



Apoptosis en el modelo de epilepsia
GASH:Sal después de las crisis convulsivas
audiógenas

Apoptosis in the GASH:Sal epilepsy model after audiogenic seizures

ALUMNO

Nora Domínguez Hernández

TRABAJO DE FIN DE GRADO / SALAMANCA, 2017

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Concepto de epilepsia y modelos experimentales 1
- 1.2 Muerte celular programada 3
- 1.3 Pérdida neuronal asociada a crisis epilépticas 7

2. JUSTIFICACIÓN 8

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- 3.1 Hipótesis 8
- 3.2 Objetivo principal 8
- 3.3 Objetivos específicos 8

4. DISEÑO EXPERIMENTAL 8

5. MATERIALES Y MÉTODOS

- 5.1 Revisión bibliográfica 9
- 5.2 Animales de experimentación 9
- 5.3 Técnicas empleadas
 - 5.3.1 Protocolo de estimulación auditiva 10
 - 5.3.2 Protocolo kindling 10
 - 5.3.3 Perfusiones 11
 - 5.3.4 Obtención de secciones histológicas 11
 - 5.3.5 Inmunohistoquímica 12
 - 5.3.6 Tinción de acetilcolinesterasa 12
 - 5.3.7 Montaje de pocillos 13
 - 5.3.8 Tinción de Nissl 13
 - 5.3.9 Estudio del material histológico 13
 - 5.3.10 Cuantificación densitométrica 14
 - 5.3.11 Análisis estadístico 14

6. RESULTADOS

- 6.1 Distribución de marcadores apoptóticos en el cerebro de GASH:Sal 17
 - 6.1.1 Colículo inferior y sustancia gris periacueductal 17
 - 6.1.2 Hipocampo 21

7. DISCUSIÓN

- 7.1 Discusión metodológica 24

7.2 Discusión de los resultados	24
8. CONCLUSIONES	25
9. BIBLIOGRAFÍA	26
10. ANEXOS	
10.1 Anexo 1 (vídeo crisis epiléptica GASH:Sal)	29

ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina-biotina
AChE: Acetilcolinesterasa
CA1: Hipocampo
CA2: Hipocampo
CA3: Hipocampo
CCA: Crisis convulsivas audiógenas
CD: Corteza dorsal
CE: Corteza externa
CI: Colículo inferior
DAB: Diaminobenzidina
DG: Giro dentado
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ENV: Estimulación del nervio vago
FAE: Fármacos antiepilépticos
GASH:Sal: *Genetic audiogenic seizures hámster*
HYP: Hipocampo
ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia
INCYL: Instituto de Neurociencias de Castilla y León
NC: Núcleo central
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAG: Sustancia gris periacueductal
PB: Tampón fosfato
SBF: Suero bovino fetal
SEA: Servicio de Experimentación Animal
SEM: Error estándar de la media
SNC: Sistema Nervioso Central
TB: Trizma® base con HCl
TBS: Trizma® base salino
TBS-TX: Trizma® base salino con Tritón
TNF: Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

En este trabajo se investiga el desarrollo de procesos de apoptosis o muerte celular programada asociados a las crisis convulsivas audiógenas en el modelo de epilepsia GASH:Sal, desarrollado en el bioterio de la USAL. Ésta línea de hámsteres presenta una epilepsia de tipo audiógena de origen genético que se manifiesta en forma de crisis generalizadas tónico-clónicas. Para ello se estandarizaron distintos protocolos, entre los que se encuentran la tinción de caspasa-3 activa, la tinción de acetilcolinesterasa y la tinción de Nissl. Se descubre, que tal y como se planteaba en la hipótesis hay neurodegeneración asociada a la epilepsia, que se traduce en una activación de la caspasa-3 y por tanto, en una mayor inmunoreactividad en los tejidos en que se haya iniciado este proceso. Se plantea la realización de otros experimentos con una gama más amplia de técnicas, que marquen diferentes puntos del proceso de muerte celular programada, de manera que se corroboren los resultados obtenidos durante el estudio.

ABSTRACT

In this work we investigate the development of apoptosis or programmed cell death associated with audiogenic seizures in the GASH:Sal epilepsy model, which is a hamster strain developed at the biotery of the University of Salamanca. This hamster strain has an audiogenic epilepsy of genetic origin that provokes generalized tonic-clonic seizures. To achieve our purpose different protocols were standarized including active caspase-3, acetylcholinesterase staining, as well as Nissl staining. We discovered that as it was hypothesized, there is neurodegeneration associated with epilepsy, which involves an activation of caspase-3. As a result, we found a greater immunoreactivity in the epileptogenic tissues. We propose to perform a broader range of techniques marking different points of the programmed cell death process in order to corroborate the results obtained during the study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Concepto de epilepsia y modelos experimentales

La epilepsia es una compleja patología neurológica con un alto grado de incidencia y un número bastante significativo de consecuencias negativas, asociadas a ella. Está definida por la Liga Internacional en contra de la Epilepsia (ILAE) como un desorden del cerebro caracterizado por una predisposición continua a presentar crisis epilépticas, caracterizadas por signos o síntomas transitorios debidos a una actividad neuronal anormal en el cerebro [Berg et al., 2010]. En España la prevalencia se estima en torno a 8 pacientes por cada 1.000 habitantes [García-Ramos et al., 2011], lo que supone que aproximadamente cerca de 400.000 personas padecen epilepsia. Aunque se trata de una enfermedad que puede llegar a afectar a cualquier persona en cualquier momento de su vida, en la mayor parte de los casos se manifiesta bien durante la infancia o a partir de los 65 años de edad. En el mundo, sufren epilepsia un total de 50 millones de personas. Cada año se diagnostican más de 20.000 nuevos casos en España, siendo una de las enfermedades neurológicas crónicas más habituales hasta convertirse en el segundo motivo de consulta ambulatoria después de las cefaleas.

La epilepsia se caracteriza por presentar una actividad excitatoria anormal o excepcional del Sistema Nervioso Central (SNC) que puede llegar a desencadenar, en algunos casos, episodios convulsivos graves.

Según el área afectada, las crisis pueden ser parciales (focales) o generalizadas. Las primeras hacen referencia a aquéllas donde la descarga comienza en una zona concreta que puede extenderse a otras áreas cerebrales, mientras que las segundas son aquéllas que afectan a todo el cerebro y pueden llegar a provocar una pérdida del conocimiento [Moog y Ochoa, 2003].

Las crisis epilépticas parciales pueden clasificarse en:

- *Crisis parciales simples*, en las que se da una alteración del movimiento, la memoria y las sensaciones, además de los sentidos de la vista y el oído.
- *Crisis parciales complejas*, en las que la persona que la padece pierde el conocimiento y puede aparentar un estado de trance. En estos casos se puede dar una repetición compulsiva de ciertos movimientos.
- *Secundariamente generalizadas*, que comienzan como una crisis parcial que termina extendiéndose al resto del cerebro, convirtiéndose de esa manera en una crisis generalizada.

Entre las crisis epilépticas generalizadas se encuentran:

- *Crisis de ausencia*, mucho más frecuente en niños, en las que la persona pierde el conocimiento mientras parece tener la mirada fija en un punto concreto.

- *Crisis mioclónicas*, caracterizadas por provocar una sacudida brusca y muy rápida de las extremidades, sin alteración de la conciencia, que tiene una duración de escasos segundos.
- *Crisis tónicas*, en las que tras una pérdida de la consciencia, los músculos de todo el cuerpo se contraen y sufren una hiperextensión brusca.
- *Crisis atónicas* (astáticas), en cuyo caso los músculos de todo el cuerpo pierden su consistencia, se relajan y la persona cae al suelo. Puede haber o no empeoramiento del nivel de conciencia.
- *Crisis tónico-clónicas o convulsivas*, en las que la persona cae al suelo y el cuerpo se pone rígido en la fase tónica. Se producen sacudidas rítmicas tanto en brazos como en piernas. Estas crisis también pueden llegar a provocar mordedura de lengua, labios morados, salida de espuma por la boca y relajación de los esfínteres.

Desde el punto de vista clínico, se han llegado a definir hasta un total de cuarenta tipos de epilepsia en humanos [ILAE, 1989]. Un grupo de epilepsias son inducidas por estímulos sensoriales, las denominadas epilepsias reflejas [Salas-Puig et al., 2000].

La etiología de la epilepsia es muy variada según describe la Organización Mundial de la Salud (OMS). El tipo más frecuente de epilepsia, que afecta a 6 de cada 10 personas, es aquella conocida como idiopática o criptogénica, es decir, que no tiene una causa identificable, en la que se cree que están implicados de forma sustancial ciertos determinantes genéticos. Cabe destacar la importancia de interacciones entre la predisposición genética, los factores ambientales en la manifestación de la crisis y la expresión particular de un desorden determinado. Aquellos tipos en los que la causa sí puede llegar a identificarse son los que se conocen como epilepsia secundaria o sintomática, entre cuyas causas se pueden distinguir daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales, malformaciones congénitas o alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales asociadas, traumatismo craneoencefálico grave, accidente cerebrovascular (limita la llegada de oxígeno al cerebro), infecciones cerebrales (tales como las meningitis y la encefalitis o neurocisticercosis), tumores cerebrales, ciertos síndromes genéticos, así como alteraciones bioquímicas o metabólicas. En relación a estas últimas, cabe destacar que debido a los exigentes y continuos requisitos del cerebro, la disfunción neurometabólica es un aspecto fisiopatológico dominante en el cerebro epiléptico, por tanto, el metabolismo neuronal anormal puede ser, no sólo un signo crónico del cerebro epiléptico, sino también un causante directo de la epileptogénesis. La base de esta hipótesis metabólica se deduce a partir de distintos focos de evidencias, entre las que se incluyen datos de imagen diagnóstica, parámetros fisiológicos humanos y estudios realizados en modelos animales [Fisher et al., 2005].

El tratamiento más común emplea fármacos antiepilépticos (FAE), que restauran el equilibrio químico de las neuronas y atenúan las descargas eléctricas anormales [Barrera-Bailón et al., 2013; 2016]. Entre un 20 y un 30% de las personas no responden correctamente al tratamiento farmacológico simple, basado en el uso de un único medicamento, motivo por el cual se necesita combinar varios fármacos. En algunos casos, en los que el paciente no responde a ninguno de estos tratamientos puede ser necesario recurrir a la cirugía o a la estimulación del nervio vago (ENV) mediante la implantación de un electrodo bajo la piel del cuello [García-March et al., 2008]. Mucho de lo que hoy se conoce sobre la epilepsia se debe a los modelos experimentales sobre esta enfermedad [Sloviter, 2009]. Los modelos experimentales empleados han sido múltiples, que van desde la inducción mediante el uso de drogas convulsionantes, privación de metabolitos o estimulación eléctrica [Magdaleno-Madrigal et al., 2004] hasta el uso de modelos animales con predisposición genética a padecer este tipo de trastornos [Löscher, 2002]. Dentro de los modelos animales, los mejor caracterizados en su electrofisiología y comportamiento son los modelos que poseen una susceptibilidad congénita a padecer estas crisis audiógenas. A este grupo pertenece el modelo empleado en este estudio el hámster GASH:Sal (*Genetic Audiogenic Seizures Hamster*) [Muñoz et al., 2016], cuyos individuos presentan crisis convulsivas audiógenas (CCA) de origen genético similar a las crisis tónico-clónicas que aparecen en la especie humana [Carballosa-Gonzalez et al., 2013]. En un estudio realizado en esta línea en la Universidad de Salamanca se demostró un patrón de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena [Muñoz et al., 2016]. Al igual que en otros modelos animales de CCA, las convulsiones se desencadenan como consecuencia de un estímulo auditivo intenso a partir de los 18 días de edad, momento en el cual se completa la maduración del sistema acústico. La susceptibilidad alcanza su grado máximo entre el primer y el cuarto mes, para posteriormente ir desapareciendo gradualmente. En estos animales la CCA se puede dividir en varias fases progresivas características, que son el periodo de latencia, de breves segundos de duración tras el estímulo, la carrera salvaje, que finaliza con la caída del animal en decúbito lateral, el “opistótono” (arqueamiento acusado del raquis, extremidades anteriores, cola, orejas enhiestas y espasmo en abducción de los miembros posteriores), convulsiones tónico-clónicas generalizadas, fase tónica de progresión craneocaudal y periodo estuporoso postictal (Anexo 1) [Muñoz et al., 2016; Soria et al., 1987].

1.2 Muerte celular programada

El término apoptosis lo utilizaron por primera vez los investigadores Wyllie, Kerr y Curie en 1972 para designar una nueva forma de muerte celular distinta a la muerte por necrosis, dado que en ella se producían una serie de cambios secuenciales que no tenían como resultado la pérdida de la

integridad de la membrana celular y que además no desencadenaban una respuesta inflamatoria, tal y como sucedía en la muerte por necrosis, anteriormente mencionada [Kerr et al., 1972]. En el proceso de necrosis, la célula incrementa su tamaño celular, los orgánulos celulares se desorganizan y la mitocondria se hincha mientras que la membrana mitocondrial interna se contrae, la cromatina aparece dispersa y finalmente la membrana celular se rompe liberando todo el contenido celular y moléculas pro-inflamatorias que desencadenan una respuesta inmune. Existe una variedad tan grande de formas de muerte activa o programada como tipos celulares, motivo por el cual actualmente un gran número de autores prefiere utilizar el término de muerte celular programada en vez de apoptosis, siempre que los componentes de la célula participen de una forma activa en su muerte, sin necesidad de que se den todos los cambios morfológicos descritos en el término apoptosis. Entre los cambios que se producen durante este proceso se encuentran [Cotter et al., 1996]:

- Encogimiento y pérdida de contacto de las células con otras vecinas. Se han llegado a describir reducciones en el volumen celular de incluso el 30%. Esto es debido al movimiento de fluidos fuera de la célula, como consecuencia de la inhibición del sistema de cotransporte sodio-potasio-cloro.
- Dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático, de manera que se pueden fusionar con la membrana plasmática. El resto de orgánulos celulares permanecen intactos. Se da también una activación de las transglutaminasas que producen el entrecruzamiento de proteínas citoplasmáticas, que van formando polímeros.
- Paso al exterior de la membrana plasmática de la fosfatidilserina presente, por norma general, en la cara interna de la membrana. Esto va a facilitar que la célula sea reconocible por los macrófagos.
- Condensación de la cromatina y acumulación de la misma en la periferia, además de desintegración en partículas osmiófilas del nucleolo.
- Fragmentación nuclear como consecuencia de la actuación de endonucleasas endógenas que rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales. Esto da lugar al característico patrón de DNA en escalera que se observa cuando se analiza en electroforesis y que sirve como marca bioquímica en el reconocimiento del proceso de apoptosis. Este patrón no es visible en todos los tipos celulares, dado que depende de la si la rotura se produce o no en las dos cadenas y del grado de fragmentación.
- Formación de circunvoluciones en la membrana plasmática, de manera que adquiere una apariencia vesicular característica, dando la sensación de que la célula está hirviendo en su

parte externa. La célula además pierde elementos de superficie como microvellosidades y uniones célula-célula.

- Aparición de los cuerpos apoptóticos como resultado de las grandes invaginaciones. Estos tienen la membrana intacta, mantienen sus mitocondrias intactas y contienen cuerpos densos granulares que corresponden con fragmentos nucleares, producidos también por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear. Estos cuerpo apoptóticos ya formados pueden ser reconocidos por macrófagos y posteriormente fagocitados. Cuando las células se encuentran en cultivo suelen hincharse y destruirse, dando lugar a un proceso conocido con el nombre de apoptosis secundaria o falsa necrosis.

En la apoptosis están implicadas una serie de enzimas proteolíticas encargadas de este proceso, las caspasas, que se sintetizan como zimógenos y precisan de una activación proteolítica. En mamíferos, se conoce una gran variedad de tipos de caspasas, que pueden dividirse entre caspasas iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras son las primeras en activarse, provocando posteriormente la activación de las efectoras. Todas ellas actúan en cascada y, como substrato final, activan proteínas, que van a producir los cambios morfológicos característicos de la muerte celular. Entre las acciones de las caspasas podemos encontrar la inactivación de proteínas del citoesqueleto, acción sobre las proteínas asociadas a DNA, activación por proteólisis de Bid y estabilización de p53, entre otras. En el proceso de apoptosis se puede hacer una distinción entre dos vías generales que conducen a la activación de las caspasas (Figura 1), cada una de las cuales posee unas características específicas, que hacen que puedan diferenciarse:

- *Vía extrínseca*, en la que destaca la acción de los denominados receptores de muerte por ligandos extracelulares, que forman parte de la familia de receptores de TNF, que presentan un dominio de muerte conservado en su parte citoplasmática y que mediante transducción de señales llevan a la activación de las caspasas. Está mediada por el receptor Fas. La unión de FasL a su receptor provoca la trimerización del receptor, que lleva a una agrupación de los dominios de muerte en el lado citoplasmático del receptor, con lo que se puede dar un reclutamiento de una proteína adaptadora que presenta además un dominio que le permite interaccionar con procaspasas inactivas [Naval et al., 2004]. Al producirse dicha interacción la alta concentración de caspasa-8 permite que se autoactive actuando sobre las caspasas efectoras tras su liberación al citoplasma. Actúan además otras dos proteínas transmembrana que son DR5 y PERP. La primera contiene el dominio de muerte para el ligando TRAIL, mientras que la segunda forma parte de la familia de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular y es una diana directa de p53, cuya activación da lugar a una para del ciclo celular. Se desarrolla con el fin de proteger sitios privilegiados desde el punto de vista

inmunitario, regular y terminar determinadas respuestas inmunitarias o eliminar linfocitos T autorreactivos.

- *Vía intrínseca o mitocondrial*, en la que se inicia el mecanismo de apoptosis, debido a que la célula experimenta estrés o como consecuencia de la exposición frente a estímulos nocivos. En esta circunstancia no se reciben señales extracelulares necesarias para la supervivencia celular. En esta vía, las mitocondrias se hinchan, se producen una serie de cambios estructurales en la membrana por la apertura de poros de transición y se da una alteración en el potencial transmembranal que lleva a que se produzca la liberación del citocromo c, que se une a la proteína Apaf-1, cuya expresión viene determinada por la acción de p53 [Kannan et al., 2001], que estimula su oligomerización permitiendo el reclutamiento de la procaspasa-9, cuya agregación permite su propia autoactivación como caspasa iniciadora. El complejo formado durante estas fases de unión da lugar al apoptosoma, que divide de manera proteoítica la procaspasa-3, que lleva a una activación de la caspasa-3. Como consecuencia de todo ello, se inicia una cascada de reacciones [Kroemer et al., 1998].

A pesar de que ambas vías comparten el mismo comienzo existen una serie de diferencias entre ambas, como la activación de las caspasas iniciadoras, que conlleva la activación de las caspasas efectoras encargadas del corte en proteínas cruciales para la integridad celular y la activación de enzimas que promueven la muerte celular.

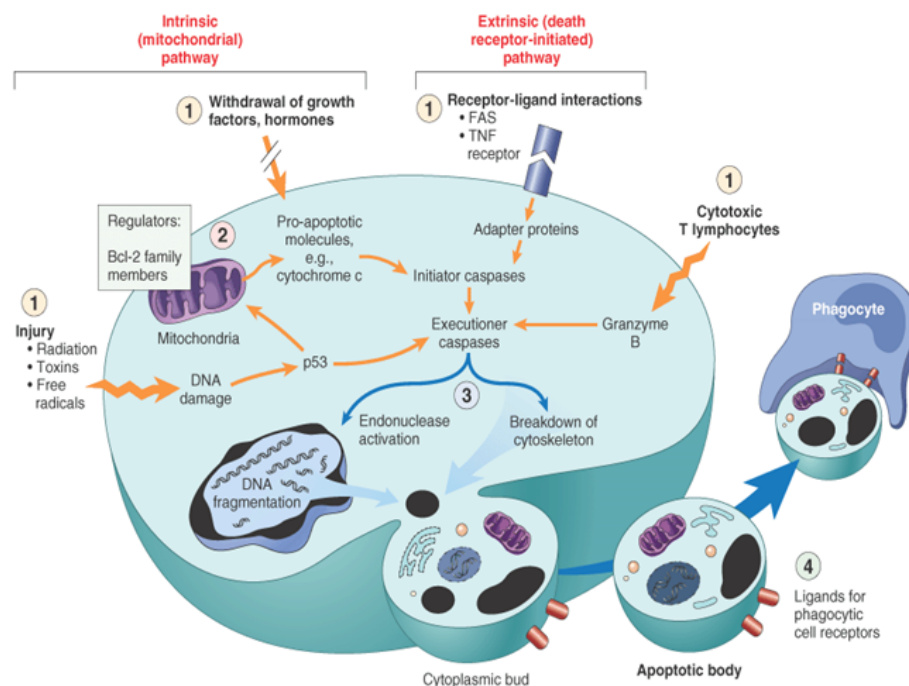


Figura 1. Vías de señalización apoptótica [Kumar et al., 2013]

El mecanismo de apoptosis es extremadamente complejo y sofisticado, motivo por el cual múltiples moléculas promueven la muerte celular, amplificando efectos en cascada y retroalimentación positiva, con el fin de poder asegurar la consecución del proceso de manera rápida e irreversible, una vez que éste ha sido iniciado. Con el fin de evitar que pequeñas alteraciones provoquen el inicio de este mecanismo, las células producen una serie de reguladores conocidos con el nombre de señales de supervivencia, que son necesarias para que las células se mantengan vivas. Dentro de estas señales positivas se encuentran los factores de crecimiento, citoquinas, células mediadoras de la inflamación, lípidos, lípidos oxidados, lípidos peroxidados, especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico, entre otros [Ross, 1993; Ross y Glomset, 1976].

1.3 Pérdida neuronal asociada a crisis epilépticas

La apoptosis, junto con su maquinaria bioquímica asociada a la epilepsia emergió como un campo importante de investigación durante los años 90 [Henshall y Simon, 2005]. En los primeros trabajos que se realizaron se detectó *in situ* una fragmentación del DNA en unas muestras de tejido cerebral de una rata tras crisis convulsivas prolongadas [Filipkowski et al., 1994]. Con el paso del tiempo los modelos experimentales y nuevos estudios clínicos pudieron confirmar que las crisis epilépticas producen muerte neuronal en el cerebro [Greenfield et al., 2008]. Resulta bastante complicado hacer una distinción entre las consecuencias de la epilepsia y sus causas, así como del tratamiento de la patología y las secuelas de las crisis como tal. Sin embargo, gracias a los continuos avances en neuro-imagen de alta resolución se ha podido ir observando una progresión en el daño cerebral en aquellos pacientes con ataques epilépticos continuos [Henshall y Simon, 2005]. Como consecuencia de todo ello, se considera necesario establecer de forma precisa los procesos de muerte neuronal inducidos por las crisis, permitiendo de esa manera el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden al tratamiento de la enfermedad y a la reducción de los daños que provoca.

La muerte celular se activa por norma general tras una activación prolongada del receptor de glutamato y/o como consecuencia de una liberación de ligandos de los receptores de muerte. El aumento del calcio intracelular puede provocar directamente la disfunción mitocondrial o producir una activación de una serie de fosfatasa que liberan Bad, dando lugar a una activación de Bax en la mitocondria. A su vez el citocromo c es liberado uniéndose entonces a Apaf-1. Todo ello lleva a la activación de la caspasa-9. Alternativamente, la activación de los receptores de muerte provoca la formación de un complejo de inducción de muerte celular, así como el procesamiento de la caspasa-8. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas efectoras.

2. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no se tiene conocimiento de los posibles procesos de neurodegeneración que se desencadenan en la línea de hámsteres GASH:Sal, como consecuencia de las crisis convulsivas audiógenas. Es por ello por lo que se pretende determinar su localización en el cerebro de estos animales, mediante el empleo de técnicas de detección inmunohistoquímica como la caspasa-3 activa y la tinción de Nissl. Esta última sirve para establecer referencias citoarquitectónicas y marca los cuerpos picnóticos, que corresponden con los fragmentos de cromatina, mientras que la caspasa-3 activa marca los lugares donde se ha iniciado una activación de caspasas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Se parte de la hipótesis de que las crisis epilépticas producen procesos de neurodegeneración asociados. Estos se han podido observar, hasta el momento, en tejido cerebral de rata, por tanto, es esperable que en el hámster GASH:Sal, también se produzcan.

3.2 Objetivo principal

Estandarizar los protocolos de estudio de los procesos de apoptosis que se desencadenan en el hámster GASH:Sal, como consecuencia de una serie de crisis epilépticas repetidas.

3.3 Objetivos específicos

- Realizar una revisión bibliográfica relacionada con los mecanismos de apoptosis descritos hasta el momento asociados a crisis epilépticas.
- Determinar los procesos de apoptosis desencadenados en el hámster GASH:Sal, como consecuencia de las crisis convulsivas audiógenas.
- Estandarizar diversos protocolos relacionados con los procedimientos de obtención, procesado y análisis de muestras de tejido nervioso.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de abordar los objetivos descritos se ha planteado el siguiente diseño experimental:

- Para la revisión bibliográfica, se utilizaron diferentes bases de datos en las que se buscaron artículos que contuviesen determinadas palabras clave relacionadas con el tema de estudio.

- Para el estudio de la citoarquitectura y la posterior selección de los núcleos a analizar, se llevaron a cabo la técnica conocida como tinción de Nissl, que marca los cuerpos picnóticos y la tinción de acetilcolinesterasa.
- Para la caracterización de los procesos de apoptosis en las fases intermedias, se empleó la tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 activa.

Todas las técnicas de tinción se llevaron a cabo en el tejido obtenido de los distintos hámsteres que componían los diversos grupos de estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Revisión bibliográfica

Para la realización de la revisión bibliográfica se utilizaron las bases de datos Pubmed, Science direct, Google Scholar y varios artículos pertenecientes al laboratorio 12 del INCYL.

Las palabras clave empleadas para la búsqueda fueron “epilepsy”, “apoptosis”, “caspases”, “Nissl”.

Los criterios de selección de artículos se basaron tanto en el título como en la relevancia, es decir, el índice de impacto. Cuando se alcanzó un total de 65 referencias bibliográficas recopiladas se detuvo la búsqueda, procediendo a la selección más exhaustiva de todos los artículos tras una lectura del resumen de los mismos, descartando aquellos que no se ajustaban adecuadamente al objetivo y la temática del estudio. Finalmente el número total de referencias incluidas fue de 32.

Una vez descargados los artículos, se incluyeron en el gestor bibliográfico Zotero para su mejor clasificación, facilitando además su posterior inclusión en las referencias bibliográficas del texto.

5.2 Animales de experimentación

Los animales elegidos para realizar los diversos experimentos fueron hámsteres GASH:Sal del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, que durante las pruebas se trasladaron al Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL). Como controles, se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) suministrados por Charles River, Barcelona. Para la realización de los experimentos correspondientes a las tinciones de caspasa-3 activa y Nissl se hizo una distinción entre diversos grupos experimentales entre los cuales se encontraban:

- Grupo 1: hámsteres dorados control (n=5), que constituyeron el grupo nombrado como “hámsteres control”, de los cuales cuatro se utilizaron para realizar la tinción de caspasa-3 activa y uno para la tinción de Nissl.
- Grupo 2: hámsteres GASH:Sal con una única estimulación acústica (n=3), que conforman el grupo que pasó a denominarse grupo “GASH:Sal una estimulación”.

- Grupo 3: hámsteres GASH:Sal con estimulación acústica repetida (n=12), que se denominó grupo “GASH:Sal Kindling”. Este primer grupo se dividió a su vez en dos subgrupos (A y B) en los que se agruparon los animales en función de si dejaron o no de sufrir crisis en un momento determinado a pesar de continuar con las estimulaciones. De estos doce animales seis se emplearon para llevar a cabo la tinción de caspasa-3 activa y los otros seis formaron parte de los experimentos de tinción de Nissl.

La tinción de acetilcolinesterasa se realizó en hámsteres GASH:Sal no estimulados (n=2), es decir, en animales con epilepsia que no llegaron a ser sometidos en ningún momento a un protocolo de estimulación auditiva.

Los hámsteres tenían libre acceso tanto a la comida como al agua. Todos ellos fueron cuidados de acuerdo a la legislación española vigente para el cuidado de animales de laboratorio (RD 53/2013), aplicando también en todo momento las directrices europeas (2010/63/EU) para la protección de animales de experimentación. El proyecto forma parte de un trabajo más amplio que fue aprobado previamente por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. Todos los hámster empleados fueron machos (n=22) con una edad comprendida entre los dos y los cuatro meses.

5.3 Técnicas empleadas

5.3.1 Protocolo de estimulación auditiva

Para iniciar la estimulación acústica, los ejemplares se colocan en un cilindro de metacrilato transparente (altura 50 cm; diámetro 37 cm). Ésta se realiza con un sonido semialeatorio de 0-18 kHz con una intensidad de 115 a 120 dB SPL, reproducido por un ordenador que tiene acoplado un amplificador (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, España) y un altavoz de altas frecuencias (Beyma T2010, Valencia, España), que se encuentra ubicado en la parte superior de la arena cilíndrica. Tras un periodo de aclimatación de un minuto se somete a los animales al estímulo sonoro hasta el inicio de la crisis audiógena o pasado un minuto en caso de ausencia de crisis. La crisis se graba mediante una cámara digital (Sony TRV-8E) a 0,5 metros de distancia horizontal.

5.3.2 Protocolo kindling

En este protocolo, la técnica descrita previamente debe repetirse a lo largo de diez días consecutivos, dos veces al día a unas horas determinadas, que son las nueve de la mañana y las siete de la tarde.

5.3.3 Perfusiones

Finalizadas todas las pruebas, es necesario esperar una hora tras la última estimulación realizada en los grupos que corresponde, procediendo una vez transcurrido este tiempo a la obtención de las muestras, mediante la técnica conocida como perfusión, en la que se lleva a cabo una extracción del tejido cerebral para su posterior análisis histológico. Primeramente, se duerme al animal con una dosis de Dolethal® (0,3 ml), que deprime el sistema nervioso central como consecuencia de una disminución del consumo de oxígeno por el cerebro, por vía intraperitoneal. Comprobado el estado de arreflexia total en el animal, se perfunde transcárdialmente. Para ello, se coloca al animal en posición supina, sobre la superficie donde se va a realizar la intervención, que se inicia descubriendo la caja torácica procediéndose a la separación de la piel del tejido subyacente. Una vez que se consigue acceder al diafragma, éste se corta junto con las costillas. Antes de realizar cualquier tipo de incisión en el corazón, se debe inyectar en el mismo una pequeña dosis de heparina, que impide que se produzca la coagulación de la sangre. Posteriormente, se retira el pericardio mediante una incisión, después de lo cual se efectúa una nueva incisión esta vez en el vértice izquierdo del corazón, por donde se introduce la cánula de perfusión hasta que esta asoma por la aorta ascendente, donde se pinza para que no se mueva del sitio durante el procedimiento. Tras ello, se abre el paso de la primera solución, suero Ringer (NaCl al 0,9% en tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4), a través de la cánula, para después permitir el paso de la segunda, que es el fijador (200 ml de paraformaldehído al 4% en PB 0,1M). Todas estas soluciones se preparan previamente en el laboratorio. Finalizada la perfusión, se espera una hora aproximadamente, para iniciar la craneotomía extrayendo el encéfalo.

5.3.4 Obtención de secciones histológicas

El encéfalo se crioprotege durante 72 horas en sacarosa (30% en PB 0,1M a 4°C), para después proceder al corte del mismo, usando un microtomo (HM 400 de Microtom Heidelberg, Alemania) de congelación, con el que se obtienen cortes de cuarenta micras en el plano coronal. Para iniciar el proceso, se coloca el cerebro sobre una base de sacarosa, previamente congelada en el microtomo, situada en la superficie de corte. Poco a poco se va cubriendo con más sacarosa, de manera que se consigue que todo el tejido quede congelado en su totalidad. Al lado del microtomo se disponen seis pocillos con una solución de PB (0,1M pH 7,4) en los que se van colocando los cortes a medida que se van obteniendo de forma seriada. Durante todo el proceso, es necesario ir regulando la temperatura de manera que resulte sencillo realizar el corte. Al acabar, se guardan los pocillos en la nevera hasta que se necesiten. El microtomo se limpia aumentando la temperatura del microtomo de

manera que la placa congelada se deshace por completo, utilizando después alcohol, de manera que se evita que queden restos de la sacarosa utilizada.

5.3.5 Inmunohistoquímica

Es una técnica de tinción de cortes histológicos que aprovecha la capacidad de unión específica de determinados anticuerpos a una serie de moléculas, los antígenos, permitiendo la visualización de los mismos en las neuronas. El procesado inmunohistoquímico comienza con el bloqueo de los sitios posibles de unión inespecífica de los anticuerpos, para lo cual se realiza una incubación con suero bovino fetal (SBF) inactivado en Trizma® base salino con Tritón (TBS-TX) durante media hora en continua agitación, tras lo cual se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo primario durante tres días (Tabla 1). Posteriormente se efectúan varios lavados en TBS (0,1M pH 7,4) para seguidamente realizar una incubación con los denominados como anticuerpos secundarios biotinados específicos contra la inmunoglobulina de la especie en la que se fabricó el primer anticuerpo. Una vez transcurridas las correspondientes dos horas de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavan con Trizma® base, al que se añade HCl para ajustar el pH (TB), pasando a una solución que contenga el complejo avidina-biotina (ABC #PK4000, Vector Labs.). Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza usando como cromógeno diaminobenzidina (DAB), que, en presencia de H₂O₂, se oxida y produce un precipitado de color marrón. La prueba finaliza cuando se hacen tres lavados más en Tris, cada uno de los cuales tiene una duración de diez minutos.

Antígeno	Ig primario	Dilución	Referencia	Secundario	Dilución	Referencia
Caspasa	Rabbit Anti-Caspasa	1:1000	#9661 Cell Signaling Technology	Goat Anti-Rabbit	1:200	#673371 MP Biomedicals

Tabla 1. *Relación de anticuerpos usados en la inmunotinción.*

5.3.6 Tinción de acetilcolinesterasa

En este caso las secciones se procesan según el método histoquímico de la tiocolina para la determinación de la acetilcolinesterasa en neuronas y fibras [Karnovsky y Roots, 1964]. Este método, permite visualizar los tractos nerviosos al intensificarlos por la impregnación argénica que posee la técnica, lo que contribuye a delimitar los distintos núcleos.

5.3.7 Montaje de pocillos

Al finalizar la tinción, se procede al montaje de las secciones de cada pocillo en una serie de portaobjetos, que se rotulan con el número del hámster del que proviene el tejido cerebral, especificando también la técnica de tinción utilizada. Los cortes se van disponiendo en los portaobjetos siguiendo un orden caudo-rostral. Antes de colocar los distintos cortes en el portaobjetos, se vacía el contenido del pocillo correspondiente en una placa de Petri que contiene gelatina, que facilita el deslizamiento de los cortes por la superficie del portaobjetos para su correcta disposición en el mismo, labor para la cual se precisa la utilización de un pincel. A medida que se van llenando los portaobjetos, éstos se disponen en el interior de una caja para después introducir la misma en una estufa que se encuentra a una temperatura aproximada de treinta grados, de manera que la gelatina se seca por completo y los cortes quedan perfectamente adheridos. Una vez que se han secado por completo, se procede a la limpieza de posibles restos que hayan podido quedar en la superficie y que dificultarían la posterior visualización de los cortes a través de un microscopio. Hecho esto se procede a colocar el cubreobjetos y sellarlo, utilizando para ello una sustancia conocida como Entellan®, sobre la cual se coloca el cubreobjetos. Este último proceso es necesario llevarlo a cabo en el interior de una campana extractora.

5.3.8 Tinción de Nissl

El protocolo se inicia disponiendo los cortes seriados colocados y fijados ya en el portaobjetos en una especie de cestillas de plástico, donde se colocan los portaobjetos en vertical, que se sumergen en cubetas que contienen el colorante. Las cubetas que contienen el violeta de cresilo junto con los cortes sumergidos en ellas se introducen en una estufa que no debe estar a más de 37°C durante un periodo de tiempo de no más de diez minutos, de manera que el colorante pueda penetrar y teñir mejor las muestras. Finalizado ese periodo de exposición al colorante, las cestillas se van sumergiendo con los portaobjetos en diferentes cubetas con una gradación ascendente de alcohol. Una vez que se ha alcanzado el baño de alcohol absoluto se pasan las muestras a un baño de cloroformo, que se emplea para diferenciar la sustancia blanca y endurecer la gelatina. En caso de que sea necesario, se puede volver al alcohol de 96^a con ácido acético para mejorar el contraste entre la sustancia gris y blanca. Seguidamente, se llevan a cabo dos baños en alcohol absoluto, después de lo cual se pasa a xilol. Por último los portaobjetos se cubren, como se ha explicado.

5.3.9 Estudio del material histológico

Las secciones histológicas procesadas se observan en un microscopio Leica LB30T que se encuentra acoplado a una cámara Olympus DT70 que permite capturar imágenes de las secciones de

interés, las cuales se digitalizan con la ayuda del programa DPController vs 1.2.1.108. Los esquemas de inmunotinción y la composición de las distintas figuras se llevó a cabo con el programa Canvas 7.0. Como modelos para ordenar caudo-rostralmente las secciones y como referencias citoarquitectónicas se utilizaron el atlas estereotáxico de cerebro de hámster dorado [Morin y Wood, 2001] y las planchas seriadas procesadas histoquímicamente para visualizar la acetilcolinesterasa. Tras una primera observación al microscopio se hicieron unas nuevas planchas comparativas de los diferentes grupos de estudio, coloreando las diferentes zonas de cada núcleo, previamente seleccionadas, con diferentes tonos de gris en función del grado de tinción que se podía observar a simple vista. Para evaluar la intensidad de inmunotinción por densitometría, se realizaron fotografías con el objetivo de 40 aumentos en las regiones de interés a distintos niveles caudo-rostrales, siempre con las mismas condiciones de intensidad de luz.

5.3.10 Cuantificación densitométrica

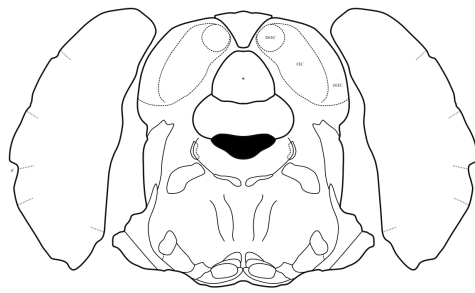
Para la cuantificación de la inmunotinción se llevan a cabo análisis densitométricos a partir de fotomicrografías originales convertidas a 8 bits con el programa ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_20 (32-bit)). Para la normalización densitométrica se empleó una escala de grises (#32599, Edmund industrial Optics) de la cual se tomaron fotografías de los distintos niveles de gris en las mismas condiciones de luz que las fotografías tomadas previamente de las secciones elegidas.

5.3.11 Análisis estadístico

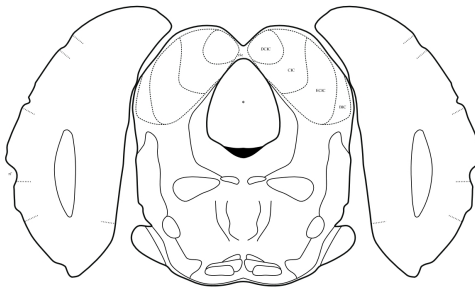
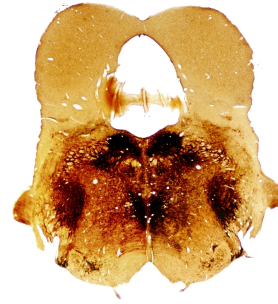
Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión 15.0 para Windows; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). La descripción y evaluación de los datos se efectuó mediante el valor de la media \pm error estándar de la media (SEM), tanto para variables continuas, como para frecuencias absolutas y relativas de variables categóricas. Se hizo una comparativa de los resultados obtenidos en los diferentes grupos haciendo uso del módulo ANOVA y, en los casos apropiados, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc. El nivel de significación estadística aceptado fue $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

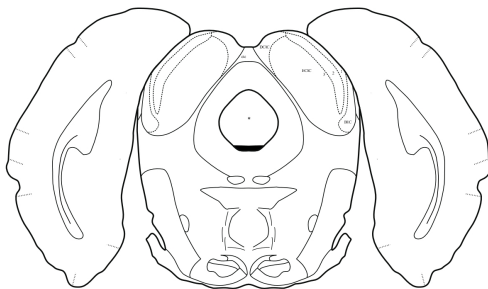
La revisión bibliográfica nos permitió adquirir conocimientos sobre las áreas más adecuadas del cerebro de hámster para el estudio, que son el colículo inferior, la sustancia gris periacueductal (Figura 2) y el hipocampo (Figura 3), con sus correspondientes niveles caudo-rostrales.



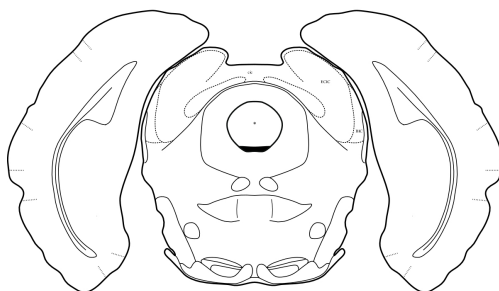
Bregma -6.0 mm



Bregma -5.7 mm



Bregma -5.4 mm



Bregma -5.2 mm

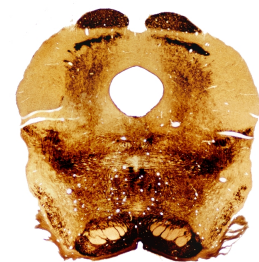
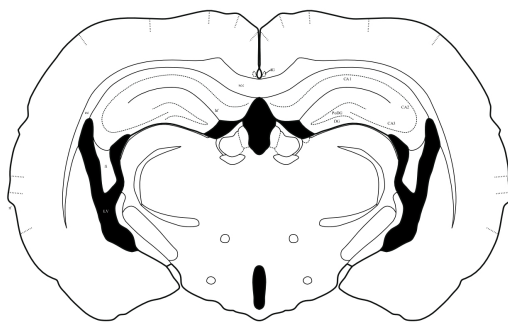
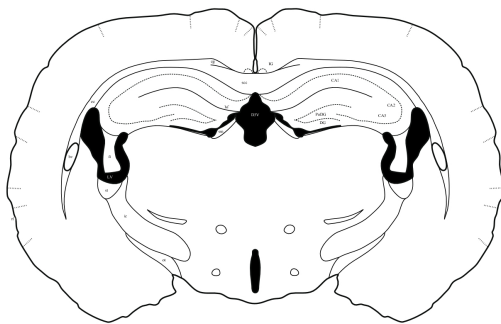
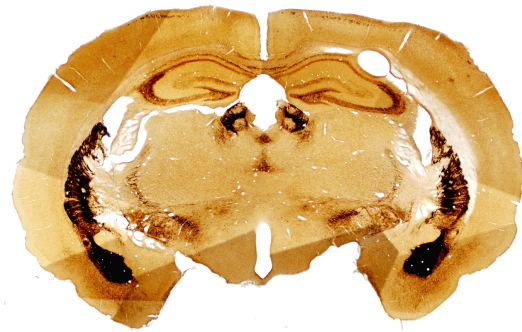


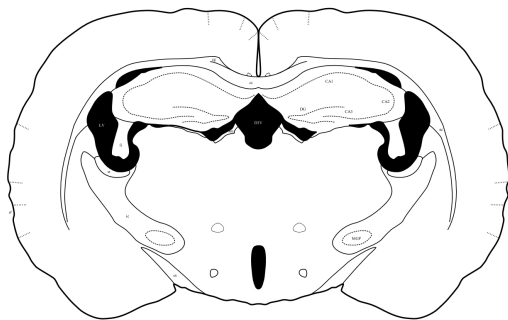
Figura 2. Esquema del atlas estereotáxico de hámster dorado de Morin y Wood (2001), correspondiente al colículo inferior (izquierda), utilizado en el estudio de la citoarquitectura, organizado en dirección caudo-rostral junto con los cortes correspondientes de la tinción de acetilcolinesterasa (AChE) (derecha).



Bregma -2.0 mm



Bregma -1.8 mm



Bregma -1.5 mm

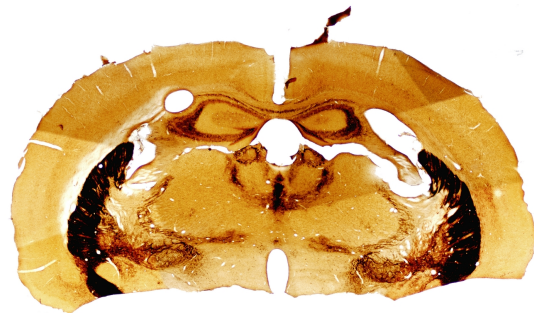


Figura 3. Esquema que muestra los cortes del atlas estereotáxico de Morin y Wood (2001), correspondientes al hipocampo (izquierda), organizados en dirección caudo-rostral junto con los cortes equivalentes de la tinción de acetilcolinesterasa (derecha).

Con el fin de hacer una valoración de la exactitud de esas áreas se realizó una doble tinción de Nissl y caspasa-3 activa, de manera que aquellas zonas útiles para el estudio debían encontrarse teñidas con ambas tinciones, es decir, que debían poder observarse cuerpos picnóticos en los lugares con

una mayor tinción de caspasa-3 activa. De esta manera se pudieron diferenciar con claridad los diferentes núcleos del cerebro (tinción de Nissl) en las cuales había una tinción de caspasa significativa. En la figura 4 las estructuras más intensamente teñidas son células en degeneración.

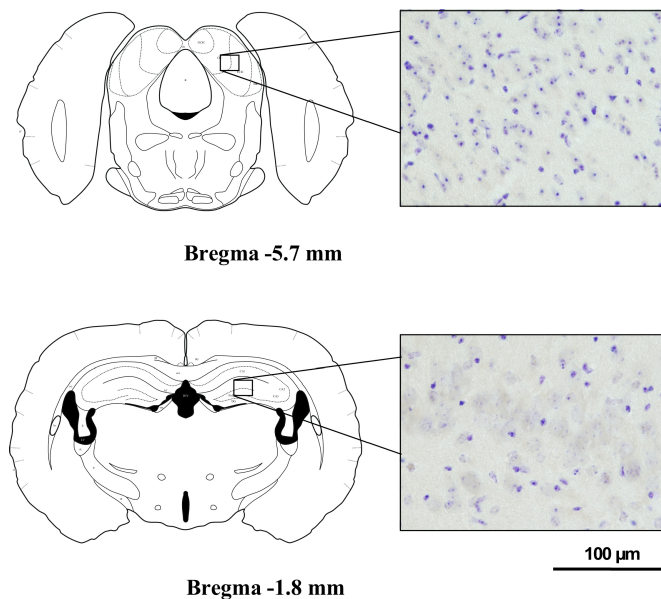


Figura 4. Doble tinción de caspasa-3 activa y Nissl en el colículo inferior y el hipocampo.

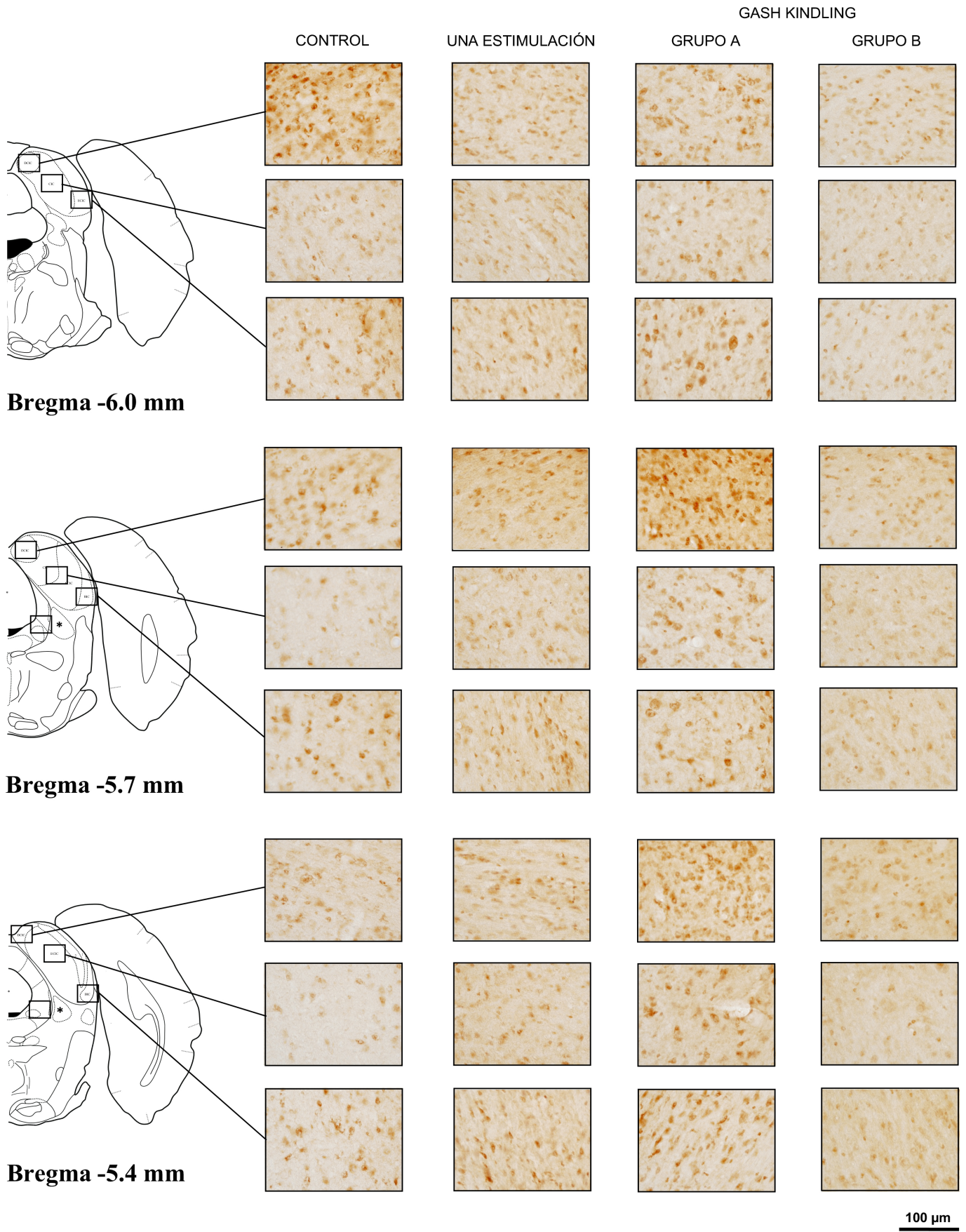
6.1 Distribución de marcadores apoptóticos en el cerebro del GASH:Sal

Se obtuvo un marcaje significativo en los tres núcleos previamente seleccionados, que fueron el colículo inferior, la sustancia periacueductal y el hipocampo.

6.1.1 Colículo inferior y sustancia gris periacueductal

En general, en el caso del colículo inferior (CI), tomando el núcleo entero, en cuanto a inmunotinción con caspasa-3, los grupos que presentaron una mayor inmunotinción son el GASH:Sal estimulado una única vez y el subtipo A de GASH:Sal kindling (Figura 6). Este último muestra diferencias significativas con el resto de grupos ($F_{3,60} = 5,02$, $p=0,004$). Dentro del colículo inferior, en todos los grupos, la región menos inmunoteñida es el núcleo central (NC), mientras que la que presentaba una mayor inmunorreactividad es la corteza dorsal (CD) (Figura 8). Entre los subgrupos A y B del GASH:Sal kindling, las diferencias se deben fundamentalmente a la tinción de la corteza dorsal ($F_{3,60} = 3,63$, $p=0,018$).

Analizando la inmunotinción en la sustancia gris periacueductal (PAG), se obtuvieron resultados que indicaron que ésta es mayor en el subgrupo A compuesto por aquellos GASH:Sal sometidos a kindling, que en el resto de grupos. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los mismos (Figura 9).



100 μ m

Figura 5A. *Inmunotinción de caspasa-3 activa del colículo inferior*

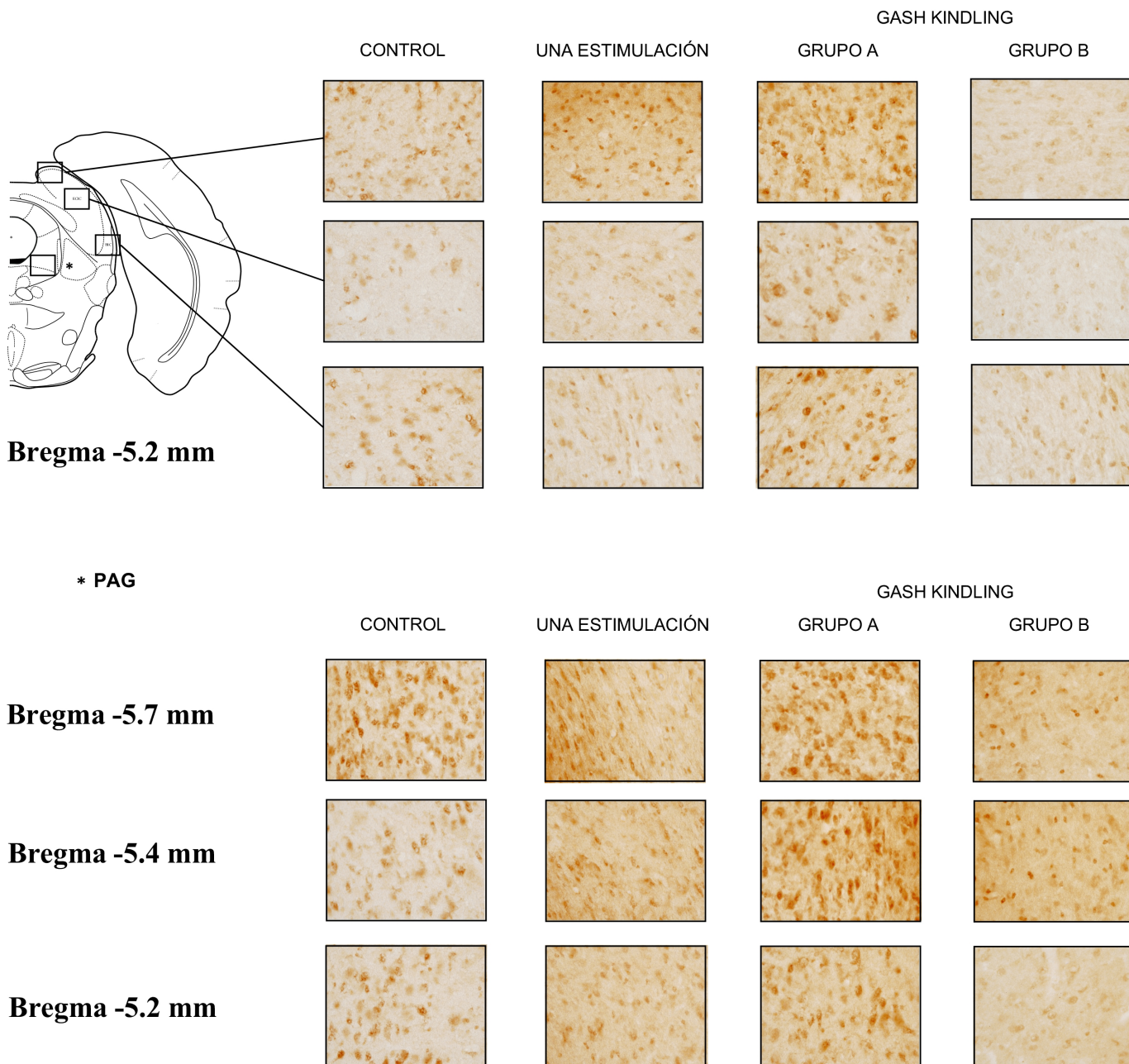


Figura 5B. *Inmunotinción de caspasa-3 activa del colículo inferior y de la sustancia gris periacueductal. Esquema mostrando las diferentes imágenes tomadas con el microscopio de las diferentes zonas seleccionadas, dentro del colículo, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas.*

Tras la obtención de los resultados se procedió a la realización de una serie de diagramas, de manera que se pudieran observar las diferencias de manera gráfica. Las líneas, sobre las cuales se dispone un asterisco unen aquellos grupos entre los que existen diferencias significativas, tal y como se ha explicado en el párrafo anterior.

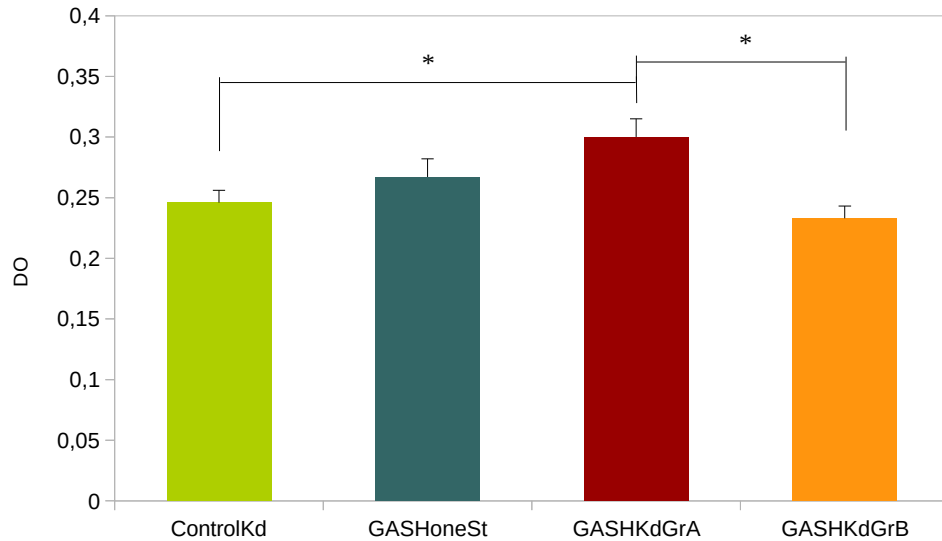


Figura 6. Cuantificación de la inmunotinción en el colículo inferior de caspasa-3 activa mediante la valoración de los niveles de grises por densidad óptica con el programa Image J.

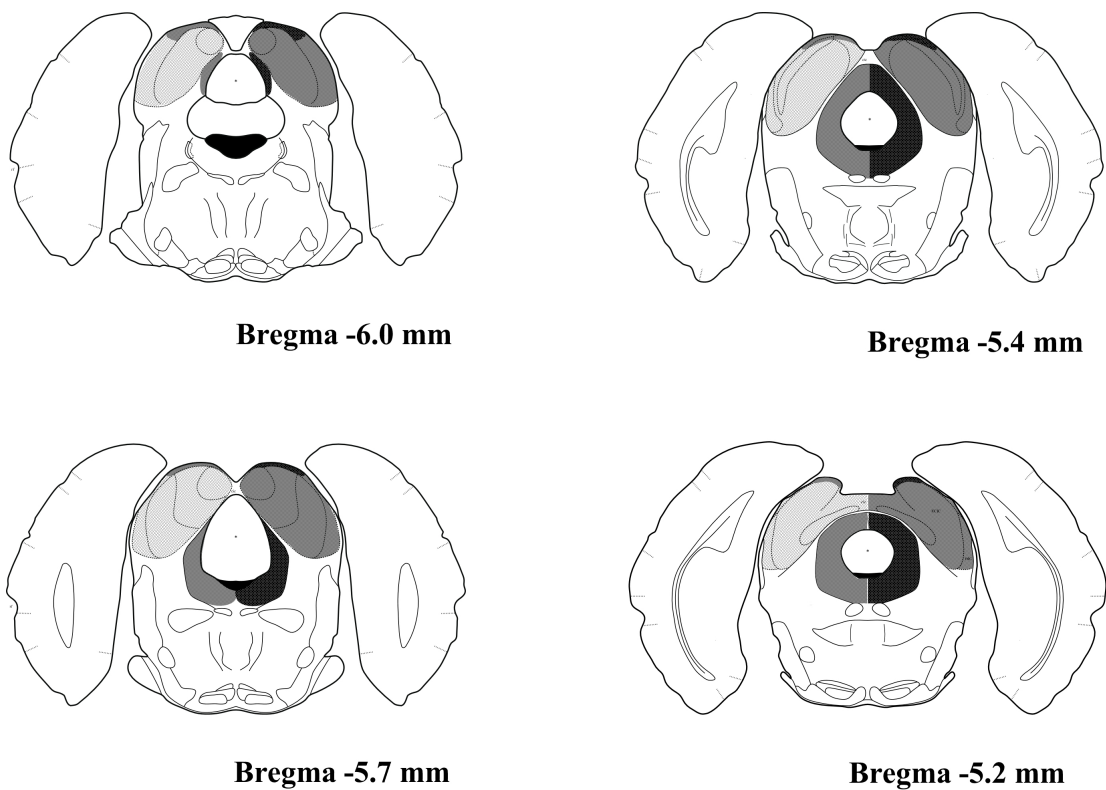


Figura 7. Comparativa realizada con el programa Canvas 7.0 tras la observación en el microscopio de diferentes cortes del colículo inferior a distintos niveles de bregma pertenecientes a animales de los grupos 1 (control) y 3 (GASH-Kindling A). El lado izquierdo corresponde con el grupo control, mientras que la parte derecha corresponde al primer subtipo del tercer grupo.

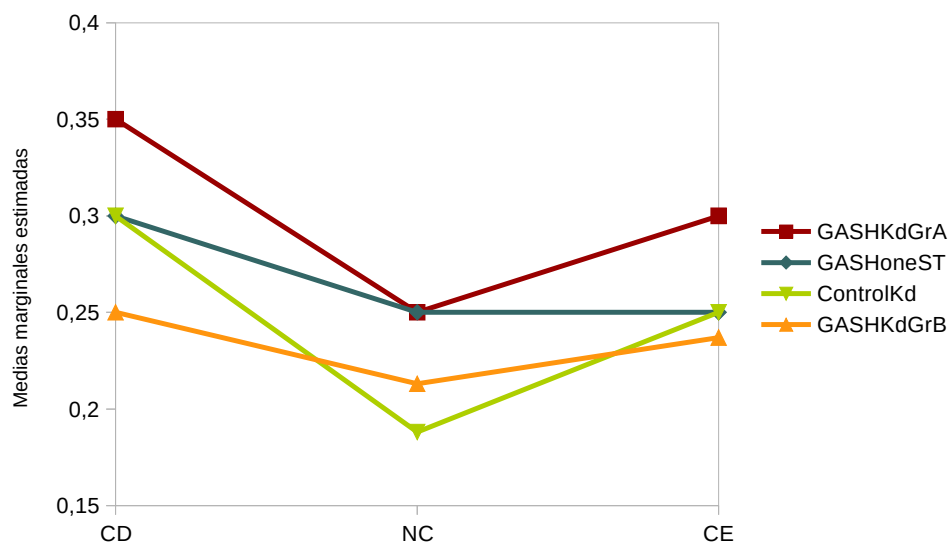


Figura 8. Cuantificación de la inmunotinción (D.O.) en las regiones del colículo inferior.

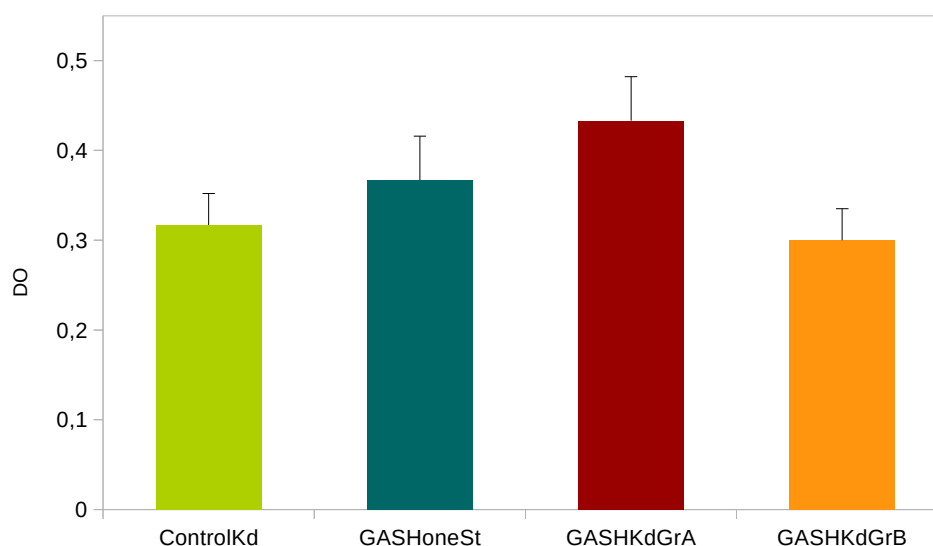


Figura 9. Cuantificación de la inmunotinción (D.O.) en la sustancia gris periacueductal.

6.1.2 Hipocampo

En el hipocampo (HYP), haciendo una media de todas las regiones estudiadas con caspasa-3 activa, se observó que el grupo que presenta una mayor inmunotinción es el subtipo A del tercer grupo, que posee diferencias significativas con el resto de grupos ($F_{3,56} = 15,49$, $p < 0,05$). El grupo control también se diferencia significativamente de los subtipos A y B del tercer grupo GASH:Sal kindling ($F_{3,56} = 15,49$, $p < 0,05$), pero no del GASH:Sal estimulado una única vez (Figura 11). Excepto en el giro dentado (GD), los dos subtipos del GASH:Sal kindling presentan diferencias significativas de inmunotinción en el resto de áreas hipocampales (CA1, $F_{3,56} = 2,8$, $p = 0,048$; CA2, $F_{3,56} = 6,3$, $p = 0,001$; CA3, $F_{3,56} = 5,75$, $p = 0,002$) (Figura 12).

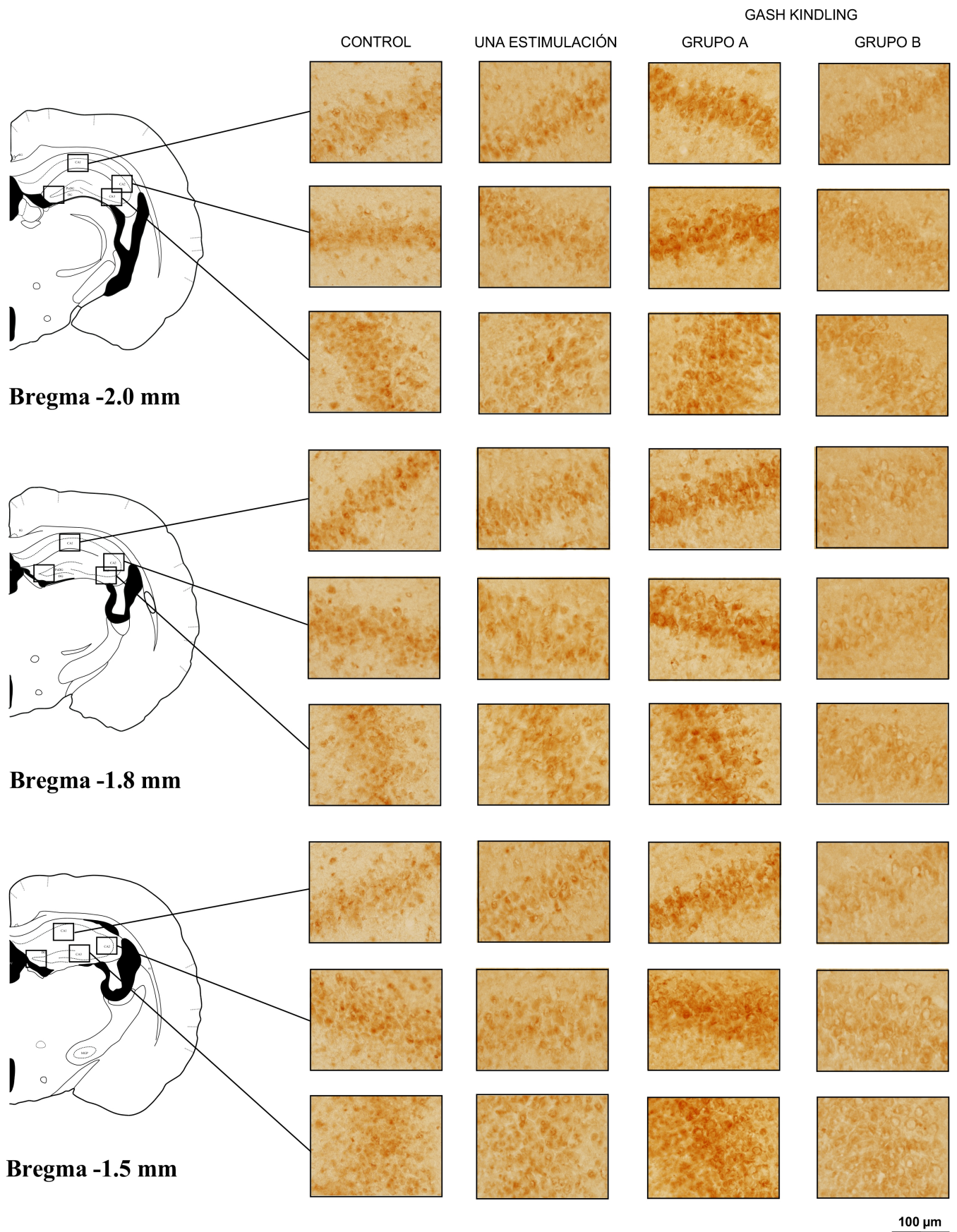


Figura 10A. *Inmunotinción de caspasa-3 activa en el hipocampo*

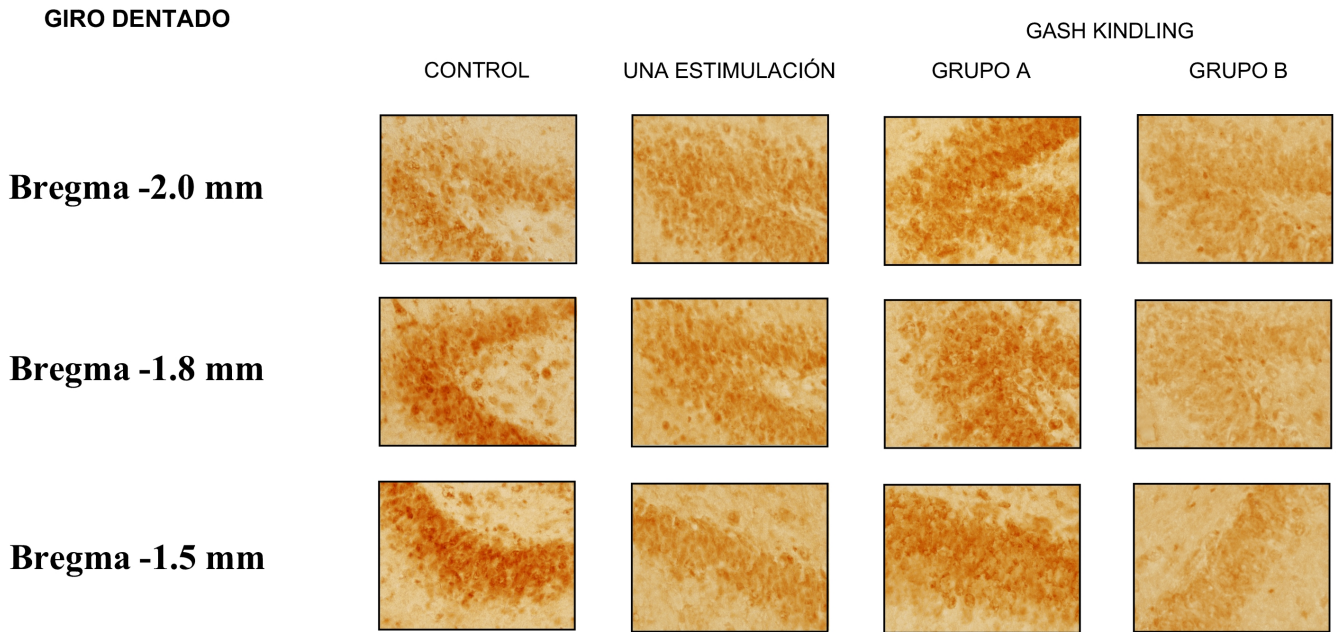


Figura 10B. *Inmunotinción de caspasa-3 activa en el hipocampo. Esquema que muestra las diferentes imágenes tomadas con el microscopio, mencionado anteriormente, de las diferentes zonas del hipocampo en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas.*

Al igual que con el colículo y la sustancia gris, tras el análisis de los resultados del hipocampo se llevaron a cabo las representaciones gráficas de los mismos, siguiendo el mismo esquema, uniendo aquellos grupos en los que se aprecian diferencias significativas con una línea en cuya parte superior se dispuso un asterisco.

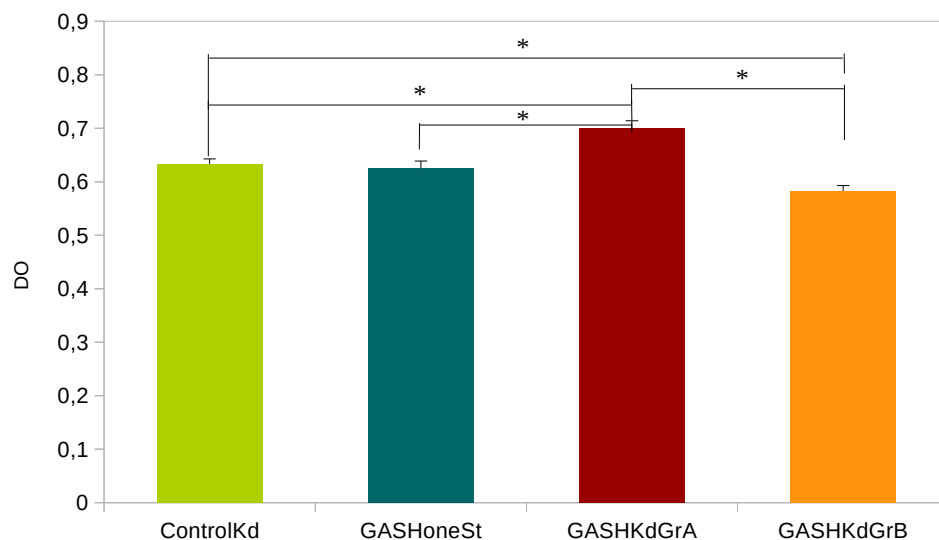


Figura 11. *Cuantificación de la inmunotinción en el hipocampo de la tinción de caspasa-3 activa mediante la valoración de los niveles de grises por densidad óptica con el programa Image J.*

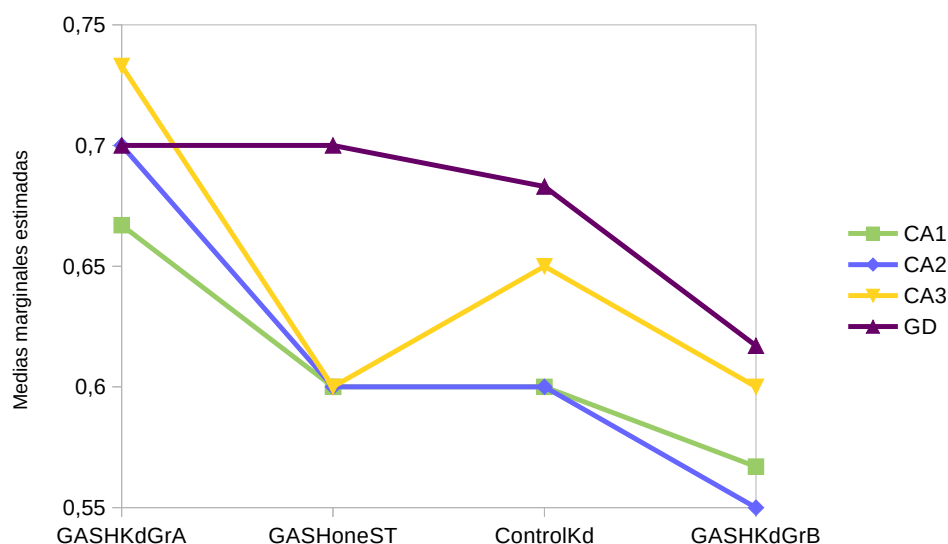


Figura 12. Resultados de la inmunotinción de caspasa-3 activa (D.O.) en las zonas de estudio en que se dividió el hipocampo. Se puede observar que la región que presenta una mayor inmunorreactividad es el giro dentado.

7. DISCUSIÓN

7.1 Discusión metodológica

La inmunotinción empleada para determinar la existencia o no de apoptosis y la distribución de marcadores apoptóticos dentro del cerebro del GASH:Sal se escogió tras comprobar su eficacia en otros estudios previos mediante la revisión bibliográfica, mencionada anteriormente. Dado que no existen estudios previos de inmunodetección en el cerebro del hámster fue necesario llevar a cabo una serie de pruebas. Una vez que se alcanzó el grado adecuado de puesta a punto del protocolo se procedió a la realización de los experimentos en el tejido obtenido.

El resto de técnicas empleadas se fundamentan en protocolos previamente estandarizados en el laboratorio 12 del INCYL.

7.2 Discusión de los resultados

Las zonas elegidas fueron el colículo inferior, la sustancia gris periacueductal y el hipocampo, dado que son las zonas más usadas en este tipo de estudios, debido a su participación en el desarrollo de las crisis convulsivas [Prieto Martín et al., 2015; Wada et al., 1970].

La inmunotinción para caspasa-3 en el colículo inferior fue significativamente diferente entre los subgrupos A y B del GASH:Sal kindling, lo que implica que existen claras diferencias entre

aquellos animales que durante el protocolo de estimulación dejaron de sufrir crisis y aquellos que continuaron teniéndolas hasta el fin de la prueba.

En el caso del hipocampo, al igual que en el colículo, se obtuvieron diferencias significativas entre los subtipos que componen el grupo GASH:Sal kindling. Además éstos presentan diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. Se observaron también diferencias entre el subgrupo A y el grupo correspondiente a una estimulación.

Los resultados, excepto en el caso del hipocampo, refrendaron la hipótesis de la que se partía, basada en experimentos previos, analizados durante la búsqueda bibliográfica [Filipkowski et al., 1994; Nobili et al., 2015], en la que se estimaba que, en todos los casos, el subtipo A del tercer grupo fuese el más inmunoteñido, seguido del grupo compuesto por los animales sometidos a una única estimulación, el grupo control y el subgrupo B, en orden decreciente de inmunorreactividad.

En el hipocampo el mayor marcaje del grupo control frente al de una estimulación puede explicarse a través de las funciones no apoptóticas de la caspasa-3 [Gulyaeva, 2003], como son la diferenciación neuronal, la migración y la plasticidad sináptica.

Para corroborar los resultados obtenidos, en futuros experimentos, se llevarán a cabo otros estudios que impliquen una serie de técnicas con las que puedan marcarse otros puntos, dentro del proceso de neurodegeneración, distintos de la caspasa-3.

8. CONCLUSIONES

1. La estimulación sonora intensa, que desencadena las crisis convulsivas, provoca la activación de la caspasa-3.
2. Existe una clara distinción dentro del grupo de GASH:Sal sometidos a kindling audiogénico entre el subtipo A y B, de los cuales los segundos dejaron de tener crisis en algún momento.
3. En el caso del hipocampo existen además diferencias entre el primer subgrupo, anteriormente mencionado, el grupo control y aquel conformado por los animales estimulados una única vez. El subtipo B de los GASH:Sal kindling presenta también diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. El particular marcaje obtenido en esta zona en el grupo control indica que puede no estar relacionado con el proceso de apoptosis.
4. La sustancia gris periacueductal fue la única zona en la que no hubo una clara distinción entre los grupos de estudio.


9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Barrera-Bailón, B., Oliveira, J.A.C., López, D.E., Muñoz, L.J., Garcia Cairasco, N. and Sancho, C.** Pharmacological and neuroethological studies of three antiepileptic drugs in the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal). *Epilepsy & Behavior*, 2013, 28(3), pp. 413-425. DOI: 10.1016/j.yebeh.2013.05.028
2. **Barrera-Bailón, B., Oliveira, J.A.C., López, D.E., Muñoz, L.J., Garcia-Cairasco, N. and Sancho, C.** Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamitrogine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH.Sal). *Epilepsy & Behavior*, 2016. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.11.005
3. **Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P. and Scheffer, I.E.** Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Comission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 2010, 51, pp. 676-685. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
4. **Carballosa-Gonzalez, M.M., Muñoz, L.J., Sancho, C., López-Alburquerque, T., Pardal-Fernández, M.J., Nava, E., de Cabo, C. and Lopez, D.E.** EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research*, 2013, 106(3), pp. 318-325. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2013.07.001
5. **Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.** Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 1989, 30(4), pp. 389-399. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1989.tb05316.x
6. **Cotter, T.G., Martin, S.J. and Vaux, D.L.** Techniques in Apoptosis: A User's Guide. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(12), pp. 499-499. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400228
7. **Filipkowski, R.K., Hetman, M., Kaminska, B. and Kaczmarek, L.** DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *NeuroReport*, 1994, 5(12), pp. 1538-1540. DOI: 10.1097/00001756-199407000-00032
8. **Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. and Engel, J.** Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 2005, 46(4), pp. 470-472. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x
9. **García-March, G., Sánchez-Ledesma, M.J. y Broseta, J.** Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde: Situación actual. *Neurocirugía*, 2008, 19(5), pp. 416-426. DOI: 10.4321/s1130-14732008000500002
10. **García-Ramos, R., García Pastor, A., Masjuan, J., Sánchez, C. y Gil, A.** FEEN: Informe sociosanitario FEEN sobre la epilepsia en España. *Neurología*, 2011, 26(9), pp. 548-555. DOI: 10.1016/j.nrl.2011.04.002
11. **Greenfield, J.G., Love, S., Louis, D.N. and Ellison, D.** *Greenfield's neuropathology*. 8th edition, London: Hodder Arnold, 2008. ISBN: 9780340906811

12. **Gulyaeva, N.V.** Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68(11), pp. 1171-1180. DOI: 10.1023/b:biry.0000009130.62944.35
13. **Henshall, D.C. and Simon, R.P.** Epilepsy and apoptosis pathways. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2005, 25(12), pp. 1557-1572. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600149
14. **Kannan, K., Kamiaski, N., Rechani, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. and Girol, D.** DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, 2001, 20(26), pp. 3449-3455. DOI: 10.1038/sj.onc.1204446
15. **Karnovsky, M.J. and Roots, L.** A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1964, 12(3), pp. 219-221. DOI: 10.1177/12.3.219
16. **Kerr, J.F., Willie, A.H., and Currie, A.R.** Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4), pp. 239-257. DOI: 10.1038/bjc.1972.33
17. **Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 1998, 60(1), pp. 619-642. DOI: 10.1146/annurev.physiol.60.1.619
18. **Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C.** *Robbins basic pathology*. 9th edition, Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN: 9780808924326
19. **Löschner, W.** Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs: A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 2002, 50(1), pp. 105–123. DOI: 10.1016/s0920-1211(02)00073-6
20. **Magdaleno-Madrigal, V.M., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Martínez, A., Almazán, S., Fernández-Mas, R. and Fernández-Guardiola, A.** Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia*, 2004, 43(9), pp. 964-969. DOI: 10.1046/j.1528-1157.2002.05702.x
21. **Moog, J.C. y Ochoa, J.W.C.** ¿Qué es la epilepsia refractaria?. *Iatreia*, 2003, 16(2), pp. 163-167. Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/3998/3713>
22. **Morin, L.P. and Wood, R.I.** *The Golden Hamster Brain*. 1st edition, San Diego: Academic Press, 2001. ISBN: 0125070403
23. **Muñoz, L.J., Carballosa-Gautam, M.M., Yanowsky, K., Garcia-Atarés, N. and López, D.E.** The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy & Behavior*, 2016. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.03.002
24. **Naval, J., Marzo, I. y Anel, A.** Mecanismos celulares de muerte celular programada. *Haematologica*, 2004, 89, pp. 127-133. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-haematologica-49-articulo-apoptosis-mecanismos-celulares-e-implicaciones-13066671>
25. **Nobili, P., Colciaghi, F., Finardi, A., Zambon, S., Locatelli, D. and Battaglia, G.S.** Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 2015, 83, pp. 54-66. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.002

26. **Prieto-Martín, A.I., Prieto-Martín, A., Aroca-Aguilar, J.D., Sánchez-Sánchez, F., Muñoz, L.J., López, D.E., Escribano, J. and de Cabo, C.** Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains. *Epilepsy & Behavior*; 2015. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.05.025
27. **Ross, R. and Glomset, J.A.** The pathogenesis of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 1976, 295(7), pp. 369-377. DOI: 10.1056/nejm197608122950707/10.1056/nejm197608192950805
28. **Ross, R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362(6423), pp. 801-809. DOI: 10.1038/362801a0
29. **Salas-Puig Mateos, V., Amorín, M., Calleja, S. and Jiménez, L.** Reflex epilepsies. *Rev Neurol.*, 2000, 30(Supl 1), pp. 85-89. Disponible en: <https://www.neurologia.com/articulo/2000227>
30. **Sloviter, R.S.** Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? *Epilepsia*, 2009, 50(Supl 12), pp. 11-13. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02363.x
31. **Soria Milla, M., Macías Fernández, J.A. y Aguirre Berrocal, A.** Epilepsia audiogénica en una cepa endogámica de hámster dorado. *Rev Esp. Epilepsia*, 1987, 2, pp. 27-33.
32. **Wada, J.A., Terao, A., White, B. and Jung, E.** Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Experimental Neurology*, 1970, 28(2), pp. 326-332. DOI: 10.1016/0014-4886(70)90240-2

ANEXOS

Anexo 1	Video crisis GASH:Sal
<p data-bbox="194 378 1477 472">Escanee el siguiente código QR con el móvil para poder visualizar un vídeo en el que se muestra el desarrollo de una convulsión audiogénica en el modelo animal de estudio.</p>  <p data-bbox="296 875 1374 913">Para la visualización del vídeo se recomienda la aplicación “QR Barcode Scanner”.</p>	