia significativa en el número de células entre los grupos, por lo que se puede descartar que la propagación el AK a otras estructuras, confirmándose así que las lesiones del ND y del NI fueron circunscrita a estos núcleos.

Por otro lado, se sabe que las células de Purkinje envían sus axones a los ND y NI (Llinas et al., 2004). Sin embargo, no se encontraron diferencias con relación al grupo control en el número de la células de Purkinje cuando sus blancos (ND y NI) fueron destruidos. Esta reportado que cuando las células de Purkinje carecen de un objetivo específico, sus axones pueden reorganizarse (Dusart et al., 1997). Muy probablemente esta plasticidad no sólo sea en los axones del cerebelo si no también en los de la oliva inferior y de los núcleos pontinos.

CONCLUSIONES.

- El volumen inyectado, y la concentración de AK son suficientes para lesionar totalmente las células del ND y del NI.
- Se confirmó que no hubo lesión por la microinyección de ácido kaínico en hipocampo y células de Purkinje así como, lesión retrograda a los núcleos pontinos y de la oliva inferior.
- Los axones del ND y del NI no difieren de sus conexiones neuroanatómicas, participondo de la misma manera en el desarrollo del modelo kindling amigdalino.

- 4. Existe una menor latencia a presentar los estados conductuales del modelo kindling en los animales que tuvieron lesión del ND y del NI.
- 5. La lesión en el ND y en el NI no modifica la actividad electrográfica convulsiva de las crisis límbicas.
- Las lesiones del ND y del NI ejerce efectos inhibitorios en las convulsiones generalizadas en el modelo de kindling eléctrico amigdalino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Adamec, R.E. Does kindling model anything clinically relevant. Biol. Psychiatry. (1990): 27:249-279.

Anderson, M. E.; DeVito, J.L. An analysis of potentially converging inputs to the rostral ventral thalamic nuclei of the cat. Exp Brain Res. (1987): 68:260-276.

Anderson, B. J.; Steinmentz, J. E. Cerebellar and brainstem circuits involved in classical eyeblink conditioning. Rev. Neurosci. (1994): 5: 1-23.

Angaut, P. Cicirata, F. and Separide MF. Topographic organisation of the cerebellothalamic projections in the rat. And autoradiography study. Neuroscience. (1985): 15:389-401.

Baba, H.; Ono, K.; Wada A. J. Transcailosal response (TCR) in the chronic photosensitive baboon preparation, Papio papio. II. Effect of premotor cortical kindling. Electroencephalogr. Clin Neurophysiol. (1987): 67: 564-569.

Babb, TL.; Mitchell A.G.; Crandall, P.H., Fastigiobulbar and detothalamic influences on hippocampal cobalt epilepsy in the cat. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. (1974): 36:141-154.

Ben-Ari, Y.; Tremblay, E; Riche, D.; Ghilini G.; Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of

kainic acid, bicuculline or pentilenetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience. (1981): 6 (7): 1361-1391.

Ben-Ari, Y.; Gho, M. Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid. J. Physiol. (1988): 404, 365-384.

Ben-Ari Y.; Cossart, R. Kainate a double agent that generates seizures. Trends Neurosci (2000): 23:580–587.

Brailowsky, S.; Silva-Barret, C.; Naquet, R. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportes recientes de la investigación experimental. Salud Mental. (1989): 12: 53-62.

Brailowsky, S.; Edourd H.; Marescaux, C. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: En Epilepsia Aspectos Neurobiológicos, Médicos y Sociales. Editores, Dr. Francisco Rubio Donadieu. (1997): 103-146.

Braitenberg, V.; Atwood, R. P. Morphological observations on the cerebellar cortex: J. Comparative Neurol. (1958): 109:1-27.

Brodal, A.J.; Laceda, M.; Destombes, J.; Anaut, P. the patter in the projections of the intracerebral nuclei onto to the nucleus reticularis tegmenti pantisin the cat: An experimental anatomical study. Exp Brain Res. (1972): 16: 140-160.

Brodal Per.; Jan G. Bjaalie. Organization of the pontine nuclei Neurosc. Res. (1992): 13(2): 83-118

Cajal, S. R. Histologie du système nerveux. Trans. L. Azoulay. Paris: Maloine [1911]: 2

Carlsen J., Zaborszky K., Heimer L. Cholinergic projections from the basal foreinbrain to the basalateral amygdaloid complex: A combined retrograde florescencent and hinmuhistochemical study. J. compative Neurol. (1985): 234: 155-167.

Cavazos, J.E.; Golarai, G.; Sutula, T.P. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. J. Neurosci. (1991): 1: 2795–2803.

Cohen, I.; Navarro, V.; Clemenceau, S.; Baulac, M.; Miles, R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science. (2002): 298: 1418–1421.

Choi, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J. Neurosci. (1987): 7: 369-379.

Choi, D.W. The role of glutamate neurotoxicity in the hypoxic-isquemic neuronal death. Annu. Rev. Neurosci. (1990): 13: 171-182.

Cooper, S.; Amin, I.; Riklan, M.; Watz, J., Tung, P. Chronic cerebellar stimulation in epilepsy. Arch Neurol. (1976): 33: 559-570.

Coyle, JT. Neurotoxic action of kainic acid. J. Neurochem. (1983): 41: 1-11.
Coyle, JT.; Molliver E.; Mark.; K.; Michae., J. In situ injection of kainic acid: A new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of passage. J. Comparative Neurol. (2004): 180, Issue (2): 301–323.

Croucher, M.J.; & Bradford, H.F.; NMDA receptor blockade inhibits glutamate-induced kindling of the rat amygdala. Brain Res. (1990): 506: 349-352.

Csernansky, J.G.; Kerr, S.; Pruthi, R.; Prosser, E.S. Mesolimbic dopamine receptor increases two weeks following hippocampal kindling. Brain Res. (1988): 449 (1-2):357-360.

Czubayko, U.; Sultan, F.; Their, P.; Schwarz, C. Two types of neurons in the rat Cerebellar nucli as disfinguished by membrane potentials and intracellular fillings. J. Physiol. (2001): 2017-2029.

Corcoran.; S.T. Mason, Role of forebrain catecholamines in amygdaloid kindling, *Brain Res.* (1980) : 190: 473-484.

Davis, R.; Emmonds, E.S. Cerebellar stimulation for seizure control 17 years study. Sterotaxic Func Neurosurg. (1992): 58: 200-208.

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

De Zeeuw, CL.; Holtege, JC.; Voogd, J. Ultrastructural study cerebellar and mesodiencephalic innervations of the cat medial accessory olive:

anterograde tracing combined with Immunocytochemistry. Journal Comparative Neurol. (1989): 284:12-35.

Dichter. M.A. Cellular mechanism of epilepsy and potential new treatment strategies. Epilepsia (1989): 30 S0-S12.

Dong, H., Csernansky, CA.; Goica, B.; Csernansky, F.G. Hippocampal Neurogenesis Follows Kainic Acid-Induced Apoptosis in Neonatal Rats. J Neurosci. (2003):23(5):1742-1749.

Dow, R.; Fernandez-Guardiola, A.; Manni, E. The influence of the cerebellum on experimental epilepsy. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. (1962): 14: 383-398.

Dusart, I., Airaksinen, M. S.; Sotelo. Cell survival and axonal regeneration are age depend: An in vitro study. J. Neurosci. (1997): 17 (19): 3710-3726.

Engel, J. Jr. A proposed diagnostic scheme for people whit epileptic seizures and with epilepsy: report of LICE task force classification and terminology. Epilesia (2001): 42: (6): 796-803.

Engel, J. Jr. Seisures and epilepsy. Philadelphia F.A. Davis (1989).

Engel, J. Surgery for epilepsy: a review. Acta Neurology Scand, (1986): 73: 551-560.

Engel, J. Jr. Surgical treatment of the epilepsies. New York Raven Press (1982).

Ferencz, I.; Kokoio, M.; Keep, M.; Elmer, E.; Metsis, M.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling. Neuroscience (1997): 80: 389–399.

Fernández-Guardiola, A.; Roldan, E. Sobre los mecanismos de propagación e inhibición de la actividad convulsiva. Acta Politécnica Mexicana (1962): 3 (17,18):1-16.

Fine, EJ; Ionita, C.C.; Lohr L. 'The history of the development of the cerebellar examination''. Semin Neurol. (2002):22 (4): 375–84.

Fitz. J.G.; McNamara, J.O. Spontaneous interictal spiking in the awake kindling rat. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. (1979): 47: 592-595.

Fisher, R.S. Animal models of the epilepsies. Brain Res. Rev., 1989, 14, 245-78.

Fisher R.S.; Weber, W.R.; Lesser, R.P. High frequency EEG activity at the star of seizures. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. (1992): 9:441-448

Fox, C.A.; Hillman, E.D.; Seigesmund, K.A.; Duta, C.R. The primate cerebellar cortex: A Golgi and electron microscopic study. Pro. Brain Res. (1967): 25: 174-225.

García, G. F. Actualidades en epilepsia; Series del instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Coordinador: Medina Marco Tulio, (2002): 20-28.

Gastault; H. Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. Epilepsia. (1970): 11: 102-113.

Geinisman, Y.; deToledo-Morrell, L.; Morrell, F. Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. Brain Res. (1991): 566:77–88

Ghez. C.; Fahn, S. 'The cerebellum''. In Kandel ER, Schwartz JH. Principles of Neural Science, 2nd edition. New York: Elsevier. (1985): 502–522.

Goddard, G.V.; Mcintyre, D.C.; Leech, CK. A permanent change in the brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp. Neurol. (1969): 25: 295-330.

Guzmán, C.; Alcaraz, M.; Fernandez, A. Rapid procedure to localize electrodes in experimental Neurophysiology. Bol. Inst Estud. Med boil., México (1958): 16: 29-31.

Goodman, D.C.; Hallett, R.E.; Wuelch, R.E. Patterns of localization in the cerebellar corticonuclear projections of the albino rats. J. Comparative Neurol. (1963): 121:51-68.

Groenewegen, H.; Vandijk, C.A. Efferent projections of ventral palidum in the rat as studied by means of anterograde transport of the lectin. Neurosci. Lett Suppl. (1984): S58.

Haroian, A. J.; Massopust, L.C.; Joung P. Cerebellothalamic projections in the rat: An autoradographic and denegation study. J. Comparative Neurol. (1981): 197:217-236.

Heath, R.G.; Harper, J.W.; Ascending projections of the cerebellar fastigila nucleus to the hippocampus, anygdala and other temporal lobe sites;

evoked potentials and histological studies in monkeys and cats. Exp. Neurol. (1974): 45: 268-287.

Herrick, O. Origin and evolution of the cerebellum. Archives Neurological Psychiatric. (1924):11:621-624.

Houser, C.; Miyashiro, J., Swartz, B.; Walsh, G.; Rich, J.; Delgado-Escueta, A Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. J Neurosci. (1990): 10: 267-282.

Hutton, J.T.; Frost, J.D.; Foster, J. The influence of the cerebellum in cat penicillin epilepsy. Epilepsia. (1972): 13: 401-408.

Ito, M. The Cerebellum and Neural Control, Raven Press, New York (1984)

Ito, M.; Yoshida, M. The origin Cerebellar induced inhibition of Deiters neurons I. Monosynaptic initiation of the inhibitory posinaptic potentials. Exp. Broin Res. (1984): 2: 230-349.

(ILAE) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electraencephalographic classifications of epileptic seizures. Epilepsia. (1981): 22: 489-50.

International League against Epilepsy (ILAE). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia. (1989): 30: 389-399.

(ILAE) Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009 Anne T. Berg, Samuel F. Berkovic, Martin J. Brodie, Jeffrey Buchhalter, J. Helen Cross, Walter van Emde Boas, Jerome Engel, Jacqueline French, Tracy A. Glauser, Gary W. Mathern, Solomon L. Moshe, Douglas Nordli, Perrine Plouin, ZIngrid E. Scheffer. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies. Epilepsia, (2010): 51(4):676–685,

Jansen J. and Bodard A., Morphogenesis of the cetacean cerebellum. J. Comparative Neurolo. (1954): 93: 341-400.

Jeager, C.B.; Kopor, R.; Llinas, R. Cytology and organization of rat cerebellar organ culture. Neuroscience (1988): 26: 509-538.

Jobe, P.C.; Dailey, J.W.; Wernicke, J.F. A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. Crit. Rev. Neurobiol. (1999): 13: 317-56.

Johnson, M.R. Sander, J.W. The clinical impact of epileptic genetics. Jouranal Neurology Neurosurgery Psychiatry. (2001): 70: 428-430.

Joy, R.M.; Albertson, T.E.; Stark, L.G. An analysis of the actions of progabide, a specific GABA receptor agonist, on kindling and kindled seizures. Exp. Neurol. (1984): 83: 144–154.

Kalichman, W. M. Pharmacological Investigation of Convulsant y Aminobutyric Acid (GABA) Antagonists in Amygdala-Kindled Rats. Epilepsia. (1982): 23 (2): 163–171.

Katz, D.B.; Steinmetz, J.E. Single-unit evidence for eye-blink conditioning in cerebellar cortex is alerted, but not eliminated, by interpositus nucleus lesions. Learn Mem. (1997): 4: 88-104.

Kemppainen, EJ.; Nissinen, J.; Pitkanen, A. Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. Epilepsia (2006): 47(5):820-829.

Killackey, H. P.; Murray S. Corticothalamic Projections from the Rat Primary Somatosensory Cortex. J. Neurosci. (2003): 23 (19):7381–7384.

Kingsley, R.E. Concise Text of Neuroscience (2nd ed.). Lippincott Williams and Wilkins. ISBN 0-683- (2000): 30: 460-467.

Kitai, S.T.; Kocsis, J.D.; Kiyohara, T. Electrophysiological proprieties of nucleus reticularis cell antridromic and synaptic activation. Exp. Brain Res. (1976): 24: 295-309.

Klass, D.W.; Westmoreland, B.F. Nonepileptic and epileptic electroencephalogram activity. Ann Neurolo. (1985): 18: 627 635.

Kwan, P.; Brodie, M.J. Refractorie epilepsy: mechanism and solutions. Expert Rev. Neurother. (2006): 6: 397-406.

Lallement, G.; Carpentier, P.; Collet, A.; Pernot-Marino, I.; Baubichon, D.; Sentenac-Roumanou, H.; Blanchet, G. Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: comparison with the hippocampus. C. R. Acad. Sci. (1991): III 313: 421—426.

Larsell, O. The morphogenesis and adult patterns of the lobules and tissues of the cerebellum in the white rat. J. Comparative Neurol. (1952): 97: 281-356.

Larsell, O. the comparative anatomy and histology of cerebellum from Monotremes through. Apes vol.1 edited by Jansen. University of Minnesota Press, Miniapolis (1967).

Larsell, O. The cerebellum: A review and interpretation. Arch. Neurol Psychiatr (1937): 31:373-395.

Lavond.; D.G.; Hembree, T.L.; Thompsom, R.f. Effects of kainic acid lesion of the cerebellar interpositus nucleus on eyelid conditioning in the rabbit. Brain Res. (1985): 326:179-182.

Lerma, J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. Nature Reviews Neuroscience. (2003): 4 (6): 481-495

Lieb, J.P.; Engel, J. Jr.; Gevins, A.; Cradall, P.H. Surface and EEG correlates of surgical outcome in temporal lobbe epilepsy. Epilepsia. (1981): 22: 515-538.

Llinas. R.R.; Walton, K.D.; Lang, E.J. In Shepherd GM. The Synaptic Organization of the Brain. New York: Oxford University Press. (2004). "Ch. 7 Cerebellum"

Llinas. R.R.; Walton, K.D.; Lang, E.J., "Ch. 7 Cerebellum". In Shepherd GM. The Synaptic Organization of the Brain. (2004). New York: Oxford University Press.

Lupica, C.R.; Berman, R.F. Atropine slows olfatory bulb kindling while diminished cholinergic innervation does not. Brain Res. Bull. (1988): 20: 203-209.

Marini, G.; Pianca L.; Tredici G. Thalamocortical projection from the parafasicular nucleus layer V pyramidal cells in frontal and cingulated areas of the rat. Neuroscience letters (1996): 203: 81-84.

Mason, A.; Ilinsky, A.; Aladonado, S.; Kułtas-Ilinsky K. Thalamic terminal fields of individual axons from the ventral part of the dentate nucleus in the cerebellar in macaca mulatta. J Comp. Neurol. (2000): 421: 412-428.

McCrea, R.A.; Bishop, G.A.; Kitai, S.T. Morphological an electrophysiological characteristics of projections neurons in the nucleus interpositus of the cat cerebellum. J. Comparative Neurol. (1978): 181: 397-420.

McGeer, P.L.; McGeer, E.G. Hattori, T. Kainic acid a tool in neurobiology edited by E.G. McGeer Raven Press, New York (1978): 123-138.

McGeer, EG.; McGeer, P.L. Neurotoxins as tools in neurobiology. International review of neurobiol. (1981): 22: 123-201.

McNamara, J.O. Cellular and molecular basis of Epilepsy. J. Neurosci. (1994): 14 (6): 3413-3425.

McNamara, J.O.; Bonhaus, D.W.; Crain, B.J.; Gellman, R.L.; Shin, C.H. Biochemical and pharmacologic studies of neurotransmitters in the kindling model. In P.C. Jobe & H.E. Laird II (Eds.). Neurotransmitters and epilepsy. The Humana Press. Inc. Clifton New Jersey. (1987): 115-160.

McNamara, J.O.; Byrne, M.C.; Dasheiff, R.M.; Fitz, J.G. The kindling model of epilepsy: a review. Prog. Neurobiol. (1980): 15: 139–159.

Min, J. K.; Valentine, A. P.; Campbell, T.G. Effect of complete and partial bilateral lesions on deep cerebellar nuclei on amygdaloid kindling rats. Epilepsia. (1998): 39 (7): 692-699.

Monaghan, P.L.; Beitz, A.J.; Larson, A.A.; Altschuler, R.A.; Madl, J.E. Mulelett, M.A. Immunocytochemical localization of glutamate-gleuaminase and aspartate aminotrasferase-like immunoreactivity in the deep cerebellar nuclei. Brain Res. (1986): 363: 364-370.

Mohapel, P.; Dufresne, C.; Kelly, M.E.; McIntyre, D.C. Differential sensitivity of various temporal lobe structures in the rat to kindling and status epilepticus induction. Epilepsy Res. (1996): 23: 179-187.

Mody, I.; Reynolds, J.N.; Salter, M.W.; Carlen, P.L.; MacDonald, J.F. Kindlinginduced epilepsy alters calcium currents in granule cells of rat hippocarnpal slices. Brain Res. (1990): 531: 88-94

Mori, N.; Wada, J.A. Bidirectional transfer between kindlinginduced by excitatory amino acids and electrical stimulation. Brain Res. (1987): 425: 45–48.

Morimoto, K.; Sanei, T.; Sato, K. Comparative study of theanticonvulsant effect of gamma-aminobutyric acid agonists in the feline kindling model of epilepsy. Epilepsia (1993): 34: 1123–1129.

Morimoto, K.; Fahnestock, M.; Racine, R.J. Kindling and status epilépticus models of epilepsy, rewiring the brain. Prog Neurobiol. (2004): 73: 1-60.

Munkenbeck, K. E.; Schwark, W. S. Serotonergic Mechanisms in Amygdaloid-Kindled Seizures in the Rat. Exp. Neurol. (1982):76:246-253-

Naquet, R.; Meldrum, B. S.; Photogenic Seizures in baboon, Eperimental Models of Epilepsy- A manual for the laboratory worker, Raven. (1972): 373-406.

Nidermeyer, E.; Froescher, W.; Fisher, R. Epileptic zeisures disorder: Development in diagnosis and therapy. Journal neurology. (1987): 232:1-12.

Olney, J.; Rhee, V.; Ho, L. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. Brain Res. (1974): 77: 507-512.

Palay, S.L.; Chan-Palay, V Cerebellar cortex: cytology and organization. Berlin, Germany: Springer (1974) 62-67

Paz, C.; Gutierrez-Baeza, F.; Bazán, B.; Transection of the superior cerebellar peduncle interferes with the onset a duration of generalized seizures induced by amigaloid kindling. Brain Res. (1991): 558: 90-92.

Paz, C.; Reygadas, E; Fernandez-Guardiola, A., Amigaloid kindling: In totally cerebeloctomized cats. Exp Neurol. (1985): 88: 418-424.

Paz, C.; Reygadas, E. Red nucleus lesions delay the evolution of amygdala kindling in cats Brain Res. (1987): 422:99-105.

Paxinos, G.; Watson, C.H. The rat brain in sterotoxic coordinates. Academic press New York (1982).

Porter, R.J.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg, H.J.; Scoville, B.; White, B.G. Antiepileptic drug development program. Cleveland Clinic Q. (1984): 51:293-305.

Price, J.L;. Amaral, D.G. An autoradigraphyc study on the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. J. Neurosci. (1981): 1: 1242-1259.

Pujol, R.; Puel, J-L.; Gervais d'Aldin, C. and Eybalin, M. Pathophysiology of glutamatergic synapses in the cochlea. Acta Otolaryngol. (1993): 113: 330-334.

Raines, A.; Anderson, R.J. Effects of acute cerebellectomy on maximal electroshock seizures and anticonvulsant efficacy of diazepam in the rat. Epilepsia. (1976): 17(2):177-82.

Raman, I.M.; Gustafson, A.E.; Padget, D. Neurons Ionic currents and isolated from the cerebellar nuclei. Neuroscience. (2000): 20 (24): 9004-9016.

Raman, I.M.; Bean, P.B. inactivation and recovery currents in cerebellar Purkinje neurons. Biophysics Journal. (2001): 80: 729-737.

Racine, R. Modification of seizure activity by electric stimulation II: motor seizure. Electroencephalogr. Clin Neurophysiol. (1972): 32: 218-227.

Racine, R.j.; Milgram, N.W.; Hafer, S. Effects of procaine hydrochorade diazepam and diphenylhydatoin of zeisures development in cortical and subcortical structures in rats. Electroencephalogr. Clin Neurophysiol. (1975): 38: 355-365.

Racine, R.J.; Zaide, J. A. further investigation into the mechanisms underlying the kindling phenomenon. In: Limbic Mechanisms, Livingston KE, Hornykiewicz. Plenum Press, New York. (1978): 457-493

Represa, A.; Le Gal; La Salle, G.; Ben-Ari, Y. Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. Neurosci Lett. (1989): 99:345-350.

Rispal-Padel, L.; Latrille, J. The organization of projections from the cerebellar nuclei to the contralateral motor cortex in the cat. Experimental Brain Res. (1974): 19: 36-60.

Rubio, C.; Custodio, V.; Juárez, F.; Paz, C. Stimulation of the superior cerebelar peduncle during the development of amygdaloidal kindling in rats. Brain Res. (2004): 1010: 151-155.

Rothman, S.M. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chlorhyde influx. J. Neurosci. (1985): 5: 1483-1489.

Ruigrok, T.J.H.; Voogd, J. Organization of projections from the inferior olive to the cerebellar nuclei in the rat. J. Comparative Neurol. (2000): 209–228.

Sabatino, M; Gravante, G., Ferraro, G.; Savatteri, V.; La-Grutta V. Inhibitory control by substantia nigra of generalized epilepsy in the cat. Epilepsy Res. [1988]; 2(6):380-386.

Sadikot, AF.; Rymar V. V. The primate centromedian-parafasicular complex: anatomical organization whit a note on neuromodulation. Brain Res. Bull (2009): 78:122-130.

Schmutz, M. Relevance of kindling and related processes to human epileptogenesis. Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat. (1987): 11:505-525.

Shinoda, Y.; Yamazaki, M.; Futami, T. Convergent imputs from the dentate and interpositus nuclei to pyramidal tract neurons in the motor cortex. Neurosci lett. (1982): 34: 111-115.

Shinoda, Y.; Kano, M.; Futamy, T. Synaptic organization of thr cerebellothalamo-crebral pathway in the cat II. input output organization of single thalamo-cortical neurons in the ventrolateral thalamus. Neurosc Res. (1985): 2: 157-180.

Siegel, J.; Murphy, G. J. Serotonergic inhibition of amygdala-kindled seizures in cats. Brain Res. (1979): 174: 337-340.

Sikes, R.W.; Chronister, R.B.; White, L. E. Jr. Origin of the direct hippocampusanterior thatamic bundle in the rat: a combined horseradish peroxidasegolgi analysis Exp. Neurol. (1977) 57: 379-395. Snaider, R.S. A cerebellar-ceruleus pathway. Brain Res. (1975): 88: 59-63.

Sramka, M.; Chkhenkeli S.A. Clinical experience in intraperitonial of brain inhibitory structures and application of implanted neurostimulators in epilepsy. Sterotact Funct Neurosururg. ; (1990): 54: 56-59.

So, E.L.; Perry, J.K. Epilepsy in adults. Annals neurology. [1981]: 9: 3-16.

Sutula, T.; He, Xiao-Xian; Cavazos, J.; Scott, G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. Science. (1988):239, 1147-1150.

Suppes, T.; Kriegstein, A.R.; Prince, D.A. The influence of dopamine on epileptiform burst activity in hippocampal pyramidal neurons. Brain Res. (1985): 326: 273–280.

Tanaka, A. Progressive changes of behavioral and electroencephalographic responses to daily amygdaloid stimulation in rabbits. Fukuoka Act. Med. (1972): 63: 152-163.

Taniura, H.; Sng, JC.; Yoneda, Y. Histone modifications in status epilepticus induced by kainite. Histol Histopathol. (2006): 21(7):785-791.

Timmann, D.; Daum, I. "Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research". Cerebellum (2007): 6 (3): 159-62.

Toyama, K.; Tsukahara, N.; Udo M. Nature of the cerebellar influences upon the red nucleus neurones. Experimental Brain Research. (1967): 4: 292-309. Tsuru, N.; Kawasaki, H.; Genda, S.; Hara, K.; Hashiguchi, H.; Hueda, Y. Effect of unilateral dentate nucleus lesion on amygdaloidal kindling rats. Epilepsia. (1992): 2: 213-221.

Vergnes, M.; Marescaux, C.; Ddapauli,s A.; Micheletti, G.; Warter, JM. Spontaneous spikes and wave discharge in thalamus and cotex in a rat model of genetic petit mal-like seizures. Exp. Neurol. (1987): 96(1): 127-136.

Voogd, J. Comparative aspects of the structure and fibre connexions of the mammalian cerebellum Progress Brain Res. (1967): 25 94-135

Voogd J.; Glickstein, M. The anatomy of the cerebellum. Trends in Neurosciences (1998): 21:370–375

Yoshida, M.; Yajima K.; Uno M. Different activation of two types of the pyramidal tract neurones thought the cerebello-thalaocotical pathway. Experimential. (1967): 22: 332-332.

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

Wauquier, A.; Melis, W.; Desmedt, L.K.C.; Sadowski, B. Self stimulation in dogs: behavioral effects of anterior basal forebrain, amygdala and lateral hypothalamus implanatations. In Brain Stimulation Record. Edited by A Wauquier, ET Rolls. Amsterdam, North-Holland: (1976): 427-430. White, L.E.; Price, J.L. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. I. Patterns of 14C-2-deoxyglucose uptake and Fos immunocytochemistry. J. Neurosci. (1993): 13: 4787-4809.

White, L.E.; Price, J.L.. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. II. The effects of focal deactivation. J. Neurosci. (1993): 13: 4810-4830.

13. LISTA DE ABREVIATURAS.

Am	Amígdala				
ACh	Acetilcolina				
DA	Dopamina				
C/S	Ciclos por segundo				
EE	Estatus epileptucus				
EEG	Electroencefalograma				
GABA	Acido gamma aminobutirico				
Glu	Glutamato				
ND	Núcleo dentado				
NI	Núcleo interpósitus				
LICE	Liga internacional contra la epilepsia				
NA	Noradrenalina				
SNC	Sistema Nervioso Central				
PD	Posdescarga				
5-HT	Serotonina				

Provided for non-commercial research and education use. Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.eisevier.com/copyright

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin



journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbulf

Research report

Effects of kainic acid lesions of the cerebellar interpositus and dentate nuclei on amygdaloid kindling in rats

Carmen Rubio^{a.b}, Verónica Custodio^a, Edith González^a, Socorro Retana-Márquez^b, Marisol López^h, Carlos Paz^{a.*}

* instituto Nacional De Neurologia Y Neurocirugía M. V. S. Insurgentes sur 3877 col. La faina, Mexico 14269, D.F., Mexico "Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

ARTICLE INFO

Arcicle history: Received 24 June 2010 Received in revised form 4 February 2011 Accepted 7 February 2011 Available online 16 February 2011

Keywords: Kindling Cerebellum Dentate nucleus Interpositus nucleus Kainic acid

ABSTRACT

Some neurophysiological studies suggest that the cerebellum could participate in epileptic activity. Therefore, to study the participation of the main efferent projections from the cerebellum to the forebrain, we injected small doses of kainic acid (KA) into the deep cerebellar nuclei to selectively injure neighboring cells while avoiding fiber lesions. Unnijured fibers were confirmed using histological findings and by assessing the number of cells in the main cerebellar afferents, compared with controls. Under such conditions, we found that dentate and interpositos nuclei lesions interfere with seizure expression, both at early kindling acquisition and at the kindled stage. We hypothesize that the cerebellar effect on epilepsy drives skeletal motor responses, mainly in generalized seizures when the thalamus and neocortex are affected.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Some neurophysiological studies suggest that the cerebellum could participate in epileptic activity. Total cerebellectomy, including the deep cerebellar nuclei, increases seizure length in kindled cats, compared with control animals [25]. Electrical stimulation of the cerebellar cortex facilitates the occurrence of seizures induced in the cobalt model of epilepsy [3]. Epileptic activity is also inhibited after dentate nucleus (DN) stimulation in patients with epilepsy that is refractory to conventional antiepileptic therapy [8,28,33]. However, some controversial results have been obtained in rats with lesions of the deep cerebellar nuclei using different experimental models of epilepsy. It is known that complete lesions of the DN shorten the onset of each kindling stage described by Racine [27], while complete lesions of the interpositus nucleus (IN) do not show differences compared to controls [20]. Lesions of the DN reduce the electrographic after-discharge (AD) activity induced by the kindling stimulation [34]. However, the electrical stimulation of the DN also reduces the electrographic spikes produced by cortical penicillin-induced epileptic activity [15], while electrical stimulation of the IN increases the number of spikes produced by cobalt-induced epileptic activity [11]. Lesions or stimulation of the brachium conjuntivum (through which both DN and IN efferent

0361 -9230/S \sim see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.brainresbuil.2011.02.003

fibers pass on the way to the forebrain) significantly reduce the AD produced by kindling stimulation [24,29].

It is known that cells within the deep cerebellar nuclei are glutamatergic and aspartatergic [10.21], and such cells are highly responsive to kainic acid (KA), a molecule that is analogous to glutamate [22]. The local application of small doses of KA induces selective injury and apoptosis in neighboring cells without producing fiber lesions [26]. Injections of KA in the DN and IN eliminate most cell bodies [17,2,18], whereas systemic application results in epileptic activity [4]. Based on this evidence, the aim of this study was to determine the epileptic activity that characterizes kindling seizures in rats injected with small doses of KA in the DN and IN.

2. Methods

All animals were handled and treated with suitable measures to minimize pain and discomfort according to the regulations specified by the Animal Care and Use Committee of our Institution and following the standards of the National Institutes of Health of Mexico. Forty male Wistar rats weighing 280–300 g were maintained in controlled environmental conditions (20–23° C and 12h/12h light-dark cycle) and had free access to food and water. The rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotactic frame. They were then injected with varying KA doses into the DN (lateral 3.5 mm, anterior 2.3 mm, and height 4.0 mm) or IN (lateral 2.4 mm, anterior 2.3 mm, and height 4.0 mm) to determine the appropriate lesion size. During surgery, bipolar electrodes were placed in the left basolateral amygdala (lateral 5.0 mm, anterior 6.2 mm, height 1.5 mm) and in the nght sensorymotor cortex. Injections and electrodes were located using the inter-aural line as reference point according to Paxinos and Watson's atlas [23]. Ten rats without DM or IN injections and ten rats injected with saline solurion were used as control and sham groups, respectively, whereas ten rats injected with a single dose of 1.0 µL KA

^{*} Corresponding author. Tel.: +52 55 5606 3822; fax: +52 55 5424 0808. *E-mail oddress:* paztres@servidor.unam.mx (C. Paz).

(5 nM) in the DN and ten rats injected with 0.8 µLKA (5 nM) in the IN were used as experimental groups. Electrodes consisted of a pair of twisted wires (0.005 in in diameter made of stainless steel and, except for the tips, mated with Teffon A screw implanted in the skull served as a reference point. The electrodes were wided to a mini-connector and attached to the cranium with dental actylic. Skin cuts were setured around the mini-connector.

Two days after surgery, the rats were placed in a soundproof chamber (22.5 tm - 30 cm - 30 cm), and their mini-connectors were connected to a polygraph (Grass 78D) using flexible wires to allow freedom of movement. Five minutes of polygraphic recordings were obtained daily until day 10, when the amygdaloid stimulation begin. Dely simulation was applied for 1s using square 60 Hz pulses of 1 ms and 400 μ A. Immediately after each stimulation, the turation of the amygdaloid AD and the number of trials required to reach behavioral stage were scored at ording to Racine's scale [27]. The stages observed were characterized as follows: stage 1: closus of the facial muscles and use or both eyes twitching: stage 2: head nodding; stage 3: forelimb clonus; stage 4: clonus of both forelimbs and rearing; stage 5: tonic-clonic convulsions, rearing and falling.

After ten generalized seizures, the animals were profoundly anesthetized and sacrificed by means of intra-cardiac perfusion with saline solution followed by 5% formatin. The brains were extracted, and cerebellums were frozen and shord in serial sections (40 μ m) to evaluate the lesion extent using the rapid procedure technique [14]. Three other brains from each group of rats were embedded in paraffin, sliced in paragratical sections (7 μ m), and stamed with hematoxylin-eosin. The absence of retrograde cell death after DN and IN lesions and the probable systemic diffusion of KA were evaluated by means of a stereological analysis performed two researchers that were blinded to the treatment groups [13]. Briefly, we choose



Fig. 1. Annygdalnid AD duration prior to stage 5 and throughont 10 subsequent stage 5 services. Control group (black circles), sham group (triangle), group with DN lesions (gray circles), and group with IN lesions (white circles). Values are expressed as means \pm S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by a Tukey test * (p < 0.01).



Fig. 2. Behavioral stages according to Racíne's scale. Control group (black bars), sham group (striped bars), group with DN lesion (gray bars), and group with IN lesion (white bars). Rats injured in the DN and IN required (even trials to reach cach kindling stage when compared with control and sham groups. Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by a Friedman test * (p < 0.01).



Fig. 3. Amygdaloid AD duration assessed for each of the behavioral stages (according to Racine's scale). Control group (black bars), sham group (striped bars), group with DN lesions (gray bars), and group with IN lesions (white bars). After the lesions with KA in DN and IN, the AD duration was shorter from the first behavioral stage onward. Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by a Tukey test * (p < 0.01).

six representative areas from structures that send projections to the DN and IN, as follows: from the lateral hemisphere of the cerebeilum, to test the Purkingcells population [16], from the principal inferior oflye micleus and from the dorsal accessing which send fibers to the DN and IN, respectively [30], and from the pomine nuclei, which send fibers to both the DN and IN [6]. Six other areas from the CA3 hippocampus were chosen to evaluate possible KA systemic diffusion. Therefore, 30 areas for each rait were photographed and analyzed by Image-Pro Plus software. The frame size estimation for the Purking cells and pyramidal cells was 520 µm³, values were expressed as the mean ± standard error.

Significant differences for AD anygdaloid duration and the number of cells in the brain structures were determined by one-way repeated measures of variance (ANOVA). Subsequent comparisons within conditions were made using Tukey's multiple comparison test. The cut-off for the level of significance was p < 0.05. The significance of the number of trials necessary to reach each of the behavioral stages as a comparison between groups was determined using an ANOVA followed by a Eriedman test. The cut-off for the level of significance was p < 0.01.

3. Results

We did not find any general problems with motor coordination. balance or posture after the cerebellar lesions, nor signs of epileptic activity in any of the EEG records obtained prior to the kindling stimulation. Both the duration of the amygdaloid AD with daily stimulation and the number of trials necessary to reach any of the behavioral stages failed to reveal statistical differences between the control and sham groups. Furthermore, we did not find significant differences between the four groups when we compared the AD duration prior to the time required to reach stage 5. However, when we compared the AD duration along ten subsequent amygdaloid stimulations once the rats had achieved stage 5, both DN and IN groups showed significantly shorter Ads, compared with controls (Fig. 1). We found significant differences between groups in the number of trials required to reach each of the behavioral stages (ANOVA); both the ON and IN groups required fewer stimulations to reach each of the behavioral stages, compared with controls (Fig. 2); however, the mean AD duration values (obtained once each group reached each behavioral stage) for the DN and IN groups were always shorter compared to controls (Fig. 3).

Once the polygraphic study was concluded, we found that all rats included in the DN and IN groups displayed a notable absence of cell bodies throughout the cerebellar nuclei. Hematoxylin-eosin staining confirmed the absence of cell bodies and the persistence of fibers in lesion targets, compared with the contralateral DN or IN nuclei (Fig. 4). The absence of retrograde cell death in the pontine nuclei, inferior olive, and cerebellar cortex as a consequence of DN or IN injury was confirmed when no significant number of cell bodies was found, compared with the number of cell bodies in the control groups. Likewise, the probable KA diffusion to the highly kainate-sensitive cells in the CA3 region of the hippocampus was negligible when the number of pyramidal cells from such regions was normalized to the overall cell population (Table 1).

4. Discussion

We did not find any problems with motor coordination or signs of epileptic activity in the EEG recordings after DN or IN lesions with KA. These findings are in agreement with previous work showing that electrolytic lesions of both nuclei do not interfere with motor



Fig. 4. Coronal section of the cerebellum projected onto photographic paper processed using the rapid procedure technique. (a) The interpositus nucleus (1). (b) Dentate nucleus (D). The rectangle shows a sucrophotographic image of a sagutal section stained with benatoxylin-eosin, indicating the presence of fibers on the lesioned side and cell bodies on the non-lesioned side. Kannic acid (K).

activity in rats [7]. Therefore, we predicted that such lesions would not interact with the Racine scale evaluated ten days after the KA injections; a period of time where any motor impairment has been excluded in rats subjected to deep cerebellar lesions [32]. The feasibility of such lesions was confirmed in cytological sections, where the absence of cell bodies and the presence of fibers within the chosen deep cerebeilar nuclei were found. Such results confirm previous findings showing that cell bodies disappear in the DN and IN following KA injections [17,18]. It is known that KA induces damage to cell bodies without disturbing the input, output or passing fibers [9,19]. Such findings were confirmed by our results, where nonsignificant differences in the numbers of cell bodies were found in the cerebellar cortex, pontine nuclei, and inferior olive, compared to the number of cell bodies in the control groups. Moreover, we excluded the possibility that KA diffused systemically, because there was no decrease in the number of hippocampal pyramidal cells, for which KA has a high affinity [5].

Table 1

Number of cells/area (Purkinje cells, pyramidal cells/520 µm², and pontine nuclei cells, inferior obve cells/105 µm²).

	Control	Sham	Dentate nucleus lesion	Interpositus nucleus lesion
Puclame cells	11 ± 1.2	9 - 1.0	7 - 1.2	10 0.73
Pyramidal cells (CA3)	37 - 2.8	44 4 4 8	46 ± 0.8	43 : 8.2
Pontine nuclei cells	33 - 3.1	40 = 7.5	30 ± 3.1	41 : 3.7
Inferior ofive cells	18 ± 3.5	17 = 4 /3	12 1.0	16 · 3.D

Values were expressed a standard error of mean.

Electrical stimulation of the basolateral amygdala induces a permanent local phenomenon characterized by a decreased AD threshold and the development of motor seizures that take place outside of the stimulated structure. It is known that lesions in one amygdala do not affect the number of stimulations required for the development of motor seizures in the contralateral amygdala [34]. The lack of correlation between AD duration and incidence of motor seizures eliminates the AD duration as a possible mechanism for seizure development. We did not find significant changes in the AD duration prior to the kindled stage (stage 5), although the development of motor seizures occurred more quickly in DN and IN groups. There are no direct anatomical connections between the deep cerebellar nuclei and the basolateral amygdala; however, both send efferent connections to the parafascicular and ventromedial thalamic nuclei [1,31]. Therefore, certain thalamic nuclei could drive the skeletal motor response. We also found significant lengthening of the AD in rats with DN or IN lesions, compared with the AD in controls. It is known that, during the early kindling stages (stages 1 and 2), only the stimulated amygdala and its direct projection fields increase ¹⁴C-2-deoxyglucose uptake, whereas during generalized seizures (stage 5), such markers were correlated with nonspecific thalamic nuclei and the neocortex [12]. Previously, we found that cerebellar lesions only showed significant effects once the kindled stage (stage 5) had been established [25,24]. We suggest that the cerebellar effect on epilepsy is to drive skeletal motor responses, mainly in generalized seizures, when the thalamus and neocortex are affected.

Acknowledgements

This study was supported by CONACyT-Mexico Grant 49920-Q.

References

- (1) M.E. Anderson, J.L. DeVito, Exp. Brain Res. 68 (1987) 260-276.
- [2] B.J. Anderson, J.E. Steinmentz, Rev. Neurosci. 5 (1994) 1-23.

- [3] T.L. Babb, A.G. Mitchell, P.H. Crandall, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol 36 (1974) 141–154.
- [4] Y. Hen-Ari, J. Lagowska, E. Tremblay, G. Legal Ia Salle, Brain Res. 163 (1979) 176-179.
- [5] Y. Ben-Ari, E. Tremblay, D. Riche, G. Ghilini, R. Naquet, Neuroscience 6 (1981) 1361–1391.
- [6] P. Brodal, J.G. Bjaahe, Neurosci, Res. 13 (1992) 83-118.
- [7] X.Y. Chen, J.R. Wolpaw, Learn. Mem. 12 (2005) 248-254.
- (8) S. Cooper, I. Anun, M. Riklan, J. Watz, P. Tung, Arch. Neurol. 33 (1976) 559-570.
- [9] T. Coyle, M. Molliver, M. Kuhar, J. Comp. Neurol. 180 (2004) 301–323.
 [10] U. Czubayko, S. Fahad, T. Perer, S. Cornelins, J. Physiol. (2001) 2017–2029.
- [11] R. Dow, A. Fernandez-Guardiola, E. Manni, Electroencephalogr. Clin. Neuro-
- phγsiol. 14 (1962) 383–398.
- [12] J. Engel Jr., L. Wolfons, L. Brown, Ann. Neurol. 3 (1978) 538–544.
- [13] O. Fikrel, E. Odaci, O. Bas, S. Kaplan, Brain Res. 1356 (2010) 95-101,
 [14] C. Guzmán, M. Alcaraz, A. Fernández, Bol. Inst. Estud. Med. biol. 16 (1958)
- 29-31. [15] J.T. Hutton, J.D. Frost, J. Foster, Epilepsia 13 (1972) 401-408.
- [16] M. Ito, The Cerebellum and Neural Control, Raven Press, New York, 1984. 135-148.
- [17] D.8. Katz, J.E. Steinmetz, Learn. Mem. 4 (1997) 88-104.
- [18] D.G. Lavond, T.L. Hembree, R.F. Thompsom, Brain Res. 326 (1985) 179-182.
 [19] P.L. McGeer, E.G. McGeer, T. Hattori, in: E.G. McGeer (Ed.), Kainic Acid a Tool in
- Neurobiology, Raven Press, New York, 1978, pp. 123–138 [20] J.K. Min, A.P. Valennine, T.G. Campbell, Epilepsia 39 (1998) 692–699.
- [20] P.L. Monaghan, A.J. Beitz, A.A. Larson, R.A. Altschuler, J.E. Madi, M.A. Mulelett, Brain Res. 363 (1986) 364–370.
- [22] J. Olney, V. Rhee, L. Ho, Brain Res. 77 (1974) 507-512.
- [23] G. Paxinos, C.H. Watson, The Rat Brain in Sterotaxic Coordinates, Academic Press, New York, 1982.
- [24] C. Paz, F. Gutiérrez-Baeza, B. Bazán, Brain Res. 558 (1991) 90-92.
- [25] C. Paz, E. Reygadas, A. Fernández-Guardiola, Exp. Neurol. 88 (1985) 418-424.
- [26] H. Poilard, S. Charriaut-Marlangue, A. Cantagrel, O. Represa, J. Robain, J. Moreau, Y. Ben Ari, Neuroscience 1 (1994) 7–18.
- [27] R. Racine, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32 (1972) 218-227.
- [28] D. Ross, E.S. Emmonds, Sterotact, Funct, Neurosurg, 58 (1992) 200-208.
- [29] C. Rubio, V. Custodio, F. Juárez, C. Paz. 8rain Res. 1010 (2004) 151-155.
- [30] T.J.H. Ruigrok, J. Voogd, J. Comp. Neurol. 426 (2000) 209-228.
- [31] A.F. Sadikot, V.V. Rymar, Brain Res. Bull. 78 (2009) 122-130.
- [32] J.R. Schmahmann (Ed.), The Cerebelluin and Cognition, Raven Press, San Diego CA, 1997, pp. 402–403.
- [33] M. Sramka, S.A. Chkhenkeli, Sterotact. Funct. Neurosurg. 54-55 (1990) 56-59.
- [34] N. Tsumi, H. Kawasaki, S. Genda, K. Hara, H. Hashiguchi, Y. Hueda, Epilepsia 2 (1992) 213-221.

In Vivo Experimental Models of Epilepsy

Carmen Rubio^{1,2}, Moises Rubio-Osornio¹, Socorro Retana-Márquez², Marisol López², Verónica Custodio¹ and Carlos Paz^{1,*}

¹Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M. V. S. Insurgentes sur 3867 col. La fama México 14269 D.F. Mexico, ²Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San. Rafael Atlixco No 128 col. Vicentina México, 09340 D.F., Mexico

Abstract: This study reviews the different *in vivo* experimental models that have been used for the study of epileptogenesis. In this review we will focus on how to replicate the different models that have led to the study of partial seizures, as well as generalized seizures and the status epilepticus. The main characteristics that participate in the processes that generate and modulate the manifestations of different models of epileptogenesis are described. The development of several models of experimental epilepsy in animals has clearly helped the study of specific brain areas capable of causing convulsions. The experimental models of epilepsy also have helped in the study the mechanisms and actions of epilepsy drugs. In order to develop experimental animal models of cpilepsy, animals are generally chosen according to the kind of epilepsy that can be developed and studied. It is currently known that animal species can have epileptic seizures similar to those in humans. However, it is important to keep in mind that it has not been possible to entirely evaluate all manifestations of human epilepsy. Notwithstanding, these experimental models of epilepsy have allowed a partial understanding of most of the underlying mechanisms of this disease.

Keywords: Epilepsy models, aluminum hydroxide, kainic acid, kindling, electroshock seizure, penicillin, bicuculline, GABA, tetanic toxin, pilocarpine.

INTRODUCTION

Epilepsy is a chronic neurological disorder which is characterized by the recurrent appearance of spontaneous scizures. When addressing the mechanisms of epilepsy and the neural consequences of epileptic neuronal activity, epileptic seizures are generally classified into foeal (partial) and generatized [1]. This disease has a multifactored etiology and is the result of abnormal synchronical discharges in a group of neurons [2], which are produced by a deviant dynamism of neuronal networks. People who suffer this disease may have changes in their consciousness and motor abilities, among other things; also, due to the repetition of the seizures, neuropathological changes also take place, mainly in the hippocampus (Hp) [3] (Fig. 1). Research on experimental models of this disease have helped us to discover the most common physiopathological routes, and have led us to believe that there is an imbalance in the Central Nervous System between the inhibitory GABAergic and excitatory glutamenergic neurotransmission (Figs. 2 and 3). We also know that activation of glutamate receptors specifically N-metyl-D-aspartate (rNMDA), alpha amino-2,3-dihydroisoxazolepropanoic-5methyl-3-oxo-4 acid (AMPA), a-kainate receptors and gamma-aminobutiric acid receptors (rGABA_A and rGABA_B) are also involved [4]. Some studies also suggest that ion channels, in particular calcium (Ca^{2+}), sodium (Na^{+}) and potassium (K^{+}) channels, are involved in epilepsy [5].

The incidence of epilepsy is over 1% of the total population. Worldwide, around 30% of patients do not respond to conventional drug treatments [6]. Consequently, several experimental models have been developed in which epileptic activity is simulated, and different treatments are tested to explain the neurochemical, neurophysiological, cellular and molecular mechanisms that control epileptic seizures. In addition, studies on these models have also been useful in the search for similarities of the mechanisms in human epilepsy. The different animal models can be classified as those induced by chemical convulsing agents, such as penicillin and cobalt, among others; models by electrical stimulation, such as kindling and electroshock, and genetic models, such as audiogenic seizures or the Papio papio baboon model [7]. These models have attempted to accurately explain the mechanisms that underlie this disease; however, the reason behind the existence of so many different types of epilepsy has not yet been found. In 1989, Fisher proposed an epileptogenic classification of models, which is similar to the classification used in patients: partial epilepsy, tonic-clonic convulsions, and status epilepticus (SE) [7]. According to this classification, this review includes the main models of in vivo epileptogenesis currently known. Classification of epilepsy models according to Fisher [7], as amended for this review, refers exclusively to in vivo models:

ANIMAL MODELS OF CONVULSIVE SEIZURES, INTERNA-TIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE)

Simple Partial Seizure Models.

Contically Implanted Metals

1871-5249/10 \$55.00+.00

^{*}Address correspondence to this author at the Departamento de Neurofisiulogía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugia M.V.S., Insurgentes Sur 3877, México 14269 D.F., Mexico, Fax (55) 54240808; E-mail: paztres@servidor unam mx

Aluminum, Cobah, Zine



ALUMINUM HYDROXIDE MODEL

The first report on aluminum (Al) and epileptic scizures was documented by Kopeloff and collaborators in 1942 [8], who observed that the application of alumina cream to the cerebral cortex of experimental animals resulted in the development of convulsive seizures. Later, Kopeloff and his group described a model of epileptogenesis [9], using aluminum hydroxide Al (OH)₁. This was classified within the models of simple partial seizures, of the focal type [10]. Application of 100 µL of a 3-5 % solution of Al (OH)₅ on the cerebral cortex (Cx), causes recurring seizures after 2 months. Applying alumina cream on the motor cortex of cats produced similar effects, showing that it can produce convulsions when applied directly [11]. In a study in which Al gel (30-40 ul) was applied on the sensorimotor cortex, animals displayed convulsive seizures in a spontaneous manner, and this was observed for 70 days after the application of aluminum [11, 12]. Al is an option when studying focal experimental epilepsy, but when applied on the temporal lobe of monkeys, it can simulate a temporal lobe crisis similar to what is seen in humans [13]. Reports indicate that this model can produce an important loss of the neuronal dendrites in the epileptic focus, as well as gliosis [14, 15], therefore, an increase in the number of glial connections [16]. Along with the collular changes produced by this model, there is a lower number of GABAergic neurons [17] and a drop in the number of positive terminals for glutamate decarboxylase (GAD)



Fig. (1). The epileptic stimuli can directly activate interneurons, bipolar cells and basket, and these may inhibit projection cells. Also, the neurons projection can activate excitatory interneurons, which in turn act over projection neurons. Thus, changes in the function of one or more cells in a circuit can significantly affect neighboring or distant neurons. Other changes include formation of new synaptic connections as axons sprout. This sprouting of excitatory axons that establish many connections may result in an increase of the excitability of neurons necessary to produce repeated firing in the granule cells, characteristic of cpileptic seizures.



Fig. (2). The subtypes of ionotropic glutamate receptors are AMPA kainite and NMDA. The activation of these receptors allows influx of ions. They differ from each other by eation permeability and by their different sensitivity to pharmacological agonists/antagonists of glutamate. All of glutamate ionotropic receptors are permeable to Na⁺ and K⁺, and is the influx of Na⁺ and K⁺ exit through these channels what occurs in the cell membrane depolarization and action potential generation. NMDA receptors also facilitate the conductance Ca^{2^+} which is blocked by ion Mg^{2^+} in the resting state of the cell membrane, although conditions of depolarization, the Mg^{2^+} is displaced and the channel becomes permeable to Ca^{2^+} influx. Finally ion fends to depolarize the cell as a factor that apparently contributes to neuronal damage induced by Ca^{2^+} , in activation conditions neuronal excessive as that produced by epilepsy.

around the epileptic focus [18]. This model has been used in research for epilepsy drugs, such as diphenylhidantoine and pentobarbital, where these drugs have shown an antiepileptic effect [19].

COBALT MODEL

This model was developed by Bonvallet [20]. This partial crisis model is induced with the application of cobalt (Co) powder or wire on the motor cortex, and the thalamus of rats [21, 22] and cats [23, 24]. Co powder is reportedly applied in high doses, resulting in the chronic status epilepticus (SE) model [20, 25]. When it is applied on the motor cortex of rats (25 ing), it creates a similar response to that observed in patients with SE [26]. Epileptiform activity spreads, and the first tonic-clonic crisis takes place during the first 15 minutes after application. Spike activity is present in the electroencephalogram (EEG), approximately 45 minutes after the application [27]. When experimental animals display SE, they become very resistant to anticonvulsant therapy. It has also been observed that animals that survive SE take 3 to 5 days to return to pre-seizure activity. The administration of Co has the advantage of producing chronic epileptic seizures [23, 28]. In 1986 Crain and his collaborators showed that synthesis of GABA and the enzyme GAD were inhibited during seizures caused by Co [29]. The ability of axonal regeneration of GABAergic neurons seems to be involved in the recovery of GABAergic function, which occurs during the extinction of the epileptic syndrome [30]. Twenty days after application of Co there was an important loss of neurons in region CA1 of the Hp [31], whereas other regions of the Hp, such as the dentate gyrus were found in good condition [32]. The region surrounding neocortical application of Co showed necrosis that was not evident in the contralateral Cx. Co exposure induced spontaneous, ictal-like discharges originating from the CA3 area. These discharges were suppressed by conventional anticonvulsants, [33, 34]. Administration of dopamine also suppressed epileptiform spikes in the Cx [35]. It has been reported that gap junction blockers or an increase in extracellular Ca²⁺ is associated with overall hyper-excitability or the impairment of GABAergic inhibition in the CA3 circuit [36]. Another mechanism proposed for Co to be an epileptic is that it crosses the cell membrane and modifies the Ca²⁺ of the glutamate permeable NMDA channel receptor [5].

ZINC MODEL

Elevated concentrations of zinc (Zn²⁺) (>100 mM) may contribute to neuronal cell death during, scizures, [37] Seizures produced by the intracerebral injection of zinc sulphate (ZnSO₄) have proven that it is a convulsant capable of inducing an experimental model of chronic epilepsy; when 600 pg/kg of ZnSO4 are applied via intracerebral injection to cxperimental animals, typical clonic seizures are observed [38]. Initially, slight clonic seizures are produced in the contralateral ear muscle, in the eyes and face, with mastication-type movements; then tonic and clonic seizures occur in the muscles of the neck and of the front legs [39]. The latter were slightly extended, the animals stood up, and then the general seizures began [40]. There is also evidence that seizures caused by Zn can display SE [41]. Studies have shown that certain subsets of GABAA receptors in the Hp can be blocked by Zn2+. The most important changes are in the supragranular layer of the dentate gyrus, sprouted mossy fiber synaptic terminals with large amounts of releasable Zn²⁺ are



Fig. (3). GABA_A receptors are permeable to Cl⁺ ions, as a result of activation. Influx of Cl-hyperpolarizes the membrane and inhibits the action potential. Based on the foregoing, the substances that are GABA_A receptor agonists, such as barbiturates and benzodiazepines, suppress seizure activity. GABA_B receptors are coupled to second messenger systems stead of Cl-channels, and due to its location induce a reduction in presynaptic release of transmitters. Second messenger systems often result in opening of K⁺ channels, inducing a hyperpolarizing current. In different models some GABA_B receptor agonists exacerbate hyperexcitability and seizures.

observed [43]. Research suggests that the release of Zn^{2*} from these sprouted mossy fiber terminals could modify seizures, reducing the inhibition of hippocampal circuits. Pharmacological study results suggest that Zn^{2*} released from the mossy fiber pathway do not reach a concentration at postsynaptic GABAA receptors [42]. Zn^{2*} has been found to modulate the response of many ligand- and voltage-gated ion channels, including both GABA receptors and NMDA, AMPA and kainate-type glutamate receptors. The findings raise the possibility that Zn^{2*} in the corticostriatal projections might play a role in the selective, possibly excitotoxic, cell death of GABAergie projections [44].

KAINIC ACID MODEL

In 1970, Shinozaki and Konishi showed that kainic acid (KA) had a potent excitatory effect on rat cortical neurons [45] because it is a potent analogue of glutamate [46]. KA has been applied directly to a variety of structures including: the amygdaia (Am) [47], Hp [48], striatum [49], and substantia nigra [50], or has been injected intraventricularly [51]. In all cases, it triggered cpileptic seizures. KA induces progressive limbic seizures mimicking human temporal lobe epilepsy [52, 53]. There is extensive brain damage with the application of KA [54]. This model is used to induce chronic or acute epilepsy by injection of 4 mg/kg to 15 mg/kg. The Hp is especially vulnerable to the effects of KA [55, 56] because most of the receptors to KA exist in the CA3 layer of the Hp [57]. At the culmination of the SE there is neuronal death and an inflammatory reaction in areas of the Hp and dentate gyrus [46]. EEG activity is basically characterized by focal seizures that originate in the limbic system. In addition, when seizures are induced in the rat forebrain, there are changes in the distribution and levels of the neuropeptide Y, its receptor subtypes, and their mRNAs [58]. Tanaka described the development of spontaneous recurrent seizures 30 days after administering KA into the dorsal Hp of the cat [59]. It has been hypothesized that, intra-hippocampal injections of KA could be responsible for the recruitment of structures such as the Am where chronic foci develop [60]. This model has also helped in the study of the reorganization of mossy fibers of the Hp that play a crucial role in neurogenesis [46]. Another suggested mechanism through which KA participates in seizures is that there is a decrease in mRNA of the GABA_B receptors in the Hp and a decrease in mRNA of the GABA_B in granular cells of Hp [61].

KINDLING MODEL

In 1961, Delgado and Sevillano observed that repeated electrical stimulation of the cat Hp resulted in seizure activity [62]. Studies by Goddard showed that repeated lowintensity electric stimuli, applied on several subcortical areas of the rat's brain could also induce enileptic scizures. The progressive changes that derived from this stimulation were defined as the kindling effect [63]. These studies showed that the results of one electric stimulation per day increased in complexity with each repetition. Some subcortical areas also proved to be more susceptible to generalized seizures. The kindling technique may be employed on a wide variety of species, such as, dogs [64] rabbits [65], cats [66], and monkeys [63, 67]. In rats, the areas most susceptible to kindling are: the anterior neocortex, the olfactory bulb, the preoptic area, the piriform cortex, the Am, the entorhinal cortex, the Hp, the septal area and some areas of the thalamus [63]. Within the limbic system, the most susceptible area was the Am, since the number of stimulations needed to induce a generalized seizure was significantly lower in this area than in other stimulated subcortical areas. When the dorsal neocortex, some areas of the thalamus, the mesencephalic reticular formation, the red nucleus, the sustancia nigra and the cerebellum were stimulated, no generalized scizures were produced. Partial and generalized seizures can be studied with daily application of electrical stimuli, with an intensity of 200 to 500 µA in limbic structures, which cause more and more complex electroencephalographic and behavioral activity. After 15 to 25 stimulations, the duration of epileptic activities, called afterdischarge (AD) is recorded in the entire brain, and a generalized tonic-clonic behavior takes place [63]. Racine [68], characterized the behavioral response in the kindling model into five progressive and cumulative behavioral states, the first of which refers to facial movements such as blinking or mastication movements; the second state is characterized by oscillatory movements of the head, the third state is defined by mioclonic movements of the forclimbs (first contralaterally, then bilaterally), the fourth behavioral state is characterized by erection of the body and standing on hinds legs, and in the fifth behavioral state, generalized tonic-clonic seizures are produced and there is a loss of posture. Each state includes the behaviors of its preceding state. The changes described are long term and can be permanent [68]. One of the advantages that EEG registration provides during the different states of kindling is that the experimental animals show an evolution and a generalized morphologic change similar to those present in human patients with secondary generalized partial seizures [69]. Another important advantage of this model is that, due to the electrical stimulations, the possible collateral effects of chemical models can be controlled.

Changes that occur in the development of kindling, suggest that excessive neuronal activation, such as in convulsions, reorganize the brain by the immediate activation of glutamate receptors, second messengers, transcription factors, neurotrophic factors, neurogenesis, synaptogenesis, and protein synthesis [70]. In general terms, it has been proposed that stimulation in the normal limbic brain site produces an increase of glutamate and GABA release from presynaptic terminals into the synaptic cleft. Glutamate stimulates postsynaptic AMPA receptors, but this depolarization is immediately reduced by GABAA receptor-mediated recurrent inhibition. The activation of AMPA and particularly NMDA receptors triggers intracellular cascades that lead to functional changes and eventual synaptic reorganization in both glutamate and GABA systems. Over the course of kindling, the failure of GABA-mediated inhibition becomes more frequent in several brain sites, including the hippocampal CA1 region and the Am [70]. There are also morphological changes such as aberrant mossy fibers sprouting onto the dentate granule cell and CA3 pyramidal cell dendrites [71]. This model has helped to study the effectiveness of different antiepileptic drugs [72, 73], as well as cerebral structures associated to epileptic activity [74, 75].

ELECTROSHOCK SEIZURE MODEL

Electrical stimulation of the brain by placing electrodes on the cornea or ears has been used to induce motor convulsions that depend on the intensity of the stimulation. Tonicclonic convulsions are produced by high electroshock currents, between 25 mA to 150 mA and 50 Hz with duration of 2 ms [76, 77]. The intensity used depends on the animal, for example, in mice, a 45 mA current applied through a corneal electrode for 0.2 s, as described elsewhere, is sufficient to produce a convulsive crisis [78]. Electrical stimulation current strengths tend to vary [79]. Large portions of the brain arc stimulated with electroshock stimulation, causing generalized neural discharges [80]. Daily repetitive low current electroshock stimulation on a daily basis induces limbic kindling; evidence shows that responses are produced mainly in granule cells of the Hp, and also in the neocortex and pyriform cortex [81]. Also, electroshoek-induced behavioral changes persist for at least 28 days [82]. Microinjection of GABA has an anti-convulsive effect in rats with seizures induced by electroshock [83]. This model has also helped

discover fenitoin, which reduced epileptic activity by 50% [84]. Different antiepileptic drugs were later tested using this model, such as carbamazepine and valproic acid [85, 86]. Lamotrigin and oxcarbazepine inhibited seizures by 50% in this model [87].

PENTYLENTETRAZOL MODEL

The Pentylentetrazol (PTZ) model for induction of epilepsy is considered to be similar to primary tonic-clonic generalized epilepsy in humans [88]. A 0.85% solution of PTZ in a volume of 0.01 ml/g body weight is administered by intracerebral injection [89], or it can also be intraperitonially injected, in doses from 20 to 300 mg/kg. Mice are then observed for the presence or absence of a minimal clonic seizure of the forelimbs or vibrissae [90]. Episodes in each animal can be short, lasting 3-5 seconds. PTZ induced epilepsy is known to be generated and spread mainly through the Hp [91]. It has recently been reported that in rats treated with PTZ, there is an increase of axonal growth in the internal portion of the CA3 layer of the Hp [92]. It has also been reported that one the mechanisms that underlie epilepsy produced by PTZ, is increase of voltage in the voltage-gated potassium channel [93]. There is also a known relationship between the imbalance of the inhibitory and excitatory neurotransmission systems, and in the long run, a loss of inhibition mediated by GABA [94]. Specifically, PTZ blocks the GABA_A receptor [95]. It is considered a GABA selective agonist [96]. It is known that the expression of NMDA receptors undergoes subunit- and region-related changes in kindled seizures of rats induced by PTZ [97]. Carbamazepine is effective in inhibiting PTZ induced seizures [98, 99]. Also, fenitoine and pentobarital have proven to have suppressing effects on the model [100, 101].

MODEL OF EPILEPTOGENESIS WITH FLURO-THYL

This is a gas that causes seizure activity in adult animals; the severity is dosage dependent, and can reach SE [102]. In adult rats, it has been proven that SE can be induced when they breathe in this gas through a fan using air bubbles with a mixture of water: flurothy] 4:1 [102]. Brief exposures to this gas result in clonic seizures, followed by tonic-clonic convulsions. Changes in behavior and the manifestations of the convulsions induced by flurothyl are age specific. Young rats present facial clonic seizures and forelimb clonus that progresses quickly to tonic-clonic seizures, and tonic flexing of all four legs, followed by a prolonged clonus, with a shorter latency at the start of the seizure, in comparison to adults [103]. Given that older rats are more susceptible to flurothyl-induced seizures, it is unknown whether younger rats are more resistant to seizures caused by brain damage [103]. Flurothyl quickly produces convulsive seizures, because it is a powerful stimulant of the Central Nervous System. Although flurothyl's convulsive action mechanism is unknown, it seems to aet on the proteins and lipid layers of the synaptic membrane. Its effect is suggested as a result of an alteration in the synaptic transmission at a presynaptic, and even a postsynaptic, level [104]. Hypertension induced by flurothyl triggers convulsive activity. It has been described that minutes after flurothyl inhalation, there are changes in the EEG that show broadly spread, irreparable

neural damage caused mainly by the induction of SE. In animals, there are high frequency and high amplitude periods of spike activity [103]. The cerebral cortex, the Hp, the Am, the thalamus, basal ganglia, and the mesencephalus are the most vulnerable to damage caused by this gas. Among the most vulnerable areas of the Hp are the CA1 layer neurons. since the ones in layer CA3 have been observed to he more resistant. Other hypotheses on the action of flurothyl indicate that it opens sodium channels, inducing convulsive activity [105]. Evidence suggests that GABA, and especially the inhibition of its synthesis, can play a role in presynaptic action. Some reports indicate that in rats prenatally exposed to this gas there is no effect in the growth of the glutaminergic synapses [106]. One of the molecular mechanisms that have been proposed for this model, is that there is an increase in the messenger of the gene for early expression c-Fos in the Cx in the Hp, specifically in CA1 y CA3 and in the Am. [107].

PENICILLIN MODEL

This model was first described by Walker [108]. Among the models of partial epilepsy induced by chemical agents, this is the most commonly used, and it can produce mioclonic seizures [109, 110]. Although it is actually considered a model of partial epilepsy that can seem similar to partial seizures in patients [11, 112], it was described as the epileptiform activity of recurring spikes when first applied on the Cx in a dose from 1.7 to 3.4 nM [113, 114]. It is also known as the generalized penicillin model of the cat [115, 116]. Injecting penicillin in rats induces a unique pattern of focal epilepsy [117]. The amount of penicillin required to reach an epileptic state is higher in rats than that required in cats, according to Prince and Farrell [115], who showed that injecting large doses of penicillin (from 300.000 to 500.000 units) produces synchronic, bilateral discharges, 30 to 60 minutes later. Cortical peaks have also been observed, with a brief increase in a non-synchronized manner [118]. A delay spontaneously arises in the subcortical structures [119]. One advantage of penicillin-induced epilepsy model is that there are several ways to apply penicillin. Depending on the model one wants to induce, the administration of penicillin can be intraperitoneal, intramuscular, intravenous or intracortical. The intraperitoneal application-induced model is known in the literature as the multifocal model (centrencephalic, including Cx, Hp and Am), while the intracortical applicationinduced model is predominantly known as cortical [120]. Applying penicillin directly on the Cx blocks the GABAergie inhibitory system, causing an important loss of these neurons [121-123]. Also reported is the relation hetween the doses of penicillin used and the loss of Hp neurons [124]. The number of neurons of the layer of granular cells of the dentate gyrus is also reduced due to the effects of injecting intracortical penicillin [125]. Penicillin induces mossy fiber sprouting [126]. Penicillin is a seizure induction model that can be a good option to use in studies that investigate systemic spreading of the seizure [127]. This model has also been used to elucidate mechanisms that involve the cerebellum in the epileptic phenomenon [128].

BICUCULLINE MODEL

This model was originally described by Curtis [129]. Bicuculine is a putative blocker of GABA. As an antagonist of the action of this neurotransmitter [130, 131], bicuculline produces acute focus epileptie convulsions when administered systematically or when applied topically to the Cx of rats. Its administration as a subcutaneous injection of 2.70 mg/kg produces clonical effects between 15 and 30 minutes after being administered [132, 133]. Or 0.4-0.8 mg/kg i.v. produce a typical tonic-clonic generalized convulsive seizure with severe post-ictal depressions in several brain structures including the frontal and occipital cortex, less than I min after the injection [134]. An observation of this model is that it has no specific effects when administered at high doses [135], yet SE of this model is dose dependent. Results have shown that even hours after SE induced by bicuculline in rats with plenty of air and oxygen, an extensive edema is present in the astrocytes of the Cx [136]. Among the mechanisms that underlie the effects produced by bicuculline is the spread of Ca2 + and the blockage of K+ channels [137]. The hypothesis is that epilepsy is being caused by the disinhibition of neurons [138]. Although the action mechanisms of this chemical convulsant are partially understood, it has also been used to test anticonvulsant drugs [139]. Morphological examination of frontal forebrain sections with light microscopy revealed a widespread damage to the Am, olfactory cortex, substantia nigra, thalamus, Hp and neocortex [140].

GABA ABSTINENCE MODEL

This model was originally described by Snead [141, 142] and is a focal epilepsy model; which can be induced by injecting GABA in the motor cortex [143-145]. It is known that animals receiving chronic treatment with this amino acid, and then had it removed; display an electrocorticographic activity pattern of epilepsy [143]. In this model, peaks of activity are displayed in the waves of the EEG, from 200 to 700 μ V, with frequencies from .05 to 3 cycles per second in the motor cortex, followed by mioclonic automatisms of the fore and hind limbs [146]. According to previous descriptions, increases in the concentration of glutamate antagonists are accompanied by neurotoxic effects [147].

TETANIC TOXIN MODEL

fctanic toxin is synthesized by the Clostridium tetani hacillus and is internalized by the neurons in a ganglioside [148]. Tetanic toxin was first used to create chronic cpileptiform events in 1962; it was applied to the Cx in dogs [149]. It has been well known for over a century that totanic toxin causes epilepsy [150]. Tetanus toxin can be successfully applied to different structures to produce epilepsy [151, 152]. A small dose of tetanic toxin injected into the brain of experimental animals causes changes in brain function. Approximately one month after the administration on the Cx, spike-wave activity is observed, with an activity of 3-20 Hz, in the EEG [153]. Seizures are dose dependant and are characterized by myoclonic movements of the forelimbs [154]. Up to 100 seizures can be produced per day, and the number drops several months after the administration of the toxin [155]. Studies suggest that the toxin interferes with the presynaptic release of inhibiting neurotransmitters [156]. The administration of tetanic toxin in the Hp produces seizures related to blackouts [157], which are considered a chronic condition of epilepsy [158]. Among the mechanisms that underlie this model, it is reported that the presence of axons

in the outer molecular layer of the dentate gyrus could indicate the reincrvation of the sites in the dendrites of the granular cells, causing immature synapses [159], as well as cellular loss in the dentate gyrus [160]. The tetanic toxin model induces chronic partial seizures in the rat Hp [161]. This model of epilepsy shares many characteristics with human clinical epilepsies that have a focal origin. A suggested action mechanism of the toxin consists of the blockage of exocytosis [162, 163]. Tetanic toxin shows certain selectivity in blocking the release of inhibitory neurons [164]. The main action of tetanic toxin after intrahippocampal injection is the disinhibition of the GABAergic function [165]. This disinhibition reaches its peak 2 weeks after the injection of the toxin. However, seizure symptoms persist for 6 to 8 weeks [166]. In cats, the toxin induces prolonged convulsions, which have been treated with carbamazepine and there is no complete remission of the seizure [167]. The prolonged convulsion that lasts over a year in rats, due to injections in the cerebral cortex also leads to epilepsy and abnormal activity in these animals for at least 9 months [157].

AUDIOGENIC SEIZURE MODEL

The susceptibility of micc to the audiogenic seizure model has been known for quite a considerable amount of time and it was originally described by Smith [168]. Seizures are induced by 102 ± 131 dB [169]. This type of scizure has a characteristic tonic flexion and loss of the tonic extension as a consequence of high-intensity sound stimulation [170]. These animals generally also display a post-ictal state of exploration [171]. Audiogenic convulsions are of a generalized sort [1]. A second category of seizures for this model are partial epilepsies that include those of the temporal lobe [7]. In mice it has been proven that after exposure, on postnatal day 14, to the sound of a fire alarm bell, there are uncontrollable seizure episodes that end in tonic-clonie convulsions. The origin of this convulsive activity seems to be the inferior colliculi, which is an area of primary transformation of auditive stimuli [172, 173]. However, there is controversy regarding the origin of the erisis [174]. The induction of the audiogenic model depends on the contralateral afferents at the level of the inferior colliculus. After unilateral lesion of the inferior colliculus, audiogenic convulsions continue to occur [175]. Subcortical areas are also implicated, such as the locus coeruleus and the periacueduetal gray matter [176, 177]. In audiogenic seizures, ion channels play an important role in the control of inferior colliculus neuronal excitability. and their involvement in the development of inherited seizure susceptibility is not yet fully understood [178, 179]. There is evidence that the high threshold current for voltagegated Ca2' channels is markedly increased in inferior colliculus neurons in genetic epilepsy. Such increase of Ca^{2+} currents is suggestive of a massive Ca^{2+} influx resulting in abnormal levels of eytosolic Ca^{2+} and a disturbance of Ca^{2+} homeostasis, which in turn, can alter Ca2+ induced Ca2+ release from intracellular stores and deregulate Ca2+-dependent mechanisms including K⁺ channels [180]. Ion channel abnormalities were reported in the Hp in genetic epilepsy; this brain site is not implicated in the initiation of reflex audiogenic seizures [179]. Susceptibility to inherit audiogenic seizures has been examined in mice with a predisposition to audiogenic convulsions [181]. The finding was that there is a

trend for these mice to present this type of crisis; therefore, we can say that the presentation of audiogenic seizures is influenced to an important degree by heredity [182]. It has also been reported that different strains of mice, such as Sprague Dawley, are susceptible to this type of seizure [183].

PHOTO-SENSITIVE BABOON MODEL (PAPIO PAPIO)

The Senegalese Papio papio baboons show a genetic disposition for photo-sensitive epileptic seizures, the responses to which are tonic-clonic convulsions during stroboscopic stimulation [184]. This is considered a model of generalized seizures, when stimulated with 25 Hz and 20 to 30-second responses [185]. Depending on the level of sensitivity of the seizures in Papio papio, they can display paroxysmal discharges of a generalized mioclonic type, which extend to occipital and fronto-central regions of both hemispheres [186]. This behavior is associated with the paroxysmal discharges in the form of spike-wave and polispike activity that is expressed in an intense and early manner in the frontalcentral region of both cerebral hemispheres [183]. Pharmacological experiments in these animals show that all drugs that interfere with GABAergie synaptic transmission facilitate photosensitivity, while those that favor GABAergic activity have anticonvulsant effects [145]. Drugs such as barbiturates, benzodiazepines and sodium valproate have been tested in this model, and found to inhibit seizures in these primates [187]. Antagonists of excitatory amino acids have also been known to interrupt epileptic seizures [188].

PILOCARPINE MODEL

Pilocarpine hydrochloride is an agonist of muscarinic Ach receptors expressed in the Hp, and is known to produce seizures by increasing the activation of these receptors [189]. Pilocarpine, in doses of 320 to 380 mg/kg dissolved in a physiologic saline solution, is injected i.p. for 30 minutes, after which damage becomes evident in the limbic system [190]. High doses of pilocarpine (above to 380 mg/kg) induce SE when administered systemically [191]. Pilocarpine administration also generates an imbalance between inhibition and excitation transmission [192]. With dosages of 320 to 380 mg/kg, animals show behavioral changes such as a fixed gaze, oscillation of the head, abnormal mouth movements and salivation. Once administered, these episodes last up to 45 minutes. Isolated motor seizures occur every 5 to 15 minutes after behavioral changes and progress into SE 1 to 2 hours after injection [190]. Changes in electrographie activity are observed first in the Hp, second in the Am and third in the Cx [190]. Additionally, EEG activity was also found in the ventral forebrain [193]. Fifteen to twenty minutes after injection, these changes are characterized by high-voltage spikes, slightly quicker than theta activity, and isolated highvoltage spikes but no electrographic change in the Am or neocortex [190]. The episodes of staring and facial automatisms correspond to the spreading of this activity to the Am and neocortex. Pilocarpine-induced SE results in extensive brain damage similar to what has been observed after administration of KA [54]. Damage of the amygdaloid complex, thalamus, neocortex, Hp, and substantia nigra has also been detected [54, 190]. This model of SE induces damages similar to those occurring in humans with epilepsy in the temporal lobe [194]. The anterior olfactory bulb, and the pyriform, and entorhinal cortex present extreme damage consisting of contracted neuronal cell bodies with swollen edematous neuropil. Most of the damage in the ventral Hp is produced in CA3 and in the dentate hilus. Neocortical cell loss occurs mostly in layer 2 and layer 3, with some cell loss in layer 5 [195]. Moreover, activity of the Na⁺/K⁺ ATPase is also modified in the Hp of pilocarpine-treated animals [196]. The expression of proteins related to rNMDA is also modified in the pilocarpine model of epilepsy [197].

CONCLUSION

In recent years most of the knowledge and therapeutic progress in terms of epilepsy, have mainly come from laboratories and work with animals, mainly rats or mice. The varieties of experimental models of epilepsy have been the experimental basis for antiepileptic and pharmacological treatments. This review described different animal models that have been developed in order to reproduce human epilepsy; some of the most commonly used models, and models that can only be developed in vivo. It is worth mentioning that they differ in their procedures: the electroshock model is developed using electrical stimulation, the kindling model also consists of applying electric stimuli, the difference being the place of administration. The kindling model has the important advantage of being able to study partial and generalized seizures. Within the models that use metals, it is known that the alumina cream model may have been the first experimental model developed to produce chronic epileptogenic foci; however, a number of factors limit its applicability. Hence, the alumina model has become less favored relative to other, more recently developed, techniques such as kindling.

There are also models that induce epilepsy by affinity with receptors, such as in the case of the KA model, or Bicuculine and GABA abstinence. However, they have limitations; for example the production of numerous lesions outside of the injection site. In addition, the overly high susceptibility of temporal lobe structures, limits the use of the KA model.

The baboon model has been scarcely investigated, most likely due to the extensive limitations it has. The seizure model induced by penicillim in the cerebral cortex of experimental animals has been widely studied, and is one of the models that have best described several epilcpsy mechanisms. Currently, models of epilepsy are not only focused on ahnormal electroencephalographic activity, but also on the mechanisms of epilepsy, which affect between 0.5 and 1.0% of the total world population.

REFERENCES

- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (ILAE). Proposal for revised elinical and electroencephalographic classifications of epileptic seizures. *Epilepsia*, 1981, 22, 489-450.
- [2] Brailowsky, S., Silva-Barret, C., Naquet, R. Elementos fisiopatolngicos de las epilepsias, aportes recientes de la investigación experimental. Salud Mental, 1989, 12, 53-62.
- Meldrum, B.S., Corselhs, J.A.N. Greenfield's Neuropathology, 1984, 921-950, New York: John Wiley.
- McNamara, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. J. Neurosci., 1994, 14, 3413-3425

- [5] Borbély, S. Dobó, E.; Czége, D.; Molnár, E., Bakos, M., Szues, B. Vincze, A.; Világi, I. Mihály, A. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience*, 2009, 159, 358-368.
- [6] Kwan, P., Brodie, M.J. Refractorie epilepsy, mechanism and solutions Expert Rev. Neurother., 2006, 6, 397-406
- [7] Fisher, R.S. Animal models of the epilepsies Brain Res. Rev. 1989, 14, 245-278
- [8] Kopeloff, I. M., Barrera, S.E., Kopeloff, N. Recurrent convulsive seizures in animal produced by immunological chemical means. *Am. J. Psychiatry*, **1942**, *98*, 881-889.
- Kopeloffs, I. M., Chusid, J.G.; Kopeloffs, N. Epilepsy macacca mulatta after cortical or intracerebro alumina. Arch. Neurol. Psychiatry, 1955, 74, 523-526.
- [10] Ward, R. Topical convulsivant metals *Experimental Model of Epidepsy*, Raven Press, New York, 1972, pp 13-35.
- [11] Velasco, M., Velasco, F., Estrada-Vilanueva F.; Olvera A. Alumina cream induced focal motor epilepsy in cass. *Epilepsia*, 1973, 14, 3-14
- [12] Bostantjopoulou, S.; Katsarou, Z.; Milonas, J., Taskos, N., Logothetis J. Focal experimental epilepsy in rabbits. *Funct. Neurol.*, 1990, 5, 127-33.
- [13] Lockard, J.M.; Congdon, W.C., DuCharme, L. Prophylaxis with diphenylhydantoin and Phenobarbital in alumina-gel monkey model. I. Twelve months of treatment: seizure, EEG, blood and behavioral data. *Epilepsia*, **1976**, *17*, 37-47.
- [14] Jasper, H.H. Application of Experimental Models to Human Epilepsy. Purpura, D.P.; Penry, J.K.; Tower, D.; Woodbury, D.M.; Walters, R. Eds. In. *Experimental Models of Epilepsy*, Raven Press, New York, 1972, pp. 585-602.
- [15] Ward, Jr.; Pope A, Eds. The Bosic Mechanisms of the Epilepsies Little Brown, Boston, 1969, pp. 263-389.
- [16] Harris, A.B., Lockard, J.S. Absence of seizures or mirror foci in experimental epilepsy after excision of alumina and astrogliotie scar *Epilepsia*, 1981, 22, 107-122
- [17] Ribak, C.E. Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci, *Brain Res.*, 1985, 326, 251-260.
- [18] Ribak, C.E.; Harris, A.B.; Vaugha, J.E., Roberts, E. Inhibitory Gabaergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. *Science*, 1979, 205, 211-214
- [19] Lockard, J.S.; Uhlir, V.; DuCharme, L.L.; Farquhar, J.A., Buntsman, B.J. Efficacy of standard anticonvulsants in monkey model with spontaneous motor seizures. *Epilepsia*, **1975**, *16*, 301-317
- [20] Bonvallet, M., Dell, P.; Hugelin, A.J. Projections olfactives, gustatives, visckrales, vagales, visuelles et auditives au niveau des formations grises du cerveau anterieur du chat. J. Physial., 1952, 44, 222-224
- [21] Kopeloffs, L.M. Experimental epilepsy in mouse. Proc. Soc. Exp. Biol., 1960, 104, 500-504
- [22] Craig, C.R.; Colasanti B.R. Reduction of frequency of seizures by carbamazepine during cobalt experimental epilepsy in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behave*, **1992**, *41*, 813-816.
- [23] Dow, R S; Fernandez-Gurdiola, A.; Mauni, E. The production of cobalt experimental epilepsy in the rats *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **1962**, *14*, 339-407.
- [24] Onozuka, M.; Iman, S. Induction of epileptic seizures activity by specific protein from cubalt-induced epileptogenie cortex in rats. *Brain Res.*, 1990, 507, 143-145.
- [25] Treinan, D.M.; Walton, N.Y.; Kendick, C.A.; A progressive sequence of electrographic changes during the generalized convulsive status epilepticus, *Epilepsy Res.*, 1990, 5, 49-63
- [26] Woodbury, D.M. Experimental models of status epilepticus and mechanisms of drug oction. Raven press, New York, pp. 1983, pp. 441-448.
- [27] Walton, N.Y.; Treiman, D.M. Experimental secondary generalized convulsive status epilepticus induced by dl-homocysteine thiolactone. *Epilepsy Res.*, **1988**, *2*, 79-86
- [28] Chusid, J.G.; Kopeloff, L.M. Epileptogenic effects of metal powder implants in motor cortex of monkeys. Int. J. Neuropsychiatry, 1967, 3, 24-28.
- [29] Craig, C.R.; Colasanti, B.K. GABA receptors, lipids, and gangliosides in cobalt epileptic focus. Adv. Neurol., 1986, 44, 379-391.
- [30] Esclaplez, M., Trottier, S. Changes in GABA immunoreactive cell density during focal epilepsy induced by cobalt in the rat. *Exp.* Brain Res., 1989, 76, 369-385

- [31] Tsuda, A.: Sugaya, H.: Obguchi, N., Kishida, E. Sugaya, Protective effects of peony root extract and its components on neuron damage in the hippocampus induced by the enbalt focus epilepsy model *Exp. Neurol.*, 1997, 146, 518-525
- [32] Chang, J.H., Yang, X.F. Zempel, J.M.: Rothmanb, S.M. The unilateral cohalt wire model of neocortical epilepsy, a method of producing subacute focal serzures in rodents. *Epilepsy Res.*, 2004, 61, 153-160.
- [33] Craig, C.R.: Colasanti B.R. Effects of diphenylhydantoin and trimethadione on seizure activity during cobalt experimental epilepsy in the rat *Neuropharmacology*, 1976, 15, 485-489.
- [34] Craig, C.R. Chiu, P. Colasanti B.R. Effects of diphenylhydantoin and trimethadione on seizure activity during cobalt experimental epilepsy in the rat. *Neuropharmacology*, **1976**, *15*, 485-489.
- [35] Farjo, I B : McQueen, J.K. Dopamine agonists and cobalt-induced epilepsy in the rat. Br. J. Pharmacol., 1979, 3, 353-360.
- [36] He, J; Hsiang, H.L., Wu, C.; Mylvagnanam, S.; Carlen, P.L.; Zhang, L. Cellolar mechanisms of cobalt-induced hippocampal epilepitform discharges. *Epilepsia*, 2008, 50, 99-115
- [37] Choi, D.W.; Koh, J.Y. Zinc and brain injury. Annu. Rev. Neurosci., 1998, 21, 347-375
- [38] Purpura, D.P., Penry, J.K., Tower, D.B., Woodbury, D.M.; Walter, R.D., Eds. *Experimental Models of Epilepsy*. Raven press, New York, 1972, pp. 615.
- [39] Yinquan P., Dayao Z.; Jianyi, H.; Longguan, C. Zinc-Induced Seizures A new experimental model of epilepsy. *Epilepsia*, 1983, 24, 169-176
- [40] Pei, Y.Q; Koyama, I. Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia*, 1986, 27, 183-188.
- [41] Thomas, N., Ricciardi, A.; Malouf, T. Differential effects of zinc on hyperpolarizing and depolarizing GABA A synaptic potentials in hippocampal slice cultures. *Brain Res.*, 1995, 680, 80-87.
- [42] Sheng, I., Ke, X; Jin, Z. Seizure-induced brain injury in brain development and Zn²⁺ metastasis in hippocampus. *Prog. Physial. Sci.*, 2006, 37, 331-334.
- [43] Kapur, J. Macdonald R. L. Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn^{2*} sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABA_A receptors. J. Neurosci., 1997, 17, 7532-7540.
- [44] Jens, C.S.; Lutz, S.; Jacob, C., Jens, Z. Zine-containing telencephalic connections to the rat struatum. a combined Fluoro-Gold tracing and histochemical study. *Exp. Brain. Res.*, 1995, 105, 370-382
- [45] Shinozaki, H.; Konishi, S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurons. *Brain Res.*, 1970, 24, 368-371.
- [46] Ben-Ari, Y. Limble setzure and brain damage produced by Kainie acid, mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy *Neuroscience*, 1985, 14, 375-403.
- [47] Cepeda, C.; Tanaka, T.; Riche, D. Limbic status epilepticus: behavior and sleep alterations after intra-amygdaloid kainic acid microinjections in *papio papio* baboons. *Electroencephalagr. Clin. Neurophysiol.*, 1982, 54, 603-613.
- [48] Zaczek, R.; Nelson, M.F.; Coyle, J.T. Effects of anaesthetics and anticonvulsants on the action of kainic acid in the rat hippocampus *Eur. J. Pharmacol.*, 1978, 52, 323-327.
- [49] Pisa, M., Sanberg, P.R., Corcoran, M.E. Spontaneously recurrent serzures after intracerebral injections of kainic acid in rat. a possible model of human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 1980, 200, 482-487.
- [50] Schwarcz, R; Coyle, J T. Neurochemical sequelae of kainate injections in corpus struatum and substantia nigra of the rat. *Life Sci*, 1977, 20, 431-436
- [51] Schwob, J.E., Fuller, T.; Price, J.L. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience*, **1980**, *5*, 991-1014.
- [52] Lotbman, F.W., Collins, R.C.; Ferrendelli, J.A. Kainie Acidinduced limbic seizures, electroencephalographic study. *Neurology*, 1981, 37, 806-812
- [53] Ben-Ari, Y., Cossari, R. Kainate, a double agent that generates seizures, two decades of progress. *Trends Neurosci.*, 2000, 23, 580-587
- [54] Honchar, M.P.; Olney, J.W.; Sherman, W.R. Systemic cholinergic agonist, induce seizures and brain damage. *Science*, 1983, 15, 220-323

- [55] Nalder, J.V., Perry, B.W.; Cotman, C.W. Preferential Vulnerability to Ihppocampus to Intraveniricular Kaunic Acid in McGeree E.G. Kaunic Acid is a Tool in Neurobiology. Raven Press: New York, 1978, pp. 219-237.
- [56] Nalder, J.V.: Cuthberton, G.J. Kainie acid neurotoxicity toward hippocampal formation, dependence of specific excitatory pathway *Brain Res.* 1980, 193, 47-56
- [57] Furtinger, S.; Bettler, B.: Sperk, G. Altered expression of GABA, receptors in the hippocampus after kainic-acid-induced seizures in rats. Brain Res. Mol. Brain Res. 2003, 113, 107-115.
- [58] Vezzani, A., Sperk G.; Colmers, W.F. Neuropepude Y, emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neuro*sci., 1999, 22, 25-30
- [59] Tanaka, f.; Cats, R., Kaijima, M.; Ohgami, S.; Yonemasu Y. Experimental status epilepticus induced by a micro-injection on kainic acid to the dorsal hippocampus in freely moving. *Electroencephalogr. Chm. Neurophysiol.*, 1981, 52, 132-143.
- [60] Cavalheiro, EA, Leite JP., Bortolotto ZA; Turski WA Long-Term effects of kainic acid injection in rats, a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neuro*physiol., 1982, 53, 581-589.
- [61] Sperk, G. Kainic acid seizures in the rat. Prog. Neurobiol., 1994, 42, 1-32.
- [62] Delgado, J.M.R.; Sevillano, M: Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1961, 13,722-733
- [63] Goddard, G.V.; Mcintyre, D.C., Leech, C.K. Permanent ehanges in the brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, **1969**, *25*, 295-330
- [64] Wauquier, A.; Melis, W; Desmedt, I. K.C.; Sadowski, B. Self Stimulation in Dogs: Behavioral Effects of Anterior Basal Forebrain. Amygdala and Lateral Hypothalamus Implanatations. In Brain Stimulation Record Wauquier, A. Rolls, ET., Eds. Amsterdam, North-Holland, 1976, pp. 427-430.
- [65] Tanaka, A. Progressive changes of behavioral and electroencephalographic responses to daily amygdaloid stimulation in rabbits Fukuoka Act. Med., 1972, 63, 152-163.
- [66] Wada, J.A., Sato, M.; Coreoran, M.E. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia*, 1974, 15, 465-478.
- [67] Wada, J.A.; Osawa, T., Mizoguchi, T. Recurrent Spontaneous Seizure State Induced by Prefrontal Kindling in Sengalese Baboons, *papio papio*. In Kindling Wada, J.A. Ed.; New York, Raven Press, **1976**, pp. 173-202.
- [68] Racine, R. Modification of seizure activity by electric stimulation 11, motor seizure Electraencephalogr. Clin. Neurophysial., 1972, 32, 218-227.
- [69] International League against Epilepsy (ILAE). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **1989**, *30*, 389-399.
- [70] Mormoto, K.; Fahnestock M.; Racine, R.J. Kindling and status upiléptieus models of epilepsy, rewiring the brain *Prog. Neuro*biol., 2004, 73, 1-60
- [71] Cavazos, J.E., Golarai, G., Sutula, T.P. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. J. Neurosci., 1991, 11, 2795-2803
- [72] Sugaya, Y.; Seitchiro, J.; Nobumasa, K.; Eiichi, M. Levenracetam inhibits kindling-induced synaptic potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Neurosci. Res.*, 2010, 66, 228-231.
- [73] Fujiwara, A; Watanabe, Y., Takechi, K.; Ishikawa, T.; Kaida, Y.; Aka, M, Kamei, C. The usefulness of olfactory bulb kindling as a model for evaluation of antiepileptics *Epilepsia*, 2010, 57, 445-453
- [74] Tsuru, N., Kawasaki, H.; Genda, S.; Hara, K., Hashiguchi H.; Hueda Y. Effect of unilateral dentate nucleus lesion on armygdaloidal kindling rats. *Epilepsia*, 1992, 2, 213-221.
- [75] Rubio, C.; Custodio, V.; Juárez F.; Paz C. Stimulation of the supenor cerebellar peduncle during the development of any gdaloidal kindling in rats *Brain Res.*, 2004, 1010, 151-155
- [76] Adrian, E.D. The spread of activity in the cerebral cortex. J. Physiol., 1936, 88, 127-161.
- [77] Spleigle, EA Quantitative determination of the convulsive reactivity by electrical stimulation of the hrain whit skull intert J. Lab. Clin. Med., 1937, 22, 1274-1276.

- [78] Manocha, A.; Mediratta, P.K.; Sharma, K.K. Studies on the anticonvulsant effect of U50488H on maximal electroshock seizure in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2003, 76, 111-117
- [79] Swineyard, E.A. Electrically Induced Convulsions, In *Experimental Animals of Epilepsy*, Purpura, D. P. Penty, J. K. Tower, D. Woodbury, D. M.; Walter, R., Eds., Raven Press, New York, 1972, pp 431-435.
- [80] Ditchter, M.A.; Ayala, G.F. Cellular mechanisms of epilepsy, a status report. Science, 1989, 237, 151-158.
- [81] Cole, A.J.; Abu-Shakra, S., Saffen, D.W., Baraban, J.M., Worley P.F. Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures *J. Neurochem.*, 1990, 55, 1920-1927.
- [82] Hidaka, N., Katsuya, S., Bingjin L.: Hiroaki A. Effects of repeated electroconvulsive scizures on spontaneous alternation behavior and locomotor activity in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 37, 1928-1932.
- [83] Dalby, N.O. GABA-levels increasing and anticolvusivant effects of the three different GABA uptake inhibitions. *Neuropharmacology*, 2000, 39, 2399-2407.
- [84] Merritt, H.H.; Putman T.J. A new series of anticonvulsivant drugs tested by experiments in animals. Arch. Neurol. Psychiatry, 1938, 39, 1003-1015.
- [85] Loscher, W., Schmidt D. Which animal model should by used in the research for a new antiepileptic *Epilepsy Res.*, 1988, 2, 145-181.
- [86] Porter, R.J., Cercghino, J.J.: Gladding, G.D., Hessie, B.J.; Kupferberg H.J., Scoville B., White B.G. Antiepileptic drug development program, *Clevel. Clinic Q*, **1984**, *51*, 293-305.
- [87] Choscinsk, M.; Ratnaraj, N.; Patsalos, P.N.; Czuczwar, S.J. Effects of caffeine on anticovulsivant effects on oxearzepine, lamotrigine and tigabine in a mouse of generalized tonic-clonic seizures. *Phar*macol. Rep., 2009, 61, 819-826
- [88] Bradford, H.F. Glutamate GABA and epilepsy Progress Neurobiol., 1995, 47, 477-511.
- [89] Everette, G M; Richards, R K. Comparative anticonvulsive action of 3, 5, 5- trimethyloxazolsdine-2, 4 dione (Tridone), dilantin and phenobarbital, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1944, 81, 402-412.
- [90] Loscher, W.; Honae, D.; Fassbender, C.P.; Nolting, B. The mill of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evolution of anticonvulsant drugs Pentylenetetrazole seizures model. *Epilepsy Res.*, 1991, 8, 171-182.
- [91] Blair, R.E., Churn,S.B.; Sombati, S.; Jeffrey, K.; DeLorenzo, R. J. Long-lasting decrease in neuronal Ca³⁷/calmodulin-dependent protein kinase II activity in a hippocampal neuronal culture model of spontaneous recurrent seizures. *Brain Res.*, 1999, 851, 54-65.
- [92] Tian, F.F.; Zeng, C.; Guo, T.H.; Chen, Y.; Chen, J.M.; Ma, Y.F.; Fang, J.; Cai, X.F., Li, F.R., Wang, X.H.; Huang, W.J.; Fu, J.J.; Dang, J. Mossy fiber sprouting, hippocampal damage and spontaneous recurrent scizures in pentylenetctrazole kindling nt model. *Acta Neurol. Belg.*, 2009, 4, 298-304.
- [93] Xianchun, L.; Hui K.; Nan, J.; Yinghe, H. Involvement of Schlb and Konal ion channels in audiogenico seizures and PTZ induced epilepsy. *Epilepsy Res.*, 2005, 66, 155-163
- [94] Corda, O.M.; Lecca D.; Glorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentyleneterrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1992, 262, 792-800.
- [95] Huang, R.Q.; Bell-Homer, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A.; Dillon G.H. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors, mechanism and site of action, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 298, 986-995.
- [96] Mc Donald, R. L., Baker, J. Pentylentetrazol and penicillin are selective antogonists of GABA- mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature*, 1977, 267, 720-721.
- [97] Zhu, U.J., Chen, Z., Zhang, L.S.; Xu, S.J.; Xu, A.J.; Luo, J.H. Spatiotemporal changes of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. *Neurosci. Lett.*, 2004, 356, 53-56.
- [98] Ajmone-Mersan, C., Marossero, F. Electrocorticographic and electroencephalographic study of the convulsivant induced by cardizol *Electroencephalogr. Clin. Neurophysial.*, **1950**, *2*, 133-142.
- [99] Bircher, R.P; Kanai T. Wang S.C. Intravenosus cortical and intraventricular dose effects relationship of pentilenetetrazol picrotoxin and desianoside in dogs *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1962, 14, 256-267.

- [100] Clark, C.R. Comparative and anticonvulsivant activity and neurotoxicity. *Epilepsv*, **1988**, 29, 198-203.
- [101] Ulloque, R.A., Chweh, A.Y., Swinyard, E.A. Effects of gammaaminobutyric acid (GABA) receptor agonists on the neurotoxicity and anticonvulsant activity of barbiturates in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1986**, *237*, 468-489.
- [102] Ingvar, M.; Morgan, P.F., Auer, R. N. The nature and taiming of excitotoxic neuronal necrosis in cerebral curtex. Hippocampus and ihalamus du to Flothiyl induce Status Epilepticus. Acta Neurophatol., 1988, 75, 362-375.
- [103] Loweistein, D.H.; Simon R.P.; Sharp, F.R. The pattern of 71kDa heat shock protein-like in the rat brain following flurothil induced status cpilepticus. *Brain Res.*, 1990, 531, 173-185
- [104] Bertrain, E.H.: Lothman, E.W.: Lenn, N.J. The hippocampus in experimental chronic epilepsy, a morphometric analysis *Ann. Neu*rol., 1990, 27, 43-48.
- [105] Nevander, G.: Invar, M., Auer, R.; Siesjo, B.K. Status epidepticus in well oxygenated rats causes normal necrosis. *Ann. Neurol.*, 1985, 18, 285-289.
- [106] Isaeva, E.; Isaeva, D., Khazipov, R.; Holmes, G.L. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizores. *Eur. J. Neurosci.*, 2006, 23, 1559-1566.
- [107] Szot, P.; Weinshenker, D., White, S.S.; Rubbins, C.A., Rust, N.C., Schwartzkroin, P.A.; Palmiter, R.D. Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. J. Neurosci., 1999, 19, 30985-10992.
- [108] Walter, A.E.; Johnson, H.C. Convulsive factor in commercial penicillin. Arch. Surg., 1945, 50, 69-73.
- [109] Bloomer, H.A.; Barton, L.J.; Maddok, R.J. Jr. Penicillin induces cloctroencephalographic in uremic patients JAMA, 1967, 200, 121-123.
- [110] Fossieck, B Jr: Parker, R.H. Neurooxicity during intravenous infusion of penicillin: a review J. Clin. Pharmacol., 1974, 14, 504-512.
- [111] Glour, P. Generalized epilepsy with bilateral synchronous spike and wake discharge: new findings concerning its physiological mechanisms *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, (Supply), 1978, 34, 245-249.
- [112] Ruggero, G F. Parenteral Penicillin in rats. an experimental model of multifocal epilepsy. *Epilepsia*, 1976, 17, 217-222.
- [113] Matsumoto, H., Ajmone-Marsan, C. Corrical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations, *Exp. Neurol.*, 1964, 9, 286-304
- [114] Gloor, P. Generalized conticoreticular epilepsy. Epilepsia, 1968, 9, 249-263
- [115] Prince, D.U.; Farrell, D. Centrencephalic spike-wave discharges following parenteral pericellin injection in the cat. *Neurology*, 1969, 19, 309-310.
- [116] Gloor, P.; Quesney, H., Zumstein, Phatophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: the roll of cortical and sucortical structures. II topical application of penicillin to the cerebral cortex and to subcortical structures. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 1977, 43, 79-94.
- [117] Ribak, C.E.; Bradburne, M.; Harris B. A preferential loss of gabaergic, symmetric synapses in epileptic foci a quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. J. Neurosci., 1982, 2, 1725-1735
- [118] Collins, R.C. Metabolic response to focal penicillin seizures in rat spike discharges vs after discharge. J. Neurochem., 1976, 27, 1473-1479.
- [119] Quesney, L. F., Gloor, P.; Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cai, the roll of eorical a subcortical structure. *Elec*troencephalogr. Clin. Neurophysial., 1977, 42, 640-655
- [120] Slobodan, D., Voja, P. Penicillin epilepsy in rats. Acto Med., 2004, 43, 19-23
- [121] Avoli, M. Feline generalized penicillin epilepsy. Ital. J. Neural. Sci., 1995, 16, 79-82.
- [122] Hill, R G ; Simmonds, M.A ; Straunhg, D W. A comparative study in some convulsivant substances as gama-amiobutyric acid antagonist in the feline cerebral cortex. Br. J. Pharm., 1973, 49, 37-51.
- [123] Dingledine, R.; Gjerstad, L. Reduce inhibition during epiteptiform activity in the *in vitro* hippocampal slices J. Physiol., 1980, 305, 297-313.
- [124] Ligas, A., Esat, A., Ismail, Y., Ozdemira, B., Sahinerc, M., Tufand, C. Penicillin-induced epilepsy model in rats, Dose-dependant effect

on hypocampal vulume and neuron number, Brain Res. Bull, 2008, 77, 172-177.

- [125] Esat, A.; Ligas, A.; Edner, D.; Tufan, C. Effects of penicillin induced epikepsy scizure on granular cell layer of dentate gyrus in rat, a steroterologycal study. *Neurosci. Res. Commun.*, 2002, 31, 101-109.
- [126] Ni, H.; Jiang, Y.W., Tao, L.Y., Cen, J., Wu, X.R. Effects of penicillim-induced developmental epilepticus on hippocampal regenerative sprouting, related gene expression and cognitive deficits in rats *Toxicol. Lett.*, 2009, 188, 161-166
- [127] Chen, R.; Huang, Y.; Shu-Wen, How Systemic penicillin as an experimental model of epilepsy. *Exp. Neurol.*, 1986, 92, 533-540
- [128] Hutton, T.H.; Frost, J.; Foster, J. The influence of the cerebellum in cut penicillin epilepsy. *Epilepsia*, 1972, 13, 401-408
- [129] Curus, D.R.; Duggan, A.W.; Felix D., Johnson G.A.R. GABA Bicuchine and the central inhibition. *Nature*, 1970, 226, 1222-1224
- [130] Mcdonald, R.L.; Olsen R.W. GABA receptors channel Ann. Rev. Neurosci., 1994, 17, 569-602.
- [131] Sillito, A.M. inhibitory mechanism influencing complex cells orientation selectivity and their modifications al high resisting discharges rates. J. Physiol., 1979, 284, 33-53
- [132] Pong, S.F.; Graam, .T. N-methyl bicuculline actions on mouse spinal cord and cortical neurons in cell culture. *Brain Res.*, 1982, 244, 151-164.
- [133] Kendall, D.A., Fox D.A.; Enna, S.J. Effects of gama vinyl GABA on bicucultine induced setzures. *Neuropharmacology*, 1981, 20, 351-355
- [134] Ben An, Y.; Trebriay, R.D., Ghilini, G.; Naquet, R. Electrographic, clinical and pathological alteration following systemic administration of kaine acid, bicuculline or pentraol, metabolic mapping using the deoxyglucuse method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*, 1981, 6, 1361-1391.
- [135] Dichter, M.A. Physiological identification of GABA as the inhibitory transmitter for mammalian cortical neurons in cell culture, *Brain Res.*, 1980, 190, 111-121.
- [136] Srderfeldt, B.; Kalimo, H.; Olsson, Y., Siesjo, B.K. Pathogenesis of brain lesions caused by experimental epilepsy Light- and electronmicroscopic changes in the rat cerebral cortex following bicuculline-induced status epilepticus. Acta Neuropathol. (Berl), 1981, 54, 219-232.
- [137] Seutin, V.; Johnson, S.W. Recent advances in the pharmacology of quaternary salts of bicuculline. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1999, 20, 268-270.
- [138] Meldrum, B.S., Chapman, A.G. Benzodiazepine receptors and their relationship to epilepsy. *Epilepsia*, 1986, 27, 3-13.
- [139] De Deyn, P.P.; Hooge, R.D., Marescau, B.; Pei, Y.Q. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.*, 1992, 12, 87-110
- [140] Turski, W.A., Cavalheiro, E.A.; Calderazzo-Filhot, L.S.; Kleinrok, Z.; Czuczwar, S.J.; Turski, L. Injections of picrotoxin and bicuculline into the amygdaloid complex of the rat: an electroencephalographic, behavioural and morphological analysis *Neuroscience*, 1985, 14, 37-53.
- [141] Snead, O.C. JII. Gamma-hydroxybutyrate in the monkey L electroencephalographic, behavioral and pharmacokinetic studies, *Neu*rology, 1978, 28, 636-642.
- [142] Snead, O.C. III. Gamma-hydroxybutyrate in the monkey II. effect of chronic oral anticonvulsant drugs, *Neurology*, 1978, 28, 643-648.
- [143] Brailowsky, S.; Menini, CH.; Silva-Barrat C., Naquet, R. Epileptogenic gamma-uminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci. Lett.*, 1987, 74, 75-80
- [144] Brailowsky, S.; Kunimoto, M.; Menini C.; Silva-Barrat C.; Riche D.; Naquet R. The GABA-withdrawal syndrome, a new model of focal cpileptogenesis. *Brain Res.*, 1988, 442, 375-179.
- [145] Brailowsky, S.; Kunimoto, M.; Silva-Barrat, C.; Menini, CH.; Naquet R. Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia*, 1990, 31, 369-377
- [146] Millam, M.H., Meldrum, B.S.; Faingold, C. L. Induction of service susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculture into the inferior colliculus of normal rats. *Exp. Neurol.*, 1986, 9, 634-646.

- [147] Oney, J.W., Ho, O.L.; Rhee, V. Cytotoxic affects an acid and sulphur-containing aminu acid on the infant mouse central nervous system, *Exp. Brain Res.*, 1971, 14, 61-76.
- [148] Montecucco, C., Schiavo, G. Structure and function of totanus and botulinum neurotoxins Q. Rev. Biophys., 1995, 28, 423-472.
- [149] Carrea, R., Lanari, A. Chronic effect of tetanus toxin applied loeally to the cerebral cortex of the dog. *Science*, 1962, 137, 342-343.
- [150] Roux, E., Borrel, A. Tetanos cerebral et immunite contre le tetanos. Annal de l'Institut Pasteur, 1898, 4, 126-138
- [151] Brooks, V.B.; Asanuma, H. Action of telanus toxin in the cerebral cortex. Science, 1962, 137, 674-676.
- [152] McGeer PL. McGeer, EG: Campbell, JJ.R. Rotary effects of intra-cerebral tetanus toxin injections. Exp. Neurol., 1980, 67, 363-367.
- [153] Finnerty, G.T.; Jefferys J.G.R. Investigation of the neuronal aggregate generating seizures in the rat tetanus toxin model of epilepsy, technology and medicine J. Neurophysiol, 2002, 88, 2919-2927.
- [154] Mellanby, J.; Hawkins C.; Mellanby N.P., Rawlins, J.; Impey, M.E. Tetenus toxin as a tool for studying epilepsy. J. Physiol., 1984, 79, 207-215
- [155] Weinstein, L. Tetanus toxin. J. Med., 1973, 289, 1293-1296.
- [156] Prince, D.L.; Griffin, J.; Young , A.; Peck, K.; Stocks, A. Tetanus toxin, direct evidence for retrograde intraaxonal transport. *Science*, 1984, 88, 945-947.
- [157] Mellanby, J.; George, G.; Robinson, A.; Thompson, P. Epileptiform syndrome in rats produced by unjecting tetanus toxin into hippocampus. J. Neurol. Neurosurg., 1977, 40, 404-414.
- [158] Brener, K., Amitai, Y., Jefferys, J. G. R., Gutnick, M. J. Chronic epileptic foci in neocortex, *in vivo* and *in vitro* effects of tetanus toxin *Eur. J. Neurosci.*, 1990, 3, 47-54.
- [159] Mitchell, J.; Gatherer, M. Sundstrom, Aberrant Timm-stained fihers in the dentate gyrus following tetanus toxin-induced seizures in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **1996**, *22*, 129-135.
- [160] Lee, C. L., Hrachovy, R. A.; Smith, K. L.; Frost, J. D. JR; Swann, J. W. Tetanus toxin-induced seizures in infant rats and their effects on hippucampal excitability in adulthood. *Brain Res.*, 1995, 677, 97-109
- [161] Brener, K.; Amitan, Y.; Jefferys, J.G.R.; Gutnick, M. J. Chronic epileptic foci in neocortex, *in vivo* and *m vitro* effects of tetanus toxin. *Eur. J. Neurosci.*, 1991, 3, 47-54.
- [162] Bevan, S.; Wendon, L. M. B. A study of the action of tetanus toxin at rat sulcus neuromuscular junctions. J. Physiol., 1984, 348, 1-17.
- [163] Bittner, M.A.; Holz, R.W. Effects of tetanus toxin on catecholamine release from intact and digitonin-permeabilized chromaffin cells. J. Neurochem., 1988, 51, 451-456
- [164] Empson, R.M.; Jefferys, J. G.R. Synaptic inhibition in primary and secondary chronic epileptic foci induced by intrahippncampal tetanus toxin in the rat J. Physiol., 1993, 465, 595-614
- [165] Jordan, S.J., Jefferys, J.G.R. Sustained and selective block of IPSPs in brain slices from rats made epileptic by intrahippocampal tetanus toxin. *Epilepsy Res.*, 1992, 11, 119-129
- [166] Brace, H.M.; Jefferys, J.G.R.; Mellanby, J. Long term changes in hippocampal physiology and in learning ability of rats after intrahippocampal tetanus toxin J. Physiol., 1985, 368, 343-357.
- [167] Darcey, T.M.; Williamson, P.D. Chronic/semichronic limbic epilepsy produced by microinjection of tetanus toxin in cat hippocampus. *Epilepsia*, 1992, 33, 402-419.
- [168] Smith, K U J. Quantitative analysis of the pattern of activity in audio-epileptic seizures in rats. Comp. Physicol., 1941, 32, 311-345
- [169] Chen, C.S., Gates, G.R., Bock, G.R. Effect of priming and tympanic membrane destruction on development of audiogenic scizure susceptibility in BALB/c mice. *Exp. Neurol.*, 1973, 39, 277-84.
- [170] Collin, R.L. Audigenic seizures. Purpura, D.P.; Penry, J.K.; Woodbury, D.M.; Tower, D.B.; Walker, R.D. Eds. Experimental Model of Epilepsy A Manual for the Laboratory Wolker. Raven Press, New York, 1972, pp. 347-372
- [171] Garcia-Cairasco, N.; Oliveira, J.A.C., Wakamatsu, H.; Bueno S.T.B.; Guimaraes FS. Reduced exploratory activity of audiogenic seizure susceptible Wistar rats. *Physiol. Behav.*, 1998, 64, 671-674.
- [172] Henry, K.R.; Willott, J.F. Unilateral inhibition of audiogenic seizures and Prever reflexes. *Nature*, 1972, 240, 481-482.
- [173] Faingold, C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat, Adv. Neurol., 1999, 79, 311-321
- [174] Henry, K.R.; Wallick, M.; Davis, M. Inferior colliculus lesions, Effects on audiogenic seizures and Preyer reflex *Physiol. Behav.*, 1972, 9, 885-887

- [175] Ward, R. Unilateral susceptibility to audiogenic seizures impaired by contralateral lesions in inferior colliculus *Exp. Neurol.*, 1971, 32, 313-316.
- [176] Garcia-Cairasco, N.: Sabbatini, R.M.E. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. *Physiol. Behav.*, 1991, 50, 421-427.
- [177] N'Gouemo, P.; Faingold, C.L. Periaqueductal gray neurons exhibit increased responsiveness associated with audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat *Neuroscience*, **1998**, *84*, 619-625.
- [178] Evans, M.S., Violu-McCabe, K.E.; Caspary, D.M.; Faingold, C.L. Loss of synaptic inhibitinn during repetitive stimulation in the genetically epilepsy-prone rats (GEPR). *Epilepsy Res.*, 1994, 18, 97-105.
- [179] Evans, M S ; Cady, C J ; Disney, K.E ; Yang, L., LaGuardia, J.J. Three brief scizures reduce inhibitory synaptic currents, GABA(A) currents, and GABA(A) r-receptor subunits. *Epilepsia*, 2006, 47, 1655-1664
- [180] N'Gouemo, P.; Fuingold, C.L.; Morad, M. Calcium channel dysfunction in inferior colliculus neurons of the genetically epilepsyprone rat. *Neuropharmacology*, 2009, 56, 665-675
- [181] Nocbels, J.L. A single gene error of noradrenergic axon growth synchronizes central neurones. *Nature*, 1984, 310, 409-411.
- [182] Neumann, P.E.; Collins, R.L. Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. *Genetics*, 1991, 88, 5408-5412.

[183] Pierson, M.; Liebmann, S.L. Noise exposure-induced scizure susceptibility in Sprague Dawley rats. *Epilepsy Res.*, 1992, 13, 35-42.

- [184] Naquet, R., Meldrum, B.S. Photogenic Seizures in Baboon, Experimental Models of Epilepsy- A Manual for the Laboratory Worker, Raven Press, New York, 1972, pp. 373-406
- [185] Killam, K.F.; Killam, E.K.; Naquet, R.; Bert, J. Paroximal responses to interminent light in a population of baboons. *Epilepsy*, 1966, 7, 215-219.
- [186] Wada, J.A., Terao, A.; Broker, H.E. Longitudinal correlative analysis of epileptic Baboon papio papio. Neurology, 1982, 22, 1272-1285.
- [187] Meldrum, B.S. Photosensible epilepsy in papio papio a model for drug study Contemp. Clinic. Neurophysiol., 1978, 14, 317-322.

Received: May 15, 2010

Revised: June 25, 2010

Accepted: June 25, 2010

- [188] Watkins, J.C., Evans, R.H. Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1981, 21, 165-204.
- [189] Kuhar, M. J.; Yamamura, H. I. Localization of cholmergic muscarnic receptors in rai brain by light microscopic radioautography. *Brain Res.*, 1976, 110, 229-243.
- [190] Turski, W.A., Cavalheiro, E.A.; Schwarts, M. Limbic seizures prodoces by pilocarpine in rats, Behavioral electroencephalographic neurophatological study. *Behav. Brain Res.*, **1983**, *9*, 315-375
- [191] Cavalheiro, E.A.; Leite J.P.; Bortolotto Z.A.; Turski, W.A. Long-Term effects of pilocarpine in rats, structural damage or the brain triggers kindling and spontaneous recurrently seizures. *Epilepsia*, 1991, 32, 778-782
- [192] Cavalbeiro E.A., Fernandes, M.J.S., Turski, L., NalTah-Mazzucoratil M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: arnino acids and monoamines determination in the hippocampus. *Epilep*sia, 1994, 35, 1-11.
- [193] Clifford, D.B.; Olney, J.W.; Maniotis, A., Collins, R.C., Zorumski, C. F. The functional anatomy and physiology of lithiumpilocarpine, and high dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 1987, 23, 923-953.
- [194] Lui, Z., Nagato T.; Desjardins G.D.; Gloor P., Avoli M. Quantitative evaluation of neural loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. *Epilepsy Res.*, 1994, 17, 237-248.
- [195] Gibbs, J.W. III, Shumate, M. D., Coulter, D.A. Differential epilepsy- associated alterations in postsynaptic GABA-A receptor function in dentate granule and CA1 neurons, J. Neurophysiol., 1997, 77, 1924-1936.
- [196] Fernandes, M.J.S., Naffah-Mazzacoratti, M.G.; Cavalheiro, E.A. Na+K+ATPase in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. int.*, 1996, 28, 497-500
- [197] Scorza, C.A.; Garrido, Y.D.S.; Arida, R.M.; Amado, D., Cavalheiro, E.A.; Naffah-Mazzacoratti, M.G. Levels of synaptic protein X11 alpha/mint 1 are increased in the hippocampus of rats with epilepsy. *Epilepsy Res.*, 2003, 57, 49-57