



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
DE CASTILLA Y LEÓN (INCYL)**

**Hacia un nuevo modelo de epilepsia:
El hámster GASH:Sal**

Melissa M. Carballosa González

Salamanca, 2008



Universidad de Salamanca
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE
CASTILLA Y LEÓN

C/ Pintor Fernando Gallego, nº 1.

Los abajo firmantes, Dra Dña M^a Dolores E. López García y Dr. D. Luis Muñoz de la Pascua, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “*Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH:Sal*”, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Melissa Carballosa González, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 4 de Noviembre de 2008

Fdo:

Dra. M^a Dolores E. López

García García

Fdo:

Dr. Luis Muñoz de la

Pascua

Para la planificación, realización y redacción de este trabajo de investigación hemos obtenido financiación de diversas instituciones, sin cuya ayuda que no hubiera sido posible: Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2007-65210), Junta de Castilla y León (SAN191/SA24/06 y GR221), y Fundación Mutua Madrileña.

El equipo de telemetría empleado en esta trabajo de tesis doctoral ha sido cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional y el Ministerio de Educación y Ciencia.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	8
ABREVIATURAS	11
I. INTRODUCCIÓN	15
1. Generalidades sobre la epilepsia	18
2. Anomalías encontradas en los pacientes con epilepsia	19
<i>2.1 Alteraciones en la actividad eléctrica del Sistema Nervioso (Patrón EEG)</i>	<i>21</i>
<i>2.2 Alteraciones bioquímicas o metabólicas</i>	<i>24</i>
<i>2.3 Alteraciones genéticas</i>	<i>25</i>
3. Modelos animales de epilepsia	29
<i>3.1 Cómo pueden los modelos animales usarse para comprender la patogenicia y el tratamiento de la epilepsia</i>	<i>29</i>
<i>3.2 Modelos actuales de epilepsia</i>	<i>32</i>
4. Crisis audiógenas de origen genético	39
<i>4.1 Caracterización del comportamiento en las crisis audiógenas</i>	<i>39</i>
<i>4.2 Substratos anatómicos y neuroquímicos de las crisis audiógenas</i>	<i>40</i>
5. El hámster GASH:Sal	46
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	45
1. Hipótesis	50
2. Objetivos	52
III. MATERIAL Y METODOS	52
1. Diseño Experimental	53
2. Animales de experimentación	54
3. Técnicas empleadas	55
<i>3.1. Medición de capacidad auditiva (ABR)</i>	<i>55</i>
<i>3.2. Obtención de electroencefalograma</i>	<i>56</i>

3.2.a. Sistema de radiotelemedría y grabaciones de vídeo	56
3.2.b. Implantación de la unidad de telemetría	58
3.2.c. Adquisición de datos electroencefalográficos	60
3.2.d. Análisis de los datos	61
3.2.e. Análisis estadístico	61
3.3. <i>MicroPET y Resonancia magnética</i>	62
3.3.a. Adquisición de la imagen metabólica	62
3.3.b. Análisis de imagen	64
3.4. <i>Estudios histológicos</i>	64
3.4.a. Obtención de muestras	64
3.4.b. Técnicas de inmunotinción	64
3.4.c. Analisis cualitativo	66
3.4.d. Analisis cuantitativo	67
3.5. <i>Obtención y análisis de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción (AFLP)</i>	68
3.5.a. Extracción y purificación de ADN	68
3.5.b. Técnica de AFLP	70
3.5.c. Secuenciación automática de ADN	71
3.5.d. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos	72
IV. RESULTADOS	73
1. Estudio de las respuestas auditivas troncoencefálicas	74
1.1. <i>Umbrales auditivos</i>	76
1.2. <i>Velocidad de conducción</i>	77
1.3. <i>Audiograma</i>	80
2. EEG	82
3. AFLP	87
4. Detección inmunohistoquímica de la proteína Fos	93
5. Análisis de las tomografías por emisión de positrones	97
V. DISCUSION	
Capacidad auditiva de los GASH:Sal	101
Electroencefalogramas de los GASH:Sal durante las crisis epilépticas	105

Variabilidad genética de los GASH:Sal	109
Estructuras cerebrales implicadas en las crisis epilépticas	111
El futuro de los GASH:Sal	117
VI. CONCLUSIONES	120
VII. BIBLIOGRAFIA	121
VIII. ANEXOS	139

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis M^a Dolores E. López y Luis Muñoz de la Pascua, por permitirme realizar este trabajo y abrir lo que espero sea una gran línea de investigación. Por guiarme y cuidarme durante estos últimos años.

Quiero también agradecer al “Profesor Anchieta” por compartir su gran conocimiento del mundo histológico. Su paciencia y dedicación me han ayudado a estar en el puesto que estoy hoy.

Al Dr. Merchán por recibirme en su laboratorio y ser mi primer tutor en Salamanca en aquella época del Máster “on-line”.

Gracias también a Drs. López-Novoa y Pérez Barriocanal quienes me han abierto las puertas de su laboratorio y permitido utilizar el sistema de telemetría.

Al Dr. Javier Herrero Turrión que me ha ayudado en la realización de las PCRs.

A la Dra. Kira Yanoqsky que me ha enseñado la técnica de AFLP y con quien he pasado horas sin fin encerrada en el “bunker”.

A mis amigos, Bivi, Pancho, y Aline por las risas, comidas y buenas noches pasadas.

A mis compañeros de laboratorio, Dr. Orlando Castellano y Med Arji, por estar presentes durante la realización de los experimentos, compartiendo experiencias y ayudándome cuando lo necesitaba. También a los otros integrantes del TAM, Consuelo y Toño, por compartir la ilusión en el trabajo.

A los Drs. Tomás López Alburquerque, Alessandro Villa y Norberto García Carrasco, por sus sabios consejos en el análisis e interpretación de los electroencefalogramas

A Nacho, por todos los consejos recibidos en el laboratorio y por ser siempre paciente con mis torpezas y exquisitamente amable conmigo.

Al los técnicos del PET de Salamanca, por su paciencia y amabilidad en el inicio de las pruebas. Al Dr Miguel Angel del Pozo y a sus colaboradores del la Unidad de Imagen Molecular del Instituto pluridisciplinar de la UCM, ayudarme a finalizar la adquisición de imágenes de PET.

Al Departamento de Biología Celular y Patología y al Instituto de Neurociencias, por haberme permitido se parte de ellos, aún sin tener un estatus de becaria definido, y compartir sus recursos e instalaciones.

A mi mamá y abuelita, que sin su apoyo en mis locuras, nunca hubiera llegado a Salamanca ni habría podido llegar hasta este feliz término.

ABREVIATURAS

ABC- complejo avidina biotina

ABR- auditory Brain Response

AFLP análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos obtenidos por diversas enzimas de restricción

AMOVA- análisis molecular de varianza

AMPA- ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

Bq- becquerelio

CCA- crisis convulsivas audiogénicas

CCI- células ciliadas internas

CCE- células ciliadas externas

CI- colículo inferior

CNS- sistema nervioso central

CPCS- capas profundas del colículo superior

DAB- 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobencidina

DAEs- drogas anti-epilépticas

dB- decibelio

d.f.-grados de libertad

DG- 14C-deoxyglucose

ECG- electorcorticograma

EEG- electroencefalograma

EIG- epilepsias idiopáticas generalizadas

ELT- epilepsia de lóbulo temporal

EMG- electromiograma

EMJ- epilepsia mioclónica juvenil

EPG- epilepsia generalizada primaria

ESM- error estándar de la media

FDG- fluorodeoxiglucosa

FEpi- línea de pollos Fayoumi

FFT- transformada rápida de Fourier

FR- formación reticular

FST- índice de fijación de Wright

GABA- ácido gamma-aminobutírico

GAER- rata con epilepsia de ausencia de origen genético

GEPR- rata genéticamente propensa a la epilepsia

GluR3- receptor de glutamato 3

GluR4- receptor de glutamato 4

GPG/Vall- línea de hámster genéticamente propenso a la epilepsia (Valladolid)

HB- diversidad génica entre de las poblaciones

HT- heterocigosis total

H_w- diversidad génica intra-poblacional

Hz- hertzio

ILAE- Liga Internacional contra la Epilepsia

i.p.- intraperitoneal

KA- ácido kaínico

LVG (SIR)- hámster sirio dorado Lakeview

mm- milímetros

MRI- imagen por resonancia magnética

mV- milivoltios

NCIC- núcleo central del colículo inferior

NER- rata epiléptica Noda

NGS- suero normal de cabra

NMDA- ácido N-metil-D-aspartato

OHCs- células ciliadas externas

PET- tomografía de emisión de positrones

PhiPT- proporción de varianza entre la población relativa a la varianza total

PILO- pilocarpina

PLP- fosfato del piridoxal 59

PND- días post-natal

pps- pulsos por segundo

SGP- sustancia gris periacueductal

SPL- nivel de presión del sonido

TF- tampón fosfato

TFS- tampón fosfato 0,1M pH 7,4 con solución salina al 0,9 %

TNAP- carencia tisular de fosfatasa alcalina

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre la epilepsia

La epilepsia es una de las patologías más comunes del cerebro (World Health Organization, 2005). Una de cada diez personas sufrirá por lo menos un ataque epiléptico durante su vida, y una tercera parte desarrollará epilepsia. Según la Organización Mundial de la Salud, La epilepsia afecta 50 millones de personas en todo el mundo y constituye el 1% de la carga global de enfermedades, una tasa equivalente al cáncer de mama en mujeres y al cáncer de pulmón en hombres (Murray y López, 1994). La epilepsia es conocida desde antigüedad; un texto Asirio-Babilónico escrito hace tres milenios proporciona ya una descripción clínica exacta de la enfermedad (Wilson y Reynolds, 1990), y los médicos hindúes y chinos en esa época estaban también familiarizados con ella. La palabra “epilepsia”, deriva del verbo griego *epilamvanein* (ser agarrado, ser atacado). Esta terminología provenía de la antigua noción de que todas las enfermedades se debían a la acción de los dioses o espíritus diabólicos, generalmente como castigo. Dado que las crisis constituían el ejemplo más vivo de la posesión demoníaca, la epilepsia se llegó a denominar “la enfermedad sagrada” y ya en el siglo V después de Cristo, la palabra había adquirido gradualmente el significado específico y particular que se asocia a esta enfermedad hoy en día. Comparando con los avances hechos durante el siglo pasado, hay que considerar cuán de grandioso y fundamental fue el primer paso atribuido a Hipócrates acerca de la etiología de la enfermedad, ~ 400 A.C., quien dijo que la epilepsia era una

enfermedad del cerebro que debía ser tratada con dieta y fármacos, y no mediante encantamientos religiosos.

La epilepsia no representa una enfermedad específica, ni siquiera un sólo síndrome, sino un conjunto amplio de ellos causados por desórdenes cerebrales, que pueden ser a su vez secundarios a una gran variedad de procesos patológicos. Los términos “desorden convulsivo”, “crisis convulsivas” y “crisis cerebrales”, que se utilizan a menudo como sinónimo de epilepsia, se refieren a episodios paroxísticos recurrentes a causa de una disfunción cerebral y manifestados por estereotipias en el comportamiento. Los conceptos modernos de epilepsia derivan de trabajos realizados a mediados del siglo XIX por numerosos médicos y científicos, el más importante de ellos, John Hughlings Jackson. En un momento en que se consideraba epilepsia a los desórdenes consistentes en convulsiones generalizadas, y éstos se atribuían a disfunciones en el bulbo raquídeo, Hughlings Jackson estableció diversas categorías de crisis, cada una con su propia fisiología y semiología. Su explicación de los llamados “estados soñadores” como crisis focales, que se originan en áreas concretas dentro de la corteza cerebral coincide con lo que actualmente se piensa de las crisis límbicas. De igual modo, su reconocimiento de las crisis focales motoras (crisis jacksonianas), no sólo sirvió para identificar el lugar responsable dentro del cerebro, sino también permitió bosquejar las inferencias que han cambiado para siempre nuestros conceptos sobre la representación cortical motora y el control cerebral del movimiento voluntario. Hughlings Jackson, más que cualquier otra persona, estableció un acercamiento científico al estudio de los fenómenos epilépticos.

Hoy, una gran cantidad de fenómenos clínicos se catalogan como *ataques* epilépticos, algunos de ellos (ej., las crisis mioclónicas y atónicas) son actualmente mal entendidas y podrían, de hecho, reflejar mecanismos neuronales algo diferentes de los procesos fisiopatológicos considerados tradicionalmente como epilépticos. Una variedad de condiciones o de *epilepsias*, han sido categorizadas y definidas no sólo por los tipos de crisis manifiestadas, sino también por otras características clínicas asociadas. Los síndromes epilépticos específicos tienden a ser identificados por sus tipos de crisis característicos, el patrón de repetición de la crisis, la edad de inicio, los síntomas clínicos y neurológicos asociados, el electroencefalograma, la presencia o ausencia de episodios familiares y su pronóstico.

Hoy en día, las epilepsias y los síndromes epilépticos se dividen de forma genérica en desórdenes *idiopáticos* y *sintomáticos*.

Las *epilepsias idiopáticas*, son generalmente benignas en el sentido que no están asociadas a lesiones cerebrales o anomalías neurológicas con excepción de las propias crisis, tendiendo a ser autolimitadas y a responder fácilmente a los fármacos antiepilépticos. Los factores genéticos son importantes y las manifestaciones están típicamente relacionadas con la edad.

Las *epilepsias sintomáticas*, son aquellas, en las cuales las crisis son la consecuencia de una lesión identificable u otra etiología física o metabólica demostrable. Cuando las epilepsias son, probablemente sintomáticas pero actualmente se desconoce su etiología, se denominan criptogénicas, (ILAE, 1989). Ha habido muchas tentativas para obtener un consenso en las definiciones del ataque epiléptico y de la epilepsia. Recientemente, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) ha propuesto las nuevas definiciones para ambos (Fisher y cols.,

2005). En esta propuesta, un ataque epiléptico se define como un “*episodio transitorio de signos y/o síntomas debidos a una actividad neuronal excesiva o asincrónica en el cerebro*”. Esta definición, reconoce que los conceptos anteriores de inhibición disminuida y de excitación creciente eran simplificaciones excesivas, dado que la inhibición aumenta realmente en algunas formas de epilepsia, en la que la inhibición fásica constituye un elemento central en la anormalidad epileptogénica primaria. Un ataque epiléptico puede también ser, una respuesta natural del cerebro a un trastorno transitorio en su función y por tanto, no es necesariamente un desorden epiléptico. Tales crisis se refieren a menudo como sintomáticas, reactivas, o agudas.

La epilepsia es un grupo de condiciones neurológicas, cuyas características fundamentales son la recurrencia de ataques, generalmente no provocados, con convulsiones epilépticas. Tienen que suceder dos o más crisis no provocados con más de 24 horas de separación para que se englobe como epilepsia (ILAE, 1993).

Sin embargo, las nuevas propuestas del ILAE (Fisher y cols., 2005) ofrecen una definición más fundamental de la epilepsia: “*condición crónica del cerebro caracterizada por una propensión a generar convulsiones epilépticas, así como por las consecuencias neurobiológicas, cognoscitivas, psicológicas, y sociales de esta condición*”. Esta definición acentúa la existencia de una anormalidad epileptogénica intrínseca y persistente, que es una característica del cerebro en sí mismo y se presenta así, incluso cuando no están ocurriendo las crisis. Esto contrasta con las crisis que son dependientes de traumas agudos u otras condiciones que afectan transitoriamente a un cerebro normal. Sin embargo, una anormalidad epileptogénica intrínseca del cerebro y necesaria para un diagnóstico

de la epilepsia, puede resolverse espontáneamente, como en algunas epilepsias idiopáticas relativas a la edad que remiten de forma típica.

Así, la epilepsia es una entidad heterogénea con una gran variación en etiología y características clínicas. La ILAE divide las crisis en dos categorías principales: crisis parciales, es decir, crisis focales o relacionadas con la localización, y crisis generalizadas (Tabla 1).

Las *crisis parciales* se producen a partir de una descarga originada en una región o foco específico del cerebro, y manifiestan síntomas focales.

Las *crisis generalizadas*, comienzan probablemente en el tálamo y otras estructuras subcorticales, y en los registros electroencefalográficos (electroencefalogramas o EEG), pueden comenzar simultáneamente en ambos hemisferios cerebrales, manifestando síntomas bilaterales en el cuerpo y se asocian siempre a la pérdida de la consciencia. Las crisis parciales pueden generalizar secundariamente y dan lugar a actividad tónico-clónica. Algunas crisis parciales se generalizan rápidamente, y la fase parcial de la convulsión puede no ser fácilmente evidente de forma clínica o en los EEG. Sin embargo, las crisis parciales secundariamente generalizadas no se incluyen en la categoría de crisis generalizados, las cuales incluyen solamente las crisis generalizadas primarias.

Las crisis convulsivas generalizadas pueden clasificarse como atónicas, tónicas, clónica, tónico-clónicas, mioclónicas o de ausencia, en base a síntomas clínicos y anomalías de EEG. Las crisis tónicas se distinguen por la contracción rígida de músculos, incluyendo los músculos respiratorios, y son generalmente breves. Las clónicas se caracterizan por las contracciones rítmicas

musculares y duran más tiempo. Junto a ellas, las crisis tónico-clónicas generalizadas (fig. 1) también llamadas “grand mal” son las más dramáticas, comunes y más conocidas dentro de las crisis generalizadas.

Probablemente, la epilepsia generalizada puede iniciarse por tres mecanismos distintos: (1) respuesta anormal de una región de la corteza cerebral hiperexcitable a un estímulo normal del tálamo, (2) estímulo subcortical primario, e (3) inervación cortical anormal de las estructuras subcorticales.

Fisiológicamente, una crisis es consecuencia de una descarga eléctrica paroxística de alto voltaje en neuronas susceptibles dentro de un foco epileptogénico. Estas neuronas se sabe que son hiperexcitables y, por razones desconocidas, permanecen en un estado de despolarización parcial. Las neuronas que rodean el foco epileptogénico son GABA-érgicas y están hiperpolarizadas, inhibiendo a las neuronas epileptogénicas. Ocasionalmente, cuando las neuronas epileptogénicas superan la influencia inhibitoria circundante, las corrientes se difunden a las estructuras corticales vecinas y de ahí a las estructuras subcorticales y del tronco cerebral.

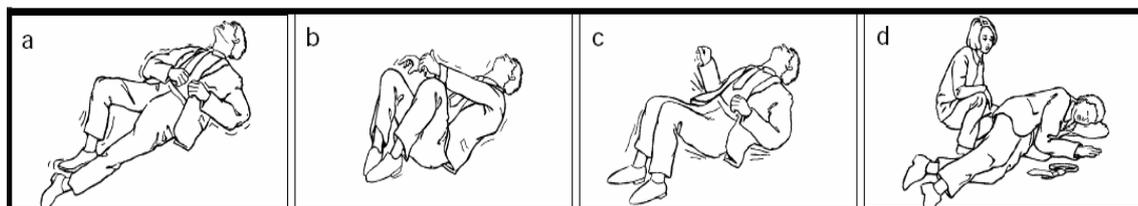


Fig. 1 Crisis tónico-clónica generalizada. (a) Pérdida de consciencia, flexión de los brazos hacia arriba y extensión. (b) Rigidez tónica por algunos segundos. Movimientos sincrónicos de contracción-relajación de grupos musculares (fase clónica). (c) Las convulsiones disminuyen de ritmo y pueden parar del todo. (d) El hombre ha sido colocado de lado para facilitar la respiración y mantener la vía aérea despejada.

2. Anomalías encontradas en pacientes con epilepsia

2.1. Alteraciones en la actividad eléctrica del Sistema Nervioso (Patrón EEG)

A un nivel básico, la excitabilidad cortical y los patrones eléctricos están genéticamente especificados, y, es probable, que cada patrón electroencefalográfico identificable sea un rasgo hereditario o esté compuesto de una combinación de ellos. Hasta ahora, no se ha identificado ningún “locus” génico específico en seres humanos como sincronizador del ritmo normal o anormal del cerebro. En una línea de ratones mutantes “mocha”, se ha descubierto un patrón electroencefalográfico espontáneo y sincronizado que es regulado por un solo locus recesivo (Noebels y Sidman, 1989). También, un defecto en un solo locus génico puede dar lugar a actividad electroencefalográfica generalizada (onda-pico) en ratones mutantes, habiendo sido identificados algunos loci independientes que dan lugar a patrones EEG fenotípicamente similares, y, a cada uno de éstos, se le asocian diversas anormalidades en la excitabilidad celular (Camfield y cols., 1978). En términos de epilepsia, en la actualidad parece claro que los síndromes epilépticos raros hereditarios presentan anormalidades monogénicas definibles. Es también evidente, sin embargo, que la susceptibilidad epiléptica refleja alteraciones complejas en múltiples factores que gobiernan la excitabilidad neuronal. Actualmente, los EEG constituyen un método fácilmente disponible para detectar una tendencia anormal de enfermedad en individuos asintomáticos, o bien para establecer la base fisiológica de personas con crisis convulsivas o epilépticas. La electroencefalografía así, ha asumido mayor importancia en el análisis diagnóstico de la epilepsia.

La actividad electroencefalográfica en el adulto sano es normalmente muy estable durante largos periodos de tiempo (Matousek y cols., 1979; Travis y Gottlober, 1937; van Dis y cols., 1979; Vogel, 1958). Casi nada se sabe, sin embargo, de la estabilidad de los patrones epileptiformes (tabla. 1), especialmente en términos de sus características morfológicas y otros rasgos distintivos que constituyen la base para la mayoría de las interpretaciones y de las clasificaciones. Es bien conocido que el sueño afecta a la forma de las descargas epileptiformes generalizadas. Esto se ve fácilmente en los complejos onda-pico a 3 Hz, en los cuales, los característicos trazados paroxísticos onda-pico en el individuo despierto reducen su duración durante el sueño y se componen de picos y picos múltiples que recurren de forma esporádica con o sin un componente consistente de onda lenta (Niedermeyer, 1965; Sato y cols., 1974).. En la medida en que la morfología de los trazados se utilice para clasificar a pacientes con convulsiones o síndromes similares, el conocimiento del estado de vigilia o sueño es importante.

En crisis de inicio generalizadas, los EEG interictales muestran puntos simétricos, ondas-pico bilaterales y sincronas y descargas múltiples onda-pico. Más allá de esta descripción genérica, existe una considerable variabilidad en cómo se expresa la actividad epileptiforme. Los pacientes con crisis tónico-clónicas generalizadas, por ejemplo, muestran más comúnmente una actividad onda-pico atípica, consistente en ráfagas de picos junto con complejos onda-pico entre 4-6 Hz irregularmente repetidos. A veces, sin embargo, estos pacientes también muestran trazados con paroxismos de complejos onda-pico de 3 Hz. En las crisis de ausencia infantiles, el EEG revela clásicamente actividad onda-pico de 3 Hz, aunque un análisis más detallado revela que la frecuencia inicial está a menudo sobre los 4 Hz, y que la frecuencia terminal, especialmente en los

paroxismos durante los últimos 10 segundos o más, es de 2-2,5 Hz. En la epilepsia mioclónica juvenil, se considera el patrón interictal característico del EEG la presencia de múltiples complejos onda-pico. Aunque este patrón pueda ser el más específico, ocurre en menos de la mitad de los pacientes que se clasifican dentro de este tipo de desórdenes (Janz, 1989). Otras anomalías epileptiformes comunes en pacientes con epilepsia mioclónica juvenil incluyen actividad onda-pico de 3-Hz y un atípico patrón onda y onda-pico sobre los 4-6Hz. En todos los síndromes catalogados como epilepsia generalizada idiopática, pueden encontrarse casi todas las variaciones de la actividad onda-pico, aunque pueda predominar estadísticamente uno u otro patrón en algunos tipos de crisis.

El electroencefalograma, en resumen, proporciona tres tipos de información: confirmación de la presencia de actividad eléctrica anormal, información sobre el tipo de desorden epileptico, y por último, información sobre la localización del foco (Novotny, 1998).

Es normal realizar estudios electroencefalográficos 48 h o más después de una crisis sospechosa, ya que un EEG realizado poco después de una crisis puede dar resultados

engañosos. El EEG debe incluir grabaciones durante sueño, el estímulo fótico, y la hiperventilación, dado que ciertos tipos de actividad paroxística ocurren más probablemente bajo estas condiciones. En aproximadamente el 50 % de los pacientes que tienen epilepsia, un sólo EEG no demuestra ninguna anomalía; si los resultados electroencefalográficos son normales y la sospecha de epilepsia es alta, se debe practicar otro EEG.

TIPO DE CRISIS	CARACTERISTICAS CLINICAS	CARACTERISTICAS EEG
Parciales		
Crisis parciales simples (focal)	Síntomas pueden ser motores, sensoriales, autonómicos o físicos, dependiendo de la localización de la descarga eléctrica; la conciencia no se altera	Enlentecimiento focal o ondas lentas o ambos
Crisis parciales complejas (lóbulo temporal o psicomotor)	Comienzan sin aura o con síntomas motores, sensoriales, autonómicos o físicos; conciencia alterada; pueden aparecer automatismos	Enlentecimiento focal o ondas lentas o ambos
Crisis parciales secundariamente generalizadas (tónico-clónicas o grand mal)	Comienzan con síntomas motores, sensoriales, autonómicos o físicos; pérdida de conciencia con aumento tónico muscular y clonus subsiguientes van desapareciendo lentamente; el paciente está comatoso después de la crisis y se recupera lentamente	Enlentecimiento focal o ondas lentas o ambos
Generalizadas		
Crisis de ausencia (petit mal)	Comienza rápidamente con un breve período de no respuesta (unos 10 seg) y recuperación rápida; el tono muscular puede aumentar o disminuir con signos de automatismos o clonus.	Patrón punta-onda (3Hz)
Crisis tónico-clónicas primariamente generalizadas (grand mal)	Comienza con pérdida de conciencia o sacudidas mioclónicas; con aumento tónico muscular y clonus subsiguientes van desapareciendo lentamente; el paciente está comatoso después de la crisis y se recupera lentamente	Patrón punta-onda (3-5 Hz)

Tabla 1. Características electroencefalográficas observados en la electroencefalografía rutinaria, sin incidencia de crisis.

2.2 Alteraciones bioquímicas o metabólicas

Debido a los exigentes y continuos requisitos del cerebro, la disfunción neurometabólica es un aspecto fisiopatológico dominante en el cerebro epiléptico. Además, las disfunciones neurometabólicas tienen muchas características de auto propagación típicas de los procesos epileptogénicos, de manera que cada descarga paroxística aumenta la probabilidad de lesión mitocondrial. Así, el metabolismo neuronal anormal puede ser, no sólo un signo crónico del cerebro epiléptico, sino también un causante directo de la epileptogénesis.

La base para la hipótesis metabólica se deduce de distintos focos de evidencias, incluyendo datos de imagen diagnóstica, parámetros fisiológicos humanos y estudios realizados en modelos animales. Hay evidencias claras de que la disfunción metabólica es común en la epilepsia humana, y bastante específica para

identificar con frecuencia la zona origen de la crisis en muchos pacientes. La tomografía de emisión de positrones (PET) usando 18-fluorodeoxiglucosa (FDG) es de uso general para la identificación de áreas hipometabólicas o hipermetabólicas. Hay abundantes datos sobre los pacientes epilépticos que sugieren una alteración en el metabolismo de las neuronas y de la glía. Es conocido ampliamente que la neurotransmisión y el metabolismo están íntimamente ligados (Schousboe y cols., 1992). En el caso del neurotransmisor glutamato, su aclaramiento hacia glutamina mediado por la glutamina sintetasa está acompañado de la expresión específica de esta enzima en las células de la glía. La glutamina se convierte de nuevo a glutamato en la neurona con actividad glutaminasa. Este ciclo establece claramente una direccionalidad del flujo de la neurotransmisión del glutamato entre la neurona y el astrocito. Es evidente que en un cerebro dependiente de la glucosa para su funcionamiento, la “unidad neurona-glía” está en el centro de un sistema balanceado para la neurotransmisión y el metabolismo. En las alteraciones de cualquier célula, sin implicar necesariamente la muerte celular, probablemente puedan influir parámetros tales como el flujo metabólico, las concentraciones de glutamato en estado estacionario, la glutamina, el GABA, y sobre todo la excitabilidad neuronal, un componente clave en epilepsia.

2.3 Alteraciones genéticas

Entre los muchos síndromes epilépticos descritos en humanos, hay un elevado número de epilepsias idiopáticas de carácter familiar en las que están implicados de forma sustancial determinantes genéticos. Es también importante subrayar la importancia de interacciones entre la predisposición genética y los factores ambientales en la manifestación de las crisis y la expresión particular de un

desorden dado. Así, aunque haya evidencia inequívoca de factores hereditarios en la epilepsia, los estudios genéticos familiares no definen claramente un patrón hereditario para las formas comunes de epilepsia. Además, los datos sugieren un componente hereditario complejo en todas las formas de epilepsia (Ottman, 2005). La tabla 2 recoge la descripción de diversos genes que son la base de epilepsias y de síndromes epilépticos, implicados en un amplio espectro de funciones y vías funcionales.

Al menos seis síndromes de epilepsia humana se considera que pueden ser causados por herencia monogénica (Berkovic y Scheffer, 1997). En la actualidad, se ha identificado un defecto molecular en tres de éstos; una mutación en la subunidad α_4 del receptor nicotínico de la acetilcolina (Steinlein y cols.,1995, 1997), sería la causante de la epilepsia familiar nocturna; una mutación en el gen que codifica un inhibidor de proteasa de la cisteína, cystatin B (Pennacchio y cols.,1996) sería la responsable de la epilepsia mioclónica progresiva y, recientemente, las convulsiones neonatales familiares benignas se han relacionado con las mutaciones en uno de los dos genes codificantes de los canales de potasio KCNQ2 y KCNQ3 (Singh y cols.,1998; Charlier y cols.,1998).

Alrededor del 30% al 40% de todas las epilepsias, especialmente durante niñez y adolescencia, se engloban en el término de *epilepsias idiopáticas*, siendo las epilepsias idiopáticas generalizadas (EIG) las más frecuentes entre ellas. Estudios llevados a cabo en gemelos apoyan la hipótesis de una etiología genética casi completa en el caso de las EIG (Berkovic, 1998), siendo más probable un modelo oligogénico o poligénico de herencia. Puede asumirse que varios genes responsables de la susceptibilidad a la epilepsia están implicados en cada paciente, y que la interacción entre los locus de estos genes multiplican sus efectos.

Algunos genes en las EIG pueden determinar el umbral de las crisis influyendo en la excitabilidad neuronal, mientras que otros genes de susceptibilidad podrían ser responsables de la edad del inicio y por lo tanto del subtipo del crisis (Zara y cols.,1995).

Los estudios de ligamiento en familias con muchos miembros y con un probable carácter de herencia monogénica de EGI, encuentran la localización de estos loci en los cromosomas 6p y 15q14 para la epilepsia mioclónica juvenil (EMJ) (Greenberg y cols.,1988; Serratosa y cols.,1996; Sander y cols.,1997; Elmslie y cols.,1997) y en 8q24 para la epilepsia de ausencia infantil (Zara y cols.,1995; Fong y cols.,1998; Sugimoto y cols., 2000).

Síndrome epiléptico	Gen	Cromosoma
Convulsiones neonatales benignas familiares	KCNQ2 KCNQ3	20q13 8q24
Epilepsia generalizada con convulsiones febriles	SCN1B SCN1A SCN2A GABRG2	19q13 2q24 2q24 5q31
Convulsiones neonatales-infantiles benignas familiares	SCN2A	2q24
Epilepsia de ausencia infantil con convulsiones febriles	GABRG2	5q31
Epilepsia mioclónica juvenil autosómica dominante	GABRA1 EFHC1	5q34 6p12
Epilepsia generalizada idiopática autosómica dominante	CLCN2	3q26
Epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante	CHRNA4 CHRNA2	20q13 1q21
Epilepsia parcial autosómica dominante con rasgos auditivos	LGI1	10q24

Tabla 2: Síndromes epilépticos idiopáticos mendelianos con genes identificados por clonaje posicional. (a) mutaciones identificadas en más de un síndrome epiléptico; (b) mutaciones identificadas también en la epilepsia mioclónica grave infantil.

Han sido descritos otros loci potenciales en 2q36, 3q36, 14q23 y confirmados en 15q14 (Sander y cols.,2000). No se han identificado las mutaciones génicas en

estas localizaciones causantes de la patología epiléptica, pero existen varios candidatos probables entre los genes codificantes de proteínas de membrana tipo canales iónicos o transportadores. Como potenciales genes, cuya mutación podría desencadenar la epilepsia, se ha postulado en el cromosoma 2q36, el gen *SLC4A3*, intercambiador de cloruro-bicarbonato; en 3q26, el gen de la subunidad β de bloqueo de voltaje mediado por K^+ , *KCNA1B* (Schultz y cols.,1996) y el gen *CLCN2* (Cid y cols.,1995) del canal de Cl^- ; en 14q24, el gen *SLC8A2* (Li y cols.,1994) del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} ; en 15q14, el gen *CHRNA7* de la subunidad α_7 del receptor neuronal de acetil colina (Chini y cols.,1994). Se ha intentado establecer una correlación entre la mutación de diversos genes que codifican canales iónicos (*KCNQ2*, Steinlein y cols.,1998, 1999; *KCNQ3*, Haug, 2000; *KCNJ3* y *KCNJ6*, Hallmann y cols.,2000; *KCNN3*, Sanders y cols.,1999; *CACNA1A*, Sander y cols.,1998; *SCN2B*, Haug y cols., 2000) y la génesis de las EGI, no existiendo datos definitivos que establezcan una asociación evidente

A pesar de los aparentemente numerosos datos anteriores, para la mayoría de los desórdenes epilépticos, queda por determinar qué grado de alteración en genes individuales, o la interacción de múltiples genes afectados, determinan la expresión fenotípica de cualquier condición epiléptica.

3. Modelos animales de epilepsia

3.1. Cómo pueden los modelos animales usarse para comprender la patogenia y el tratamiento de la epilepsia

Las epilepsias constituyen uno de los desórdenes neurológicos humanos mas comunes, presentando generalment los pacientes convulsiones clónicas generalizadas. Mediante el empleo de diversos modelos de epilepsia, se busca una mayor comprensión de la base fisiopatológica de este tipo de convulsiones. El conocimiento de los circuitos neurológicos y de los neurotransmisores implicados en el proceso, llevaría a una mejor comprensión de la génesis de la epilepsia, y ofrecería nuevos blancos terapéuticos potencialmente útiles para su tratamiento.

Los modelos animales de convulsiones y de epilepsia han desempeñado un papel fundamental en nuestra comprensión de los cambios fisiológicos y del comportamiento asociados a la epilepsia humana. Desde la primera mitad del siglo XX, los modelos animales han conducido al descubrimiento de estrategias para la terapia antiepiléptica, y muchos de estos fármacos son prescritos aún en la actualidad. Los modelos animales presentan una amplia gama de especies desde la *Drosophila* (Timpe y Jan., 1987; Noebels, 1999) a los primates no humanos, y su valor ha sido inestimable para la investigación de los mecanismos básicos de epileptogénesis. Tanto si existe una mutación en un canal iónico o en un receptor, las alteraciones fundamentales en la función neuronal son constantes en los distintos modelos (Engel, 1992).

Los modelos animales *in vivo* se han clasificado en ***modelos convulsivos*** y ***modelos de epilepsia***. Puesto que la epilepsia humana se define por la aparición de

múltiples crisis recurrentes espontáneas, la inducción de crisis agudas únicamente sin el componente crónico de la actividad epileptiforme se considera un modelo para convulsiones, pero no para epilepsia (Engel, 1992). Por ejemplo, roedores adultos pueden tener crisis generalizadas graves en respuesta a una única exposición al flurothyl (1,1,1-trifluoro-2-(2,2,2-trifluoroetoxi) etane) (Rose y Watson, 1967), pero no desarrollarán crisis espontáneas; por el contrario, una dosis convulsiva del ácido kainico causa un daño cerebral extenso y permanente, y las crisis espontáneas subsiguientes (Schwartzkroin y cols., 1997).

A pesar de los enormes avances hechos en el campo de la investigación de la epilepsia, las preguntas básicas sobre los modelos agudos y los modelos crónicos siguen siendo las mismas. Estas preguntas se relacionan con los mecanismos de la hiperexcitabilidad celular, la descarga neuronal sincrónica y su actividad rítmica, las bases de las alteraciones que provocan la transición del estado interictal al ictal, la propagación de las crisis, su terminación, los mecanismos y efectos secundarios de los fármacos antiepilépticos y, por último, las alteraciones del comportamiento cercanas o asociadas a las crisis (Schwartzkroin y cols., 1997). Por tanto, los modelos experimentales no sólo son útiles para investigar los mecanismos básicos epileptógenos y que pueden usarse para desarrollar nuevas estrategias preventivas, sino también para el estudio de la función normal del cerebro.

La validez de los modelos animales ha cambiado por varias razones; primero, muchos de los modelos extraen una conclusión mecanicista sobre la epilepsia basada en los estudios realizados en un cerebro normal sin epilepsia; en segundo lugar, las manifestaciones del comportamiento asociadas a cada modelo

pueden diferir y no parecerse en nada al comportamiento en seres humanos. Por ejemplo, el comportamiento ictal, interictal, y postictal puede variar entre los diversos modelos de epilepsia, y los comportamientos relacionados con las crisis pueden ser desde muy sutiles a extremadamente complejos. Tercero, los datos obtenidos de una amplia gama de especies se han recopilado para obtener información sobre el cerebro humano; no es equívoco sospechar que ciertos mecanismos celulares, vías de propagación de las crisis o las manifestaciones del comportamiento en primates puedan ser más complejos que en una rata o en un ratón.

Antes de que un animal pueda ser considerado un modelo de condición humana particular de la epilepsia, se deben satisfacer la mayor parte de los seis criterios generales siguientes:

- el modelo debe exhibir los patrones electrofisiológicos similares a observados en humanos, ya que el patrón de la actividad de EEG constituye un sello de crisis y de epilepsia,.
- las etiologías deberían ser similares. Por tanto, las condiciones humanas que derivan de una predisposición genética subyacente, de una lesión, de un desorden neuronal en la migración, etc., deben estar incluidas en el modelo.
- si la condición humana está caracterizada por una edad de inicio, el modelo animal propuesto debe escalarse o reflejar una edad similar al presentar las crisis

- si la condición humana está caracterizada por cambios patológicos específicos, tales como lesiones focales, el modelo animal debe exhibir patologías similares.
- mientras que no existan tratamientos farmacológico válidos desarrollados para cada condición humana, la condición que se modela deberá responder a los fármacos antiepilépticos con mecanismos de acción similares.
- las características del comportamiento, incluyendo manifestaciones del comportamiento inducidas por la crisis así como las alteraciones del comportamiento a corto y a largo plazo exhibidas por el animal, deberían reflejar las mismas que las observadas en seres humanos.

A pesar de la necesidad lógica de estos criterios, la mayoría de los modelos no pueden reproducir fielmente todos los aspectos mencionados. Cada modelo aportará un conocimiento en particular y la profundización en cada uno de ellos y la visión de conjunto, permitirá ampliar sin duda nuestros conocimientos sobre estos síndromes

3.2. Modelos actuales de epilepsia

Quizás los modelos animales mejor caracterizados en su electrofisiología y en el comportamiento lo constituyen los modelos de roedores de epilepsia de ausencia, que se observa frecuentemente en la infancia temprana. Ejemplos de algunos mutantes comúnmente estudiados incluyen el ratón ambaleante “totteter” (Fletcher y cols.,1996), el “stargazer” (Letts y cols.,1998, 2005), los ratones letárgicos B6EiC3 (Burgess y cols.,1997), y el Ratón SJL/J, que muestran ataxia

sobre los 14 días de edad con ondas en pico y arresto motor como en las crisis de ausencia (Cox y cols.,1997).

La mayor parte de estos ratones mutantes comparten características similares a las observadas en epilepsias humanas de ausencia, tales como una breve interrupción de la atención, el carácter espontáneo, generalizado, con descargas de 3-7 Hz e inicio en la tercera semana postnatal (que corresponde al período adolescente en humanos). Fenómenos similares se observan también en varias líneas de ratas mutantes, incluyendo: las ratas GAERS (Marescaux y cols.,1992); la rata WAG/Rij (Coenen y cols.,2003), y la rata epiléptica espontánea (Serikawa y cols.,. 1987). Aunque todos estos modelos comparten muchos patrones electrográficos y de comportamiento observados en epilepsias humanas de ausencia, se diferencian en que las crisis no desaparecen con la edad (Prasad y cols.,1999). De forma similar, en humanos no se exhibe típicamente la ataxia (encontrada en la mayoría de los modelos del roedor), y las descargas observadas en los EEG son generalmente más rápidas (3 Hz), mientras que en pacientes, es raro observar descargas mayores de 4 Hz..

También, existen varios modelos bien caracterizados que simulan en gran medida las crisis parciales complejas observadas en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (ELT). Los modelos de crisis inducidas químicamente por kainato y pilocarpina (PILO) son probablemente los modelos de ELT más conocidos y mejor estudiados. La vigencia de estos modelos es atribuible al cumplimiento de muchos de los criterios descritos arriba. El KA (ácido kaínico), un análogo del glutamato (Nadler, 1981) y la PILO (un agonista colinérgico) (Cavalheiro, 1995) pueden causar crisis agudas eficientemente cuando son inyectados

intracerebralmente o de forma sistémica en los animales. En roedores, grandes dosis de estos fármacos inducen crisis graves que pueden desembocar en un “status epiléptico”, al que sigue un período latente de varias semanas; este período se continúa con un desarrollo de crisis recurrentes espontáneas (Cavalheiro, 1995). Una dosis convulsiva de KA o PILO, inducen una gran variedad de manifestaciones comportamentales que simulan algunos automatismos observados en la ELT humana. En ambos modelos, las crisis motoras límbicas consisten generalmente en convulsiones clónicas de los miembros anteriores, salivación profusa, movimiento de alzado y caída. Patológicamente, KA y PILO generan lesiones similares a las de pacientes con esclerosis temporal mesial. Estas lesiones incluyen típicamente la pérdida de interneuronas GABAérgicas en el giro dentado y la muerte de células piramidales dentro de los estratos CA3 y CA1 del hipocampo.

El “kindling” o “encendido”, constituye otro importante modelo experimental. En éste, el uso de un estímulo repetitivo de carácter focal o descargas eléctricas a umbrales subconvulsivos, dan lugar en última instancia a crisis convulsivas parciales o generalizadas intensas (Goddard, 1967, 1969). Este modelo consolida su validez como modelo de epilepsia a través de las observaciones en diversas especies animales, donde el “kindling” puede dar lugar a crisis recurrentes espontáneas, reforzando la idea que las redes cerebrales se transforman de forma permanente en hiperexcitables tras sufrir convulsiones parciales repetidas. En la amígdala y otras regiones límbicas, el “kindling” produce una progresión en cinco etapas características de comportamiento epiléptico (Racine, 1972): etapa 1: clonus facial; etapa 2: cabeceo ; etapa 3: clonus

de miembros anteriores contralaterales ; etapa 4: alzamiento corporal; etapa 5: alzamiento y caída. La gravedad de este comportamiento es creciente y se corresponde también en un aumento en la duración del EEG de la crisis. A pesar de la popularidad del modelo de “kindling”, los animales requieren muchos estímulos previos antes de que ocurran las crisis espontáneas, no considerándose por tanto un buen modelo para crisis espontáneas.

Se han descrito varias especies genéticamente propensas a la epilepsia como modelos para estudiar epilepsias reflejas fotosensibles y audiogénicas. El babuino fotosensible, *Papio papio*, descrito hace aproximadamente 35 años (Killam, 1967) es altamente sensible al aplicársele un estímulo fótico intermitente (luz estroboscópica). En respuesta a este tipo de estímulo, los babuinos presentan un reflejo mioclónico facial del cuello y de los miembros, seguido a menudo por convulsiones generalizadas tónico-clónicas graves. Las crisis se pueden bloquear mediante drogas anti-epilépticas (DAEs) usadas en clínica para las convulsiones generalizadas, tales como fenobarbital, ácido valproico y benzodiazepinas (Fisher, 1989). Aunque pueda ser un modelo genético para el estudio de la epilepsia generalizada primaria (EPG) humana, hay diferencias que incluyen carencia de crisis de ausencia y ráfagas onda-pico no bien formadas, pareciendo que el estímulo desencadenante no desempeña un papel significativo en las crisis (Niedermeyer, 1996). Otro animal que exhibe susceptibilidad convulsiva a estímulos visuales y audiogénicos, es la raza Fayoumi de pollos (FEpi) (Batini y cols.,1996). Estos pollos tienen una predisposición hereditaria de carácter autosómico recesivo a la epilepsia inducida por la luz o estímulos auditivos intensos. En estos animales, la luz produce mioclonía de la cabeza y del cuello, y

un acceso de carrera repentino con estímulos auditivos intensos. En *P. papio* el foco origen del crisis ha sido controvertido pero se sospecha que debe ser de origen cortical más que subcortical (Niedermeyer, 1996), en contraste con los FEpis, donde se cree que el troncoencéfalo desempeña un papel en la generación de la crisis (Batini y cols.,1996). Este modelo puede ser de utilidad para la investigación de las bases fisiológicas en las nuevas epilepsias fotosensibles humanas y en el desarrollo de fármacos.

Otros modelos comunes de roedor con susceptibilidad convulsiva audiogénica de origen genético, incluyen a la rata genéticamente propensa a la epilepsia (GEPR) y los ratones DBA/2. Las ratas GEPR se han escindido, mediante la selección de reproductores, en distintas colonias GEPR-3 y GEPR-9, cada una con distinta predisposición convulsiva (Dailey y cols.,1989). Las GEPR-3 exhiben un único episodio de carrera seguido de un clonus generalizado, mientras que el mismo estímulo en las GEPR-9 conduce a convulsiones tónico-clónicas generalizadas graves, a veces precedidas de una sola fase de carrera. Las ratas GEPR tienen crisis espontáneas y por tanto se consideran un modelo natural de epilepsia. Aunque son altamente sensibles a los estímulos audiogénicos, estas ratas también presentan una mayor susceptibilidad a convulsivantes químicos, inflamación e hipertermia (Dailey y cols.,1989). Al igual que suceden en el hombre, la repetición diaria del estímulo audiógeno en ratas GEPR-9 dan lugar a una prolongación de las crisis con una última fase clónica a la que sigue un período tónico de extensión (Naritoku y cols.,1992). Las alteraciones neuroquímicas en ratas GEPR incluyen déficits en la actividad de la noradrenalina y de la serotonina (Dailey y cols.,1989).

Los ratones DBA/2, son un linaje de ratones altamente sensibles a estímulos auditivos intensos (10-20 kilociclos, DB 90-120) (Naquet y Valin, 1998; Seyfried y Todorova, 1999). En respuesta a estos estímulos, tienen crisis caracterizadas por una fase de carrera salvaje seguida por convulsiones clónicas y por último una fase de extensión tónica. La sensibilidad a las crisis comienza alrededor de la segunda y la tercera semana postnatal, y la gravedad de la crisis causa la muerte a menudo por fallo respiratorio en los animales (Naquet y Valin, 1998). Las investigaciones que buscaban los substratos anatómicos en los modelos GEPRs y DBA/2 también han sugerido un origen subcortical para las crisis, estando el colículo y el tronco cerebral presumiblemente implicados en la generación de las crisis (Naquet y Valin, 1998; Seyfried y Todorova, 1999; Faingold y cols., 1986; Le Gal La Salle y Naquet, 1990). Así, estos simples modelos de carácter reflejo permiten el estudio de mecanismos del hiperexcitabilidad en estructuras subcorticales pudiendo usarse como blancos en terapias para seres humanos con estos tipos de susceptibilidades convulsivas.

La mayoría de desordenes metabólicos asociados a epilepsia no tienen ningún modelo animal. Sin embargo, en un trabajo de Waymire y cols., (Waymire y cols., 1995) se describe un ratón que puede servir como modelo para las crisis piridoxina-dependientes. En seres humanos, esta rara condición causa el inicio de las crisis durante la infancia temprana y persiste toda la vida, pero las crisis pueden controlarse con suplemento de piridoxina en la dieta (Goutieres y Aicardi, 1985). Los ratones con carencia tisular de fosfatasa alcalina (TNAP) tienen crisis causadas por un defecto en el metabolismo del fosfato de piridoxal 59 (PLP) (Waymire y cols., 1995). Debido a que la síntesis de GABA requiere PLP como cofactor, se produce menos GABA y consecuentemente los ratones mutantes de

TNAP tienen un 50% menos GABA en el cerebro. Consecuencia de ello son las crisis graves mortales que se inician en la segunda semana postnatal. Estos ratones pueden tratarse evitando su muerte mediante una terapia a base de piridoxina y una dieta semisólida. Usando una línea genéticamente propensa a la epilepsia de ratones (BALB/c) que también tienen niveles reducidos de GABA en el cerebro, Dolina y cols., (Dolina y cols.,1993) también ha demostrado que complementando la dieta con piridoxina durante la preñez se suprime la susceptibilidad a las crisis inducidas con PTZ y también a las audiogénicas pudiéndose restaurar los niveles cerebrales de GABA. Así, estos estudios representan diversos acercamientos mecanicistas de cómo un déficit de piridoxina puede llevar a la hiperexcitabilidad cerebral. El ratón mutante macular, se ha propuesto como modelo para el síndrome de Menkes (Xu y cols.,1994), asociada a convulsiones entre otros síntomas. En seres humanos, esta enfermedad es una alteración genética ligada al cromosoma X y da como resultado un defecto en la absorción de cobre. Las características clínicas y patológicas de estos ratones incluyen crisis de inicio temprano, acompañadas por la degeneración progresiva de neuronas corticales, emaciación grave, cambios de la pigmentación en la piel, y encrespamiento de las vibrisas (Yamano y cols.,1987). En general, estos modelos constituyen ejemplos de desórdenes metabólicos que producen alteraciones orgánicas y del metabolismo cerebral, causando cambios en la excitabilidad del cerebro y daño neuronal, que conducen a crisis convulsivas. Mientras que en los modelos citados existen adelantos en las terapias, muchos de los desordenes metabólicos asociados comúnmente a crisis no tienen por ahora ningún blanco terapéutico.

4. Crisis audiógenas de origen genético

4.1. Caracterización del comportamiento en las crisis audiógenas

Las crisis convulsivas audiógenas (CCA) se caracterizan por presentar diversas fases en las que se manifiestan comportamientos o signos clínicos definidos. Entre las distintas fases que presentan y en orden cronológico, la primera *fase de carrera* es un componente sustancial en ellas, sin importar el nivel final de gravedad alcanzado. En esta etapa de carrera salvaje, los animales corren a una velocidad alta e incontroladamente por un tiempo tras la estimulación acústica. Esta fase, puede conducir posteriormente a una serie de convulsiones tónico-clónicas seguidas por una fase tónica adicional. La fase carrera salvaje en sí misma puede consistir en una o dos carreras distintas, y se considera típicamente como parte de la progresión de la crisis, aunque esta distinción no sea evidente ni se haya demostrado en algunos roedores, como el ratón C57B1/6J (Henry, 1967).

En segundo lugar, aparece la *fase de clonus*, donde las convulsiones son de carácter clónico y se caracterizan por la flexión dorsal del cuello, de los miembros anteriores y posteriores, acompañados por espasmos musculares de todo el cuerpo y movimientos oscilantes. Durante las convulsiones clónicas pueden observarse momentos de rigidez del cuerpo completo (tonus); la observación detallada permite clasificar la crisis como tónico-clónica. Para algunas líneas de ratas, incluyendo la Wistar, Sprague-Dawley (Pierson y Liebmann, 1992), Long-Evans (Reid y cols.,1996; Ross y Coleman, 1999), y la rata moderadamente propensa a la epilepsia, GEPR-3 (Mishra y cols.,1989), una convulsión tónico-clónica representa la gravedad máxima de crisis alcanzable.

En tercer lugar, aparece el tonus, la manifestación más grave de las CCA, también llamada *fase tónica*, consistente en extensiones rígidas y continuadas del cuello, miembros anteriores y posteriores. El cuerpo de los animales en una crisis tónica asume una forma de arco. Una crisis audiogena tónica siempre es precedida por una fase de carrera salvaje y posiblemente por convulsiones clónicas. Las crisis tónicas se observan en líneas de ratones DBA/2J (Reid y Collins, 1989), ratas GEPR-9 (Mishra y cols.,1988), y ratas Wistar con susceptibilidad innata a las CCA (García-Cairasco y Sabbatini, 1989).

Por último, después de una crisis clónica, tónico-clónica, o tónica, los animales presentan generalmente los comportamientos típicos de un *período post-ictal*, con un período de duración variable de inmovilidad estuporosa. Durante esta fase, puede darse también un corto tiempo de insensibilidad a un estímulo adicional acústico o táctil.

4.2. Substratos anatómicos y neuroquímicos de las crisis audiógenas

La mayor parte de los estudios sobre crisis audiógenas en los años 50 y 60 eran caracterizaciones de la inducción de las crisis y de los aspectos comportamentales. No fue hasta los años 70 cuando comenzarn a conocerse los substratos de las CCA, debido a la disponibilidad creciente de aproximaciones quirúrgicas, electrofisiológicas y farmacológicas en los modelos animales de epilepsia. Con estos métodos, se dilucidó tanto el papel del sistema auditivo como el de otras estructuras en la génesis y propagación de las crisis.

Vías aferentes de las CCA

La susceptibilidad a presentar CCA comienza con la respuesta del oído interno al estímulo acústico intenso, donde una pequeña pérdida de audición puede explicar la hipersensibilidad posterior a estímulos por encima del umbral auditivo. La cóclea sólo está protegida parcialmente contra la sobreestimulación por un estímulo acústico intenso; los músculos del oído medio pueden contraerse de forma refleja en respuesta a sonidos altos (Clark y Pickles, 1996), por lo que es relativamente fácil inducir traumas cocleares con estímulos acústicos intensos. En este sentido, hay numerosas referencias bibliográficas que indican un período del desarrollo en el cual la anatomía y la función cocleares son especialmente vulnerables a la sobreestimulación (Clark y Pickles, 1996; Penny y cols., 1983; Sha y cols., 2008). La función de los neurotransmisores a nivel coclear durante este período particularmente sensible puede desempeñar un papel vital. Así, el GABA interviene como un neurotransmisor tanto para las proyecciones eferentes de la cóclea (Bobbin y cols., 1990), como para las aferentes, que se originan en el complejo olivar superior (Whitlon y Sobkowicz, 1989). El glutamato está implicado en la actividad aferente de las células cilidias internas (CCI) (Knipper y cols., 1997; Lefebvre y cols., 1991; Luo y cols., 1995), y su acción puede ser modificada por la dopamina (Oestreicher y cols., 1997) y por la expresión. Durante el desarrollo postnatal en rata, diversos receptores glutamatérgicos (NMDA y AMPA), que se expresan de forma transitoria durante el desarrollo postnatal (Knipper y cols., 1997), lo cual es imperceptible en los animales adultos (Luo y cols., 1995). La diferenciación de las fibras aferentes de GABA en la cóclea es más tardía que en otras estructuras y puede no madurar hasta el final del primer mes de vida postnatal en ratón (Whitlon y Sobkowicz, 1989), aunque existan testimonios contradictorios en la rata (Merchan-Pérez, 1993). Durante este

periodo particular en el desarrollo postnatal de los roedores, en el que se están consolidando las conexiones en la cóclea, la interacción de factores anatómicos, neuroquímicos y fisiológicos podría explicar las anomalías anatómicas y funcionales cocleares que acompañan la susceptibilidad a las CCA.

El colículo inferior en modelos de crisis convulsivas audiogénas

El colículo inferior (CI) ha sido implicado como una estructura crítica en la susceptibilidad audiogénica a las crisis. Funcionalmente, el CI participa en la codificación de estímulos auditivos, tales como la frecuencia y procesamiento de la señal binaural (Ehret y Fisher, 1991; Friauf, 1992; Kelly y cols., 1991) y es un centro de integración, donde converge la información auditiva ascendente y descendente (Ramón y Cajal 1904; Brodal 1981; Winer et al. 1998; Bajo and Moore 2005).

De acuerdo a los tipos celulares y su arquitectura, el CI está dividido en el núcleo central (CNIC), la corteza dorsal (DCIC) y la corteza externa (ECIC) (Coleman y Clerici, 1987; Faye-Lund y Osen, 1985). En roedores, el CNIC está confinado rostrolateroventralmente por el ECIC, y caudodorsalmente por el DCIC.

Las lesiones bilaterales del CI suprimen las CCA permanentemente (García-Cairasco y Sabbatini, 1991; Kesner, 1966; Wada y cols., 1970; Willot y Lu, 1970), especialmente si la lesión daña el CNIC (Willot y Lu, 1970). Las CCA también se atenúan parcialmente a causa de lesiones del CI (Ross y Coleman, 1996) y particularmente las que dañan la ECIC (Willot y Lu, 1970). Por el contrario, lesiones en otros núcleos auditivos, como el cuerpo geniculado medial, no producen variaciones en las CCA (Willot y Lu, 1997). De acuerdo a la estrecha relación entre la estructura del CI y su función y la susceptibilidad a las CCA, la

investigación sobre los substratos anatómicos de las CCA se ha centrado en el CI, donde puede darse una hiperreactividad electrofisiológica ante un estímulo sonoro intenso. Datos recientes de registros de ABR en las ratas Long Evans propensas a CCA, sugieren una hiperreactividad al estímulo desencadenante por encima de un cierto nivel de intensidad crítico: las ondas IV-V producidas disminuyeron las latencias de ABR a 70 y 90 dB comparadas con los controles (Coleman y cols.,1999).

Los estudios inmunoquímicos con Fos (Morgan y cols.,1987) han confirmado un aumento de actividad dentro del CI, particularmente en el DCIC y el ECIC, en modelos no preestimulados (primed), (Kwon y Pierson, 1997; Pierson y Snyder-Keller, 1994; Snyder-Keller y Pierson, 1992) y en animales genéticamente susceptibles (Clough y cols.,1997; Le Gal La Salle y Naquet, 1990; Simler y cols.,1994; Simler y cols.,1999) que han sido expuestos a intensidades de estímulos capaces de inducir las crisis.

En el CI de animales controles, está estructurado anatomofuncionalmente en distintas bandas tonotópicas en (Clerici y Coleman, 1987; Coleman y cols.,1982; Ehret y Fisher, 1991; Friauf, 1992). Estas bandas son densas y se distribuyen más difusamente en los animales preestimulados (primed) durante el desarrollo (Pierson y Snyder-Keller, 1994; Snyder-Keller y Pierson, 1992) o están ausentes en los animales genéticamente susceptibles (Clough y cols.,1997) donde no se da el proceso normal de maduración del sistema (Faingold y cols.,1990)

Los resultados de los estudios del CI ofrecen evidencias de que la reactividad anormal del CI puede ocurrir en respuesta a estímulos por encima del umbral. A nivel neuronal, existe un incremento en el porcentaje de neuronas del CNIC en

ratas GEPRs que exhibieron una respuesta onset-offset (un pico al principio y fin del estímulo) a altas intensidades de estímulo (80 dB o superior) comparadas a los controles (Faingold y cols.,1986). Se ha sugerido que la respuesta de offset, menos frecuente en los controles, puede representar una carencia de inhibición en el CNIC (Faingold y cols.,1986). También hay un aumento del número de potenciales de acción de las neuronas del ECIC de las ratas GEPR en respuesta a una estimulación de 10 dB por encima del umbral comparado con los controles crisis-resistentes, y en el porcentaje de las neuronas de las ratas GEPR que presentan descargas sostenidas (Chakravarty y Faingold, 1997).

Vías eferentes de las crisis convulsivas audiógenas

Las vías eferentes de la CCA puede dividirse a nivel de la corteza externa del colículo inferior (ECIC) en vías directas y moduladoras, las cuales terminan en la formación reticular (FR) . En varios modelos de crisis troncoencefálicas, la FR está implicada en la vía eferente de las crisis, pues las lesiones del subnucleo del FR atenúan los componentes tónicos y clónicos de las crisis (Browning, 1985). En animales GEPR-9 los niveles de glutamato del FR aumentan durante las crisis (Chapman y cols.,1986). Recientemente, la subdivisión del área parabrachial lateral se ha identificado como un área de alta inducción del FOS posteriormente a las crisis tónicas generalizadas inducidas por el sonido o el electroshock (Eells y cols.,1998).

El ECIC tiene proyecciones descendentes prominentes en varias áreas de la formación reticular (Caicedo y Herberto, 1993), incluyendo el núcleo pontino, el núcleo tegmental ventrolateral, el núcleo reticular gigantocelular, y el núcleo paragigantocelular lateral, que puede favorecer la vía eferente directa de las CCA.

La proyección del CI al FR puede ser de naturaleza glutamatérgica; las inyecciones de D-3H-aspartate en el CNIC de chinchillas revelaron un marcado anterógrado en el núcleo dorsolateral del núcleo pontino (Saint Marie, 1996). La zona intercolicular, que corresponde a la parte más rostral del ECIC también proyecta a los núcleos reticulares tales como el núcleo reticular caudal del puente y el núcleo reticular gigantocelular (Caicedo y Herberto, 1993).

La vía directa propuesta para las CCA del CI a las estructuras reticulares se puede modificar a nivel colicular o reticular por varias estructuras subcorticales. Por ejemplo, en la sustancia gris periacueductal (SGP) de las ratas GEPR, las neuronas exhiben un patrón de disparo justo antes del inicio de las convulsiones tónicas (N' Gouemo y Faingold, 1999). La susceptibilidad a las CCA es suprimida en las GEPR-9s por el bloqueo de los receptores de NMDA o la activación de los receptores de GABA-A en la PAG (N' Gouemo y Faingold, 1999). La administración del antagonista opioide naloxona, antagonista en el SGP, dio lugar a la supresión de las CCA (N' Gouemo y Faingold, 1999)

Otra estructura moduladora importante en la red de las CCA es el colículo superior (CS). El papel del colículo superior en la progresión de las CCA es apoyado por la atenuación incompleta de las CCA cuando se realizan cortes a nivel medio del colículo (Tsutsui y cols., 1992) o lesión del CS (Willot y Lu, 1980).

Microinyecciones focales del picrotoxina (antagonista no competitivo del receptor de GABA-A en las capas profundas del colículo superior (CPCS) de ratas, produce pautas de carrera salvaje en dos tercios de los animales (Cools y cols., 1984). En modelos de crisis audiógenas, lesiones sobre el CPCS reducen la

incidencia de componentes tónico-clónicos en ratones DBA/2, mientras que las carreras salvajes persisten (Willott y Lu, 1980). Cortes profundos a un nivel medio (entre el CI y el CS) atenúan la mayoría de los comportamientos del CCA en animales propensos a las crisis (Tsutsio y cols.,1992). Aunque el CS esta implicado como una estructura necesaria para las CCA (Gale, 1992, García-Cairasco y cols.,1998) los datos procedentes de los estudios de lesiones y transecciones confirman que el SC no es una estación obligatoria para la propagación de las crisis.

5. EL hámster GASH:Sal

El modelo animal para este estudio es una línea desarrollada en el animalario de la Universidad de Salamanca a partir de una línea originaria de la Universidad de Valladolid. Esta línea, denominada GPG/Vall, sufría una epilepsia de origen troncoencefálico (Aparicio, 1983; Gil-Verona y cols., 1991 y 1993) de transmisión hereditaria, cuyas crisis convulsivas audiogénicas (CCA) eran desencadenadas por estímulos acústicos de 1-20 Khz. de frecuencia y 60-80 dB de intensidad (Soria y cols., 1987). Las crisis desarrolladas por estos animales eran crisis convulsivas generalizadas tónico-clónicas, cuya etiología se asemejaba con la epilepsia humana tipo Gran Mal. En un estudio posterior de esta línea en la Universidad de Salamanca, se demostró un patron de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena (Muñoz y López, 2005), constituyéndose una nueva línea denominada GASH:Sal. (Genetic audiogenic seizure hamster)

Al igual que otros modelos animales de CCA (Ross y Coleman, 2000), estas convulsiones se producen a consecuencia de un estímulo auditivo intenso y no aparecen antes de los 18 días de edad, momento en el que se completa la maduración del sistema acústico. La susceptibilidad alcanza su grado máximo entre el primer y cuarto mes, para posteriormente desaparecer gradualmente. En estos animales las CCA se caracterizan por varias fases progresivas características (Macías Fernández y cols., 1992; Muñoz de la Pascua y López, 2005) :

1. período de latencia de breves segundos de duración tras el estímulo.
2. carrera salvaje que finaliza con la caída del animal en decúbito lateral
3. "opistótono" (arqueamiento acusado del raquis, extremidades anteriores, cola, orejas enhiestas y espasmo en abducción de los miembros posteriores)
4. convulsiones tónico-clónicas generalizadas
5. fase tónica de progresión craneocaudal
6. periodo estuporoso postictal

En secciones histológicas del cerebro, los hámsters GASH:Sal presentan una degeneración neuronal restringida a los núcleos auditivos, de manera que aunque los animales al nacer presentan un sistema auditivo aparentemente normal, con el tiempo, se produce una muerte celular selectiva por causas no debidas a fenómenos degenerativos inherentes a la edad, que provoca hipoacusia y, por tanto, la pérdida de la capacidad de desarrollar convulsiones audiógenas. Por ello, después del primer año, las crisis se producen sólo ocasionalmente y cuando aparecen, suelen presentar únicamente el componente inicial de carrera, sin la fase

convulsiva (Muñoz de la Pascua y López, 2005), al igual que sucedía con la línea GPG/Val 2006 (Pastrana, 1986).

Se han realizado numerosos trabajos tendentes a la caracterización de estos animales, fundamentalmente estudios anatómicos, que confirman la presencia de las mismas alteraciones del sistema nervioso (central y periférico) de estos animales que aparecían en la línea GAP/Val que la originó (López y cols., 1999, 2001; Fuentes-Santamaría y cols., 2005), aunque con menor intensidad (Muñoz de la Pascua y López, 2005).

La densidad neuronal de los núcleos auditivos es menor en el hámster GASH:Sal que en el hámster normal, al igual que su progenitor GPG/Vall, donde esta disminución era especialmente acusada en ciertos núcleos del complejo olivar superior y en la corteza dorsal del colículo inferior (Fuentes, 2001).

Estudiando genes implicados en la degeneración neuronal hemos encontrado que los GASH:Sal sobre-expresan los genes “puma” y “Noxa”, genes proapoptóticos que podrían explicar esta pérdida neuronal selectiva.

Se ha descrito también en la línea progenitora una disminución generalizada de GABA, especialmente en el núcleo central del CI y en el CS (Fuentes-Santamaría y cols., 2007, 2008). El CS núcleo también presentaba una reducción del volumen celular e hipertrofia de la capa profunda del CS (Fuentes-Santamaría y cols., 2007). Estas últimas observaciones aún no se han constatado en el GASH:Sal.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes en el hombre, desconociéndose actualmente los mecanismos celulares y moleculares que transforman una parte del cerebro normal en epiléptico. El estudio de las epilepsias ha sido dependiente del estudio de diversos modelos experimentales. Las consideraciones éticas no permiten a los neurocientíficos hacer uso de las modernas herramientas que la ciencia dispone hoy en día sobre cerebros humanos intactos. Por ello, mucho de lo que hoy se conoce sobre la epilepsia se debe a los estudios realizados en modelos animales sobre esta enfermedad. De entre todos los modelos experimentales, los de carácter genético constituyen un grupo muy útil, ya que un número muy importante de epilepsias infantiles muestran un claro componente genético y muchos de los síndromes clínicos sin una etiología definida, posiblemente se encuadren dentro de un componente claramente hereditario.

A la hora de emplear el hámster GASH:Sal como nuevo modelo de epilepsia, tenemos que estudiar los cambios genéticos que presenta en relación a los controles, para ver si estos cambios son los responsables de las convulsiones audiógenas que exhibe. Igualmente, es imprescindible evaluar el patrón de su respuesta electroencefalográfica durante las crisis, para catalogar éstas como episodios convulsivos o como verdaderas crisis epilépticas.

2. Objetivos

Nuestros objetivos principales para estandarizar y para establecer el hámster GASH:Sal como un modelo apropiado de epilepsia son los siguientes:

- 1- Estudiar la capacidad auditiva de estos animales, para ver si la menor susceptibilidad convulsiva observada con la edad se debe a la hipoacusia asociada al envejecimiento o a cambios en el sistema nervioso.
- 2- Analizar de la actividad eléctrica del sistema nervioso de los GASH:Sal durante las crisis
- 3- Conocer las estructuras nerviosas implicadas en la génesis y el mantenimiento de las convulsiones audiógenas en estos animales
- 4- Determinar los polimorfismos de ADN que puedan explicar la susceptibilidad de los hámsters a padecer convulsiones audiógenas

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño Experimental

Para abordar los objetivos nos hemos planteado el siguiente diseño experimental:

1. Para caracterizar audiológicamente a los animales de esta cepa, tanto jóvenes como de edad avanzada, realizaremos análisis de respuestas troncoencefálicas evocadas por estímulos auditivos, ABR (Auditory Brain Response).

2. Para analizar la actividad eléctrica del sistema nervioso de los GASH:Sal durante las crisis, realizaremos el registro de la actividad EEG (empleando implantes telemétricos) y la grabación de las crisis convulsivas (video-EEG).

3. Para estudiar las estructuras implicadas en las crisis, estudiaremos la captación de un isótopo radioactivo (glucosa marcada con flúor radioactivo, ^{18}F -FDG) por el sistema nervioso durante los episodios convulsivos. El análisis de las tomografías de emisión de positrones (PET) lo combinaremos con estudios de resonancia magnética del animal, cuyas imágenes nos permitirán obtener una referencia anatómica de dónde se están produciendo las captaciones de FDG.

Para obtener un mayor detalle de las estructuras nerviosas implicadas, realizaremos estudios inmunocitoquímicos comparativos de la expresión del gen *c-fos* en animales controles y GASH:Sal tras una estimulación acústica intensa.

4- Para determinar los polimorfismos de ADN que puedan explicar la susceptibilidad de los hámsters a padecer convulsiones audiógenas, analizaremos los fragmentos obtenidos por diversas enzimas de restricción (AFLP), que nos van a permitir comparar la diferencia genética entre el hámster GASH:Sal y el hámster sirio control.

2. Animales de experimentación

Para este estudio se han utilizado dos líneas de hámsters sirios (*Mesocricetus auratus*); por un lado los hámsters GASH:Sal (Muñoz y López, 2005) con susceptibilidad convulsiva audiógena, suministrados por el estabulario de la Universidad de Salamanca y por otro, hámsters dorados normales HsdHanTM:AURA, procedentes de Harlan Ibérica, (Barcelona, España).

Los animales fueron estabulados en el animalario Departamental (P.A.E. SA-001) de la Universidad de Salamanca, en régimen de libre acceso a la comida y al agua, siguiendo la legislación vigente (RD 1201/05) y las recomendaciones del convenio Europeo para la protección de animales vertebrados utilizados en experimentación y cols. fines científicos (DOCE L 222; 24-08-1999).

Se emplearon un total de 59 animales: 16 animales de 3 -12 meses de edad (8 de ellos controles) para los estudios de ABR; 13 animales de 2-6 meses para los estudios de EEG (3 de ellos controles); 22 animales de 3-9 meses para los estudios de EEG (10 de ellos controles); 8 animales de 4-6 meses de edad (3 de ellos controles) para los estudios de PET y los histológicos.

3. Técnicas empleadas

3.1. Medición de capacidad auditiva (ABR)

La obtención de potenciales evocados auditivos troncoencefálicos (ABR) para medir la capacidad auditiva se llevó a cabo en una cámara aislada acústicamente, que forma parte del sistema comercial de análisis de potenciales evocados TDT a (Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, USA), localizado en el servicio de evaluación funcional no invasiva (ENNI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM de Madrid. Para obtener el ABR, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una solución de 10 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Rompún®, Bayer, Leverkusen, Alemania) y 100 mg/kg de clorhidrato de Ketamina (Imalgene® 1000, Rhone Méréuse, Lyon, Francia). Se insertaron electrodos subdérmicos centrados sobre el vértex, de modo que estimulaba ambos oídos de forma simultánea, en la línea media entre los dos oídos (activos), en la región mastoide debajo del oído derecho (referencia) y en la región lumbar (tierra). Frente al oído del animal, a una distancia fija de 5 cm, se colocó un altavoz de libre-campo.

Se realizaron dos tipos de estímulos:

- estimulación con sonido click, para la determinación del umbral auditivo y de las latencias características de cada pico e interpicos.
- estimulación con tonos puros, para la obtención del audiograma

Los estímulos de sonido click y tonos puros fueron generados con el programa SigGen (TDT™). Los estímulos sonido click duraron 0,1 ms a una velocidad de 30 pulsos por segundo (pps). Los estímulos de tonos puros (4 a 40 kilociclos) duraron 5 ms (2,5 ms para la subida y el decaimiento sin meseta) y fueron presentados a 50 pps. Los datos fueron recogidos por un procesador en tiempo real (#RP2, TDT™) y analizados usando el programa de BioSig (#TDT™). La señal biológica fue filtrada (1500, 300 hertzios) y amplificada con un preamplificador de cuatro canales (#RA4PA, TDT™) con el nivel del rechazo del artefacto fijado en el 99% del umbral, concerniente a la entrada máxima del voltaje (10 voltios o señales de entrada). La ventana de la grabación fue de 10 ms de duración y fue accionada por un pulso que medía el tiempo del RP2 al inicio del estímulo. Los umbrales fueron determinados reduciendo la intensidad del estímulo en pasos de 10 dB hasta que no había respuestas evidentes. La intensidad del estímulo entonces fue aumentada de 5 o 10 dB hasta que la respuesta podía ser discernida de nuevo. El umbral entonces fue definido a la intensidad más reducida en la cual aparece una respuesta estado-apropiada con una amplitud mayor de 2 SDs sobre la actividad basal media .

El análisis estadístico fue realizado usando ANOVA con un análisis post hoc de Bonferroni realizado con SPSS (v.12 programa). Todos los valores se presentan como media \pm ESM

3.2- Obtención de electroencefalogramas

3.2.a. Sistema de radiotelemedría y grabaciones de vídeo

El sistema de emisión y adquisición de datos telemétricos está formado por un implante de telemetría cubierto de Teflon (transmisor TA10ETA-F20 de PhysioTel®; Data Science International -DSI-, Lexington, USA), placas de receptor RPC-1 (DSI), que recoge los datos del implante y los transmite a un matriz de intercambio de datos (DSI) que sirve como multiplexor. Para adquirir y analizar grabaciones de EEG, se utilizó el programa de Dataquest™ A.R.T™ 4.1 (DSI). La unidad de radiotelemedría fue diseñada específicamente para transmitir datos fisiológicos de animales de laboratorio conscientes, que se pueden mover con libertad (fig. 2). Las jaulas se colocaron sobre las placas individuales que capturan señales de datos del transmisor y las envían a una matriz del intercambio de entrada. La señal se envía al ordenador, que lleva incorporado el programa A.R.T de Dataquest, que convierte la salida digital en una salida analógica calibrada.

La grabación de los animales, separados en jaulas individuales, se realizó usando una cámara de vídeo digital Sony (# DCR-TRV8E) colocada a 20 cm de la jaula. Para todos los animales, se realizaron grabaciones de la actividad EEG del minuto antes de la inducción de la crisis, y de los dos minutos siguientes, abarcando las fases ictal y post-ictal. La fecha/hora de vídeo fue sincronizada con la señal digital de los registros electroencefalográficos

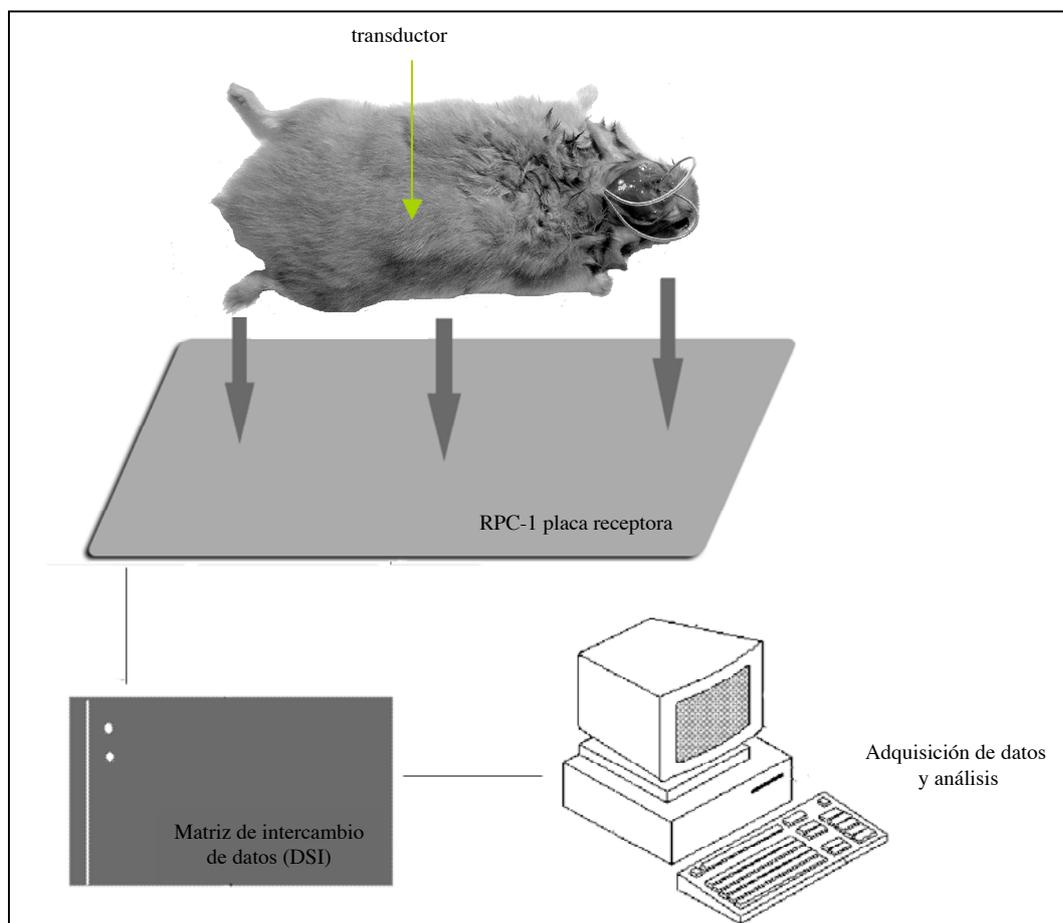


Figura 2. Instalación de radiotelegrafía para monitorización de la actividad electroencefalográfica.

El transmisor TA10ETA-F20 (DSI) implantado envía por telemetría datos de la actividad eléctrica cerebral de los hámsters al receptor (RPC-1, DSI), información que pasa posteriormente a una matriz del intercambio de datos (DSI) que sirve como multiplexor. Los datos finalmente se transfieren a un sistema informático de adquisición y análisis de datos

3.2.b. Implantación de la unidad de telemetría

Los hámsters fueron anestesiados según el procedimiento descrito anteriormente. Una vez anestesiados se depiló la zona rostral al ángulo ocular, entre los oídos, y a través del cuello y los hombros, y se desinfectó la zona con solución yodada. Se realizó una incisión de 15 mm en la línea media del

plano sagital exponiendo la porción dorsal del cráneo , al separa la piel de la zona.. Usando tijeras de disección roma, se realizó un túnel en dirección caudal a la incisión, para realizar bolsillo subcutáneo en la región lumbar, irrigando posteriormente con solución salina. Se colocó el transmisor radiotelemétrico en el bolsillo (fig. 3) y los cables fueron llevados rostralmente hasta el cráneo expuesto.

El periostio fue limpiado usando torundas de algodón tratadas con H_2O_2 al 10% para quitar cualquier resto de tejido y permitir la fijación con cemento dental (Meliodent, Bayer dentales, Reino Unido). Con un taladro dental eléctrico de alta velocidad, se realizaron dos agujeros, cada uno de 0,8 milímetros de diámetro, situados 1 mm laterocaudalmente a la bregma en cada hemisferio. Se eliminó el extremo terminal de aislamiento del silicona del extremo de cada cable siendo dispuesto el cable de acero sobre la duramadre para fijarlos posteriormente con cemento dental (Meliodent, Bayer UK Ltd., Newbury, Reino Unido) asegurándolos al cráneo, y suturando la herida con grapas quirúrgicas. Después de cirugía, los hámsters fueron colocados en jaulas individuales.

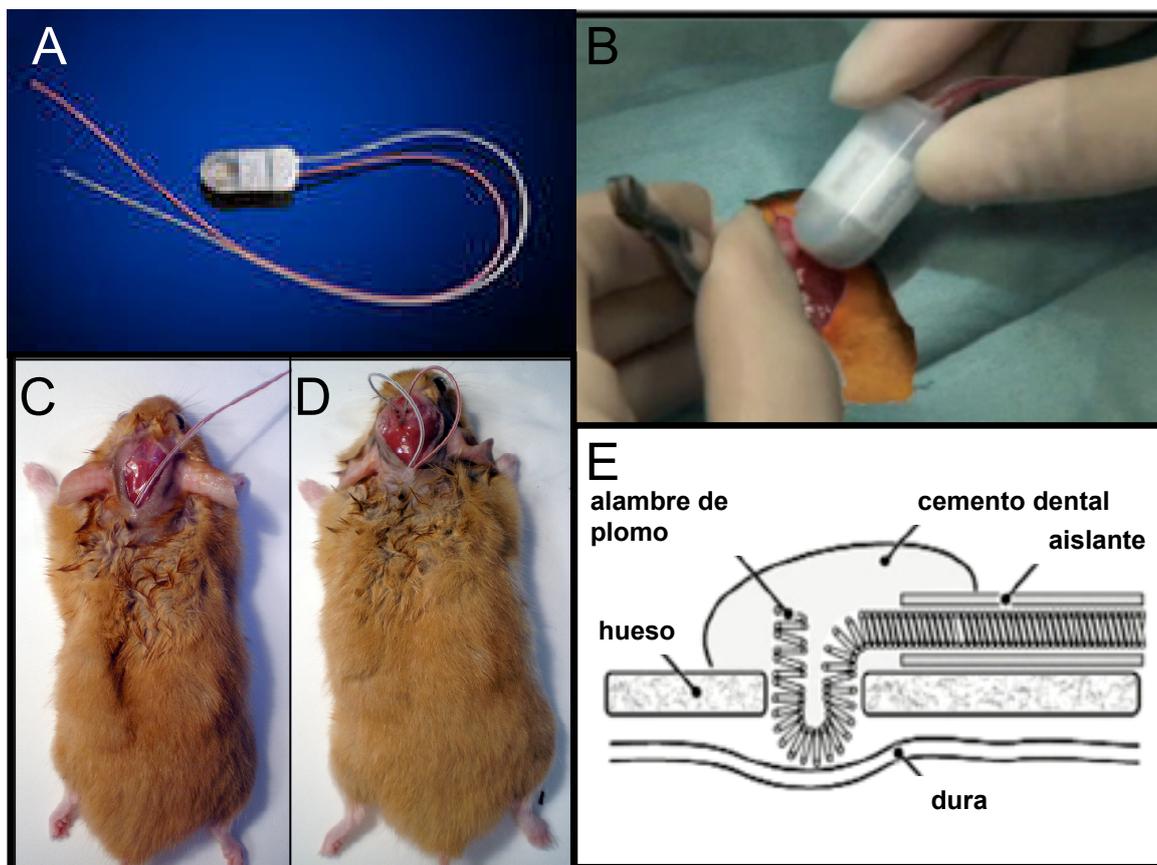


Figura 3. Implante telemétrico y su colocación en el animal

Implante telemétrico (A), colocación en el animal (B) y posicionamiento de los electrodos sobre la duramadre (C).

3.2.c. Adquisición de datos electroencefalográficos

Tras un período postoperatorio mínimo de 10 días, se sometieron los animales a las pruebas de estimulación, registro EEG y grabación de las crisis. Las grabaciones fueron repetidas dos veces por semana durante dos o cuatro semanas, según los animales, siempre en la misma franja horaria, entre las 11am y 1pm. La actividad EEG fue medida a 1000 Hz, con un filtro de paso a 150 Hz. Los animales fueron sometidos a un estímulo acústico capaz de inducir las crisis con las características de ruido blanco continuo de 44.100 hertzios generados por el programa Cool Edit Pro 1. (Sytrillium Software Corporation, Phoenix,

Arizona), amplificado hasta 90dB SPL por un amplificador estándar y medido por un sonómetro digital (Radio Shack, # No. 33-2055). Las pruebas de crisis audiógenas se realizaban presentando el estímulo sonoro de forma continuada hasta que el animal presentaba la fase convulsiva, o bien hasta 60 segundos de duración máxima.

3.2.d. Análisis de datos

Todos los registros generados por bio-potenciales de EEG fueron realizados en el programa de análisis I A.R.T. de DataQuest. La manifestación de la actividad epileptiforme fue determinada mediante el análisis sincrónico de los registros EEG registros junto con los comportamientos observados en las grabaciones de video. Los “spikes” fueron clasificados como picos en la grabaciones de EEG con tiempos de la amplitud con más de dos veces la amplitud basal y una duración de menos de 70 ms. Las ondas agudas (sharp waves) fueron definidas como picos del registro con una duración de más de 70 ms.

3.2.e. Análisis estadístico

Los datos de EEG adquiridos con DataQuest A.R.T. fueron procesados para puntuar eventos durante las diversas etapas de las crisis. Las características de los procesos que ocurren durante los conjuntos de picos de EEG, basadas en umbrales de amplitud y otras propiedades de las ondas, se calcularon usando la transformada rápida de Fourier (FFT) para intervalos de 2 s en cada etapa. Los datos fueron procesados usando el programa SPSS. Para establecer las diferencias entre los valores medios de los picos electroencefalográficos durante las diversas etapas de las crisis, se realizó un análisis comparativo, aplicando el test t de

Student para muestras independientes o bien con el test ANOVA (cuando se comparaban más de 2 muestras) seguido por la prueba post hoc Turkey-Kramer. Los datos se expresan como media \pm el error estándar de la media (SEM). El nivel de significación empleado fue de 0,05 ($p \leq 0,05$).

3.3. MicroPET y resonancia magnética

3.3.a. Adquisición de la imagen metabólica



Figura 4. Tomógrafo PET para pequeños animales

Micro PET y equipo de anestesia gaseosa usado (Cibertec, Madrid) en el Laboratorio de Imagen Molecular del Instituto pluridisciplinar de la UCM.

Para la realización de estos estudios en hámsters controles y GASH, se empleó como radiotrazador ^{18}F -FDG, dejando en ayunas a los animales 6 h antes del inicio de los estudios, para evitar así la interferencia de la glucosa plasmática con el radiotrazador.

El protocolo seguido fue el siguiente: se administró el radiotrazador ^{18}F -FDG (actividad 14,79 MBq) por vía i.p.. Quince minutos más tarde se procedió a la estimulación auditiva. Posteriormente, se dejó un tiempo adicional de 30 minutos hasta el momento de llevar a cabo la adquisición de la imagen PET. Para asegurar la inmovilización durante los registros de PET, los hamsters fueron anestesiadas inhalatoriamente con isofluorano al 2%.

Se realizaron dos tipos de ensayos para los dos grupos experimentales de hámsters: adquisición de la imagen metabólica en condiciones basales y tras 15 minutos de una estimulación auditiva intensa.

El equipo utilizado es un tomógrafo PET específico para animales pequeños (Albira PET, OncoVision, Valencia) (Fig. 4), el cual presenta una resolución de 1.5 mm y un campo axial de 4 cm y transaxial de 8 cm. Una vez transcurrido el tiempo de incorporación se procedió al registro de la imagen cerebral mediante la realización de un estudio estático durante 60 minutos. Todas las imágenes se reconstruyeron mediante el algoritmo OSEM (3 iteraciones) y se les aplicaron las correcciones de tiempo muerto, “decay”, “scatter” y “random”.

Las resonancias se hicieron en el SIEMAC (UAM, Madrid), empleando un escáner de Resonancia Magnética de alto campo, Bruker Pharmascan (7,0 Teslas).

3.3.b. Análisis de imagen

La cuantificación de los estudios se llevó a cabo mediante el análisis de las imágenes de actividad obtenidas por el equipo Albira PET, El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático especializado PMOD

(versión 2,9). Para el análisis de las imágenes de cada rata, las imágenes PET obtenidas a los diferentes tiempos del estudio se fusionaron con su correspondiente imagen de RMN, previamente corregistradas con la imagen de RMN obtenida en el estudio basal de la rata correctamente reorientada. Sobre dicha imagen de RMN se dibujan las regiones de interés (VOIs) de las distintas áreas a estudiar (colículo inferior, hipocampo y cerebelo). Posteriormente las VOIs se trasladaron a la imagen estática de PET, permitiendo obtener así la actividad para cada región.

Los resultados obtenidos para cada estructura se expresan en función de la actividad captada por la estructura (μCi) y se normaliza en función de la actividad inyectada (también en μCi) y del volumen de la región en estudio.

3.4. Estudios histológicos

3.4.a. Obtención de muestras

Previo a la obtención de las muestras de tejido nervioso, se indujeron crisis convulsivas en los hamsters GASH:Sal, usando un estímulo acústico que consistió en un ruido blanco continuo de 44,100 Hz, generado por el programa Cool Edit Pro 1.2 (Sytrillium Software Corporation, Phoenix, Arizona) y amplificado a 90dB SPL por un amplificador estándar. El nivel sonoro se comprobó mediante un sonómetro digital (Radio Shack, # No. 33-2055). Los cerebros del hámster fueron procesados para inmunoreactividad de c-fos a los 30 minutos posteriores a la inducción de las CCA. Como controles, los hámsters no susceptibles a padecer crisis convulsivas (hámsters dorados normales) fueron expuestos al mismo estímulo acústico y procesados de igual forma.

Los hámsters fueron perfundidos transcárdialmente bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico (60 mg/kg vía i.p.), con tampón salino fosfato (TFS) 0,1M pH 7,4 seguido por paraformaldehído al 4% en TFS. Tras la perfusión del animal, se extrajo el cerebro de la cavidad ósea, post-fijándolos en la misma solución de fijación, y se crioprotegieron por inmersión en sacarosa al 30% en TF durante 48 horas. Posteriormente, el cerebro se cortó con un microtomo de congelación (HM 400 de Microm, Heidelberg, Alemania) obteniéndose secciones transversales de 40 μm de grosor. Las secciones se recogieron alternativamente en una serie de 4 pocillos en una solución de TF. Las secciones se procesaron diferentemente según la técnica empleada. Una vez procesadas, se colocan las secciones en orden caudo-rostral sobre el portaobjetos, utilizando una solución de gelatina al 0,2% en una solución tamponada Tris HCl 0,05M, pH 7.6. Los portas se deshidrataron y se protegieron con un cubreobjetos, utilizando el medio óptico Entellán (Merck, Darmstadt, Alemania) para sellarlo.

3.4.c. Técnicas de inmunotinción

Las secciones del cerebro fueron pretratadas 5 min con una solución TBS -Tritón X-100 a la que se añadió H_2O_2 al 0,5% y, posteriormente, media hora en una solución al 4% de suero normal de cabra inactivado (NGS) en TBS -Tritón X-100, para bloquear la actividad antigénica inespecífica. Dos de las series se incubaron 48 h a 4° C con un anticuerpo primario específico diluido en TFS- 0,3% Triton X-100 y 4% NGS; una de ellas con un anticuerpo primario (anti-Fos) hecho en conejo (# sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dil. 1/2500). Tras sucesivos lavados en solución amortiguadora, se incubaron con un anticuerpo secundario biotinado (IgG de cabra contra IgG de conejo; #BA-1000

Vector, Burlingame, California, EE.UU.; dilución 1/200 en TBS-Tx 0,05M pH 7.6) durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron incubadas 90 min a temperatura ambiente en el complejo complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Standard-kit #PK 4000; Vector Labs.), de acuerdo con el procedimiento descrito por Hsu y cols, (1981). Para visualizar la reacción antigénica, se empleó 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB, # D-9015, Sigma-Aldrich) como cromógeno, incubando las secciones en la solución de reacción histoquímica compuesta por H₂O₂ (0,003%) y DAB (0,07%) en Tris 0,05 M, pH 7,4. La incubación en la solución de reacción fue realizada bajo control visual con el microscopio óptico, invirtiendo una media de 15 minutos. El procedimiento detallado se puede ver en los anexos.

3.4.c. Análisis cualitativo

Las secciones se estudiaron, dibujaron y fotografiaron con un microscopio Leica DMLB equipado con lentes objetivo Pan-Neofluar de 2,5x (A.N. = 0,07), 5x (A.N.= 0,12), 10x (A.N. = 0,30), 20x (A.N. = 0,50), 40 x (A.N. = 0,70), y 100x de inmersión en aceite (A.N. = 1,40). Las fotografías de las secciones fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-70 acoplada al microscopio. Una vez almacenadas las imágenes en un ordenador, a fin de ajustar exclusivamente el brillo, el contraste y el equilibrio de color de las ilustraciones, cada documento digital fue tratado con el programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems). La composición de las distintas figuras fueron elaborados con el programa Canvas 7.0. Se utilizó el atlas estereotáxico de cerebro para hámster dorado (Lawrence y cols., 2001) y las planchas seriadas procesadas histoquímicamente para visualizar la acetilcolinesterasa empleadas de rutina en el laboratorio (Fuentes-Santamaría,

2001) como modelos para ordenar caudo-rostralmente las secciones y como referencias citoarquitectónicas (ver anexos). Todas las imágenes fueron combinadas y maquetadas para formar planchas con la ayuda del programa Canvas 7.0.

3.4.d. Análisis cuantitativo

Hemos comparado entre los grupos experimentales la densidad óptica de secciones de los colículos inferiores inmunotinizadas para el reconocimiento de la proteína Fos. Este método nos permitió asociar un valor objetivo a la intensidad de inmunotinción.

Para este procedimiento, hemos aplicado un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio, que incluye obtención de las muestras, calibración del equipo de adquisición de imágenes (microscopio y cámara), obtención de imágenes, calibración de la densidad óptica, medida de la densidad óptica de la inmunotinción y normalización de los resultados.

Nos hemos centrado en el colículo inferior, por ser la región de interés, analizada también por PET y, sobre este núcleo, hemos determinado los límites de las diferentes subdivisiones anatómico-funcionales. Con las imágenes digitales de los colículos inferiores, hemos realizado los análisis densitométricos midiendo la densidad óptica integrada (el producto de la densidad óptica media por el área) de dicha región. Con los datos numéricos obtenidos, se realizó un análisis comparativo, entre los controles y los GASH:Sal, aplicando el test t de Student para muestras independientes, obteniéndose las medias, la desviación estándar y el

error estándar de cada grupo estudiado, con un intervalo de confianza del 95 %, 2 grados de libertad y un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

3.5. Obtención y análisis de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción

El procedimiento para la obtención y análisis de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción (AFLP, Amplified fragment length polymorphism) fue realizado según el método descrito por Vos y cols., (1995) con algunas modificaciones para nuestro estudio.

La técnica, tras la extracción y purificación del ADN genómico, implica seis pasos: i) digestión enzimática de este ADN usando dos enzimas de restricción, (ii) ligamiento de los adaptadores a los fragmentos generados, (iii) preamplificación de los fragmentos de ADN mediante cebadores (*primers*) que contienen con una base selectiva, (iv) una amplificación selectiva final con la adición de uno o más bases selectivas a los cebadores usados, (v) electroforesis de los fragmentos resultantes amplificados y (vi) análisis de los fragmentos amplificados y separados, utilizando un secuenciador automático de ADN.

3.5.a. Extracción y purificación de ADN

El ADN genómico fue extraído y purificado de sangre total mediante el reactivo comercial DANzol® (#DN127, Molecular Research Center Inc.; Cincinnati, OH, USA). Seguidamente, se procedió a cuantificar este ADN genómico total midiendo la adsorción de luz (260 nm) en un espectrofotómetro (Spectronic

BioMate 3; Thermo Fisher Scientific, Inc., Europa), utilizando posteriormente, una solución de trabajo aproximada de 40-50 ng/ml.

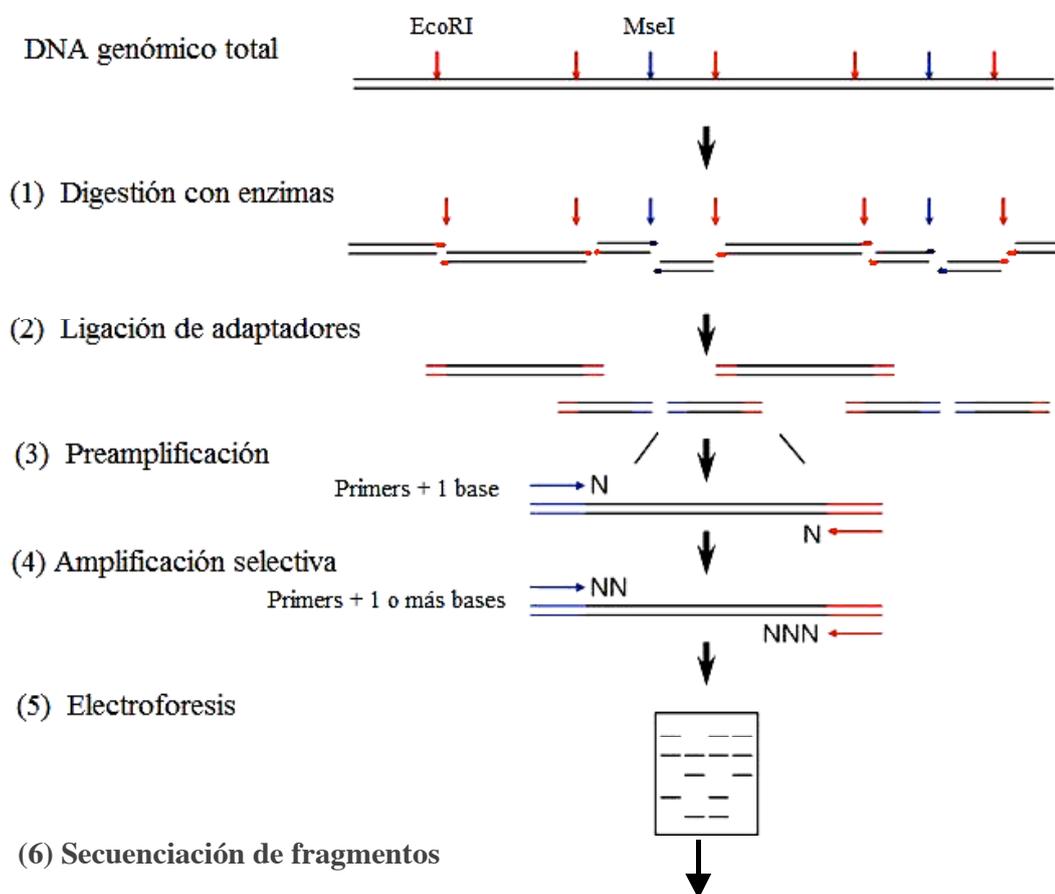


Figura 5. Esquema del procedimiento seguido en el AFLP

3.5.b. Técnica de AFLP

Aproximadamente, 150 ng de ADN genómico de cada una de muestras ha sido digerido con las enzimas de restricción EcoRI (#R6011, Promega; Madison, WI, USA) y MseI (#15494-016, Invitrogen). La digestión se llevó a cabo durante 3h a 37°C con una concentración 1X REact I tamponado (#Y90002, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), 3,6 unidades de *EcoRI* y 4 Unidades de *MseI* (4.0 U) en un volumen total de 20ml. La extremidad de los fragmentos generados han sido ligados a los adaptadores correspondientes a cada enzima de restricción (Isogen Life Sciences; Maarssen, Netherlands). La ligación se ha realizado en 40ml, los cuales contenían los 20ml de la digestión, una concentración de solución tamponada de ligasa 1X, 1,8 mM de cada adaptador, 1,0 mM ATP (#C126, Promega) y 1,2 Unidades de T4 DNA ligasa (#M1801, Promega). La reacción se ha efectuado a 4°C durante una noche. El producto de la ligación fue diluido a 1/5 y usado para la preamplificación.

La preamplificación ha sido realizada en 25 ml que contenía 1X Colorless GoTaq® Reaction Buffer con MgCl₂ (#M792A, Promega), 0,2mM dNTPs Mix (#U1511, Promega), 0,3mM de cada primer (Isogen) a los cuales se les ha añadido una base selectiva, 5ml de la ligación diluida y 1,25 U GoTaq® DNA Polimerasa (#M3171, Promega).

La PCR se realizó en un termociclador (Primus 96 plus. MWGT Genomic Technology) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 1 minuto a 72°C; 20 ciclos de treinta segundos a 94°C, un minuto a 56°C, y 3 minutos a 72°C, y un ciclo final de 5 minutos a 72°C. La amplificación selectiva se llevó a cabo en un tubo de reacción de PCR de 25 µl, que contenía: 5 µl de producto

de la preamplificación diluido a 1/20, 1x buffer GoTaq® (#M792A, Promega) con MgCl₂, 1,25 U GoTaq® DNA Polymerase (#M3171 Promega), 0,2mM dNTPs mix (#U151A, Promega), 0,5 µM del primer de *MseI* y 0,2 µM del primer *EcoRI* FAM marcado (Isogen). En esta amplificación, los cebadores contenían 2 bases selectivas y el primer EcoRI se marcó con 6-FAM con el fin de que la separación de los fragmentos se pudiera realizar con un secuenciador capilar. Se utilizaron seis combinaciones de primer: E32/M48, E32/M58, E32/M60, E35/M48, E35/M58, E35/M60. Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla I, incluida en el anexo V.

La PCR para la amplificación selectiva se hizo en las siguientes condiciones: un ciclo de 2 minutos a 94°C, 13 ciclos compuestos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C (con una disminución de 0,7°C después de cada ciclo), y 90 segundos a 72°C, después se continuo con 25 ciclos compuestos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C, y 90 segundos a 72°C, y finalmente se efectuó la extensión a 72°C durante 5 minutos.

3.5.c. Secuenciación automática de ADN

Las reacciones de secuenciación automática de los fragmentos de AFLP se llevaron a cabo en el servicio central de secuenciación de la Universidad de Salamanca, que está dotado de un secuenciador automático ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Para ello se mezclaron en un tubo eppendorf 1,0 µl de cada producto de PCR con 9,0 µl de formamida y 1,5 µl de señalizador fluorescente formado por 60-400 bases (CXR-400; #DG6221, Promega) y se realizó un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos antes de la separación de los fragmentos.

3.5.d. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos

Tras la separación de fragmentos, se creó una hoja de cálculo para cada muestra, utilizando los programas GeneScan Analysis (Applied Biosystems) y Genotyper™ version 2.1 (Applied Biosystems). Los datos se importaron en el programa GeneMarker® (Softgenetics LLC, PA, USA). Los fragmentos son representados por picos, si el pico supera una cierta altura umbral es identificado como fragmento presente (1) y si no la supera como ausente (0). La lectura de los picos es efectuada de forma automática por el software y sucesivamente verificada y corregida a mano. El resultado final de este análisis es una matriz binaria presencia/ausencia (1/0) de las bandas.

Para los análisis estadísticos, los animales GASH:Sal y los controles se consideraron como dos poblaciones diversas, también, porque el análisis de AFLP produce marcadores multi-locus dominantes. Se asumieron las poblaciones en la proporción equilibrada de Hardy-Weinberg. La diversidad genética y la estructura genética de las poblaciones fueron analizadas usando el programa AFLP-SURV (Vekemans, 2002), según el cual se calcularon la heterozigosis total del gen (HT), la diversidad media del gen entre las poblaciones (HB) (Nei, 1987), la diversidad media del gen dentro de las poblaciones (H_w) -basadas en el acercamiento de Lynch y de Milligan (1994), análogo a la diversidad genética de Nei (Nei, 1987)-, y índice de fijación de Wright (FST) (Wright, 1969). Con este programa han sido también calculados los porcentajes de bandas polimórficas en GASH:Sal y en controles.

IV. RESULTADOS

1. Estudio de las respuestas auditivas troncoencefálicas

El registro típico de ABR en hámster es una onda formada por 5 picos (figura X) correspondientes a diferentes estaciones nerviosas de la vía auditiva periférica y central (tronco cerebral).

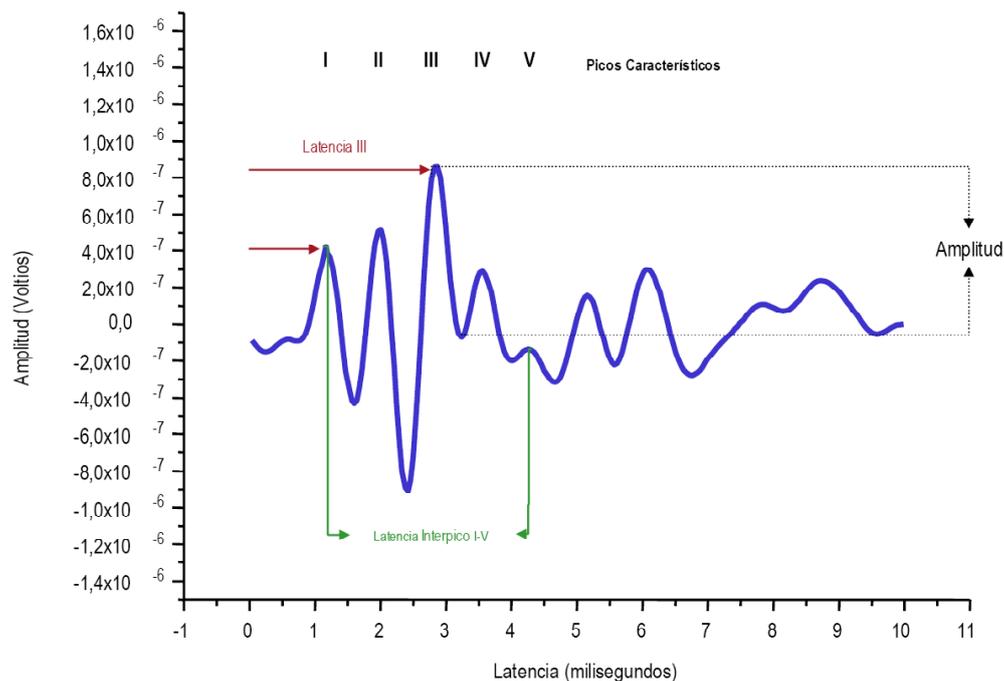


Figura 7. Caracterización de una onda de ABR típica de roedores

Los diferentes picos se corresponden con el registro de la actividad eléctrica generada por las neuronas de la vía auditiva: la cóclea (I), los núcleos cocleares (II), el complejo olivar superior (III), el lemnisco lateral (IV) y el colículo inferior (V)

Los ABR realizados en *Mesocricetus auratus* normales y en los de la línea GASH:Sal, nos informa sobre la respuesta cerebral al sonido en estos animales, pudiendo apreciarse un alteración en la respuesta al sonido de estos últimos en relación a sus controles (figura 8).

El ABR posibilita la determinación del umbral auditivo y de la velocidad de conducción del estímulo sonoro entre los distintos núcleos del tronco cerebral.

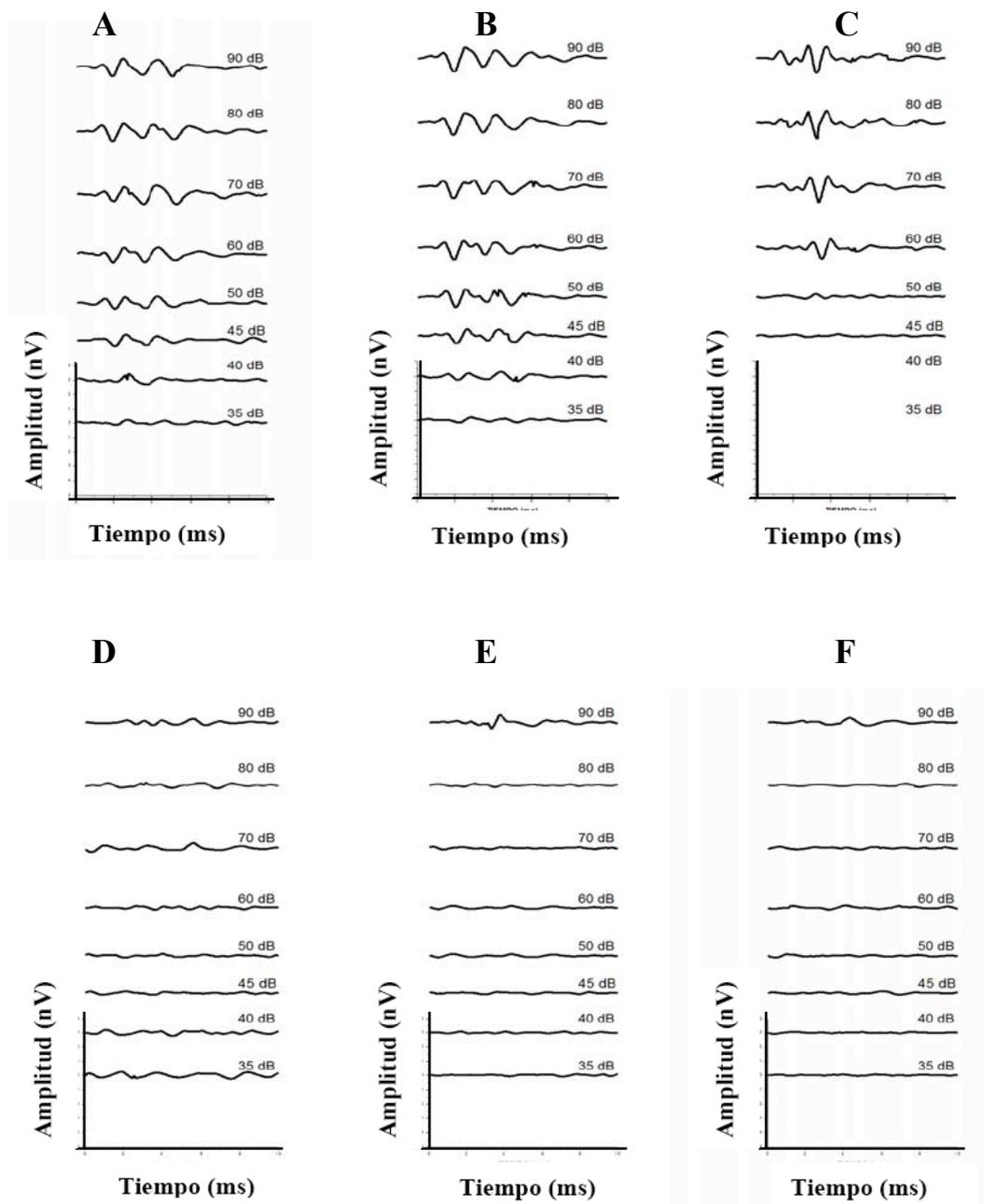


Figura 8. Registros de ABR de 6 individuos representativos del estudio.

En la fila superior encontramos hámster del grupo control de 3 meses (A), de 9 meses (B) y un control de 9 meses con un umbral de 60 dB SPL (C). En la línea inferior se muestran registros de los GASH:Sal; con 3 meses (D), 6 meses (E) y 14 meses (F). Cada división en la abcisa es de 10 ms

1.1. Umbrales auditivos

Los animales control de 3 meses presentan un valor medio de umbral de 40 dB SPL (DS= 2,62). La figura 1 representa los valores de umbral de los cuatro individuos control de 3 meses y 9 meses. Los hámsters control de 9 meses muestran valores de umbrales muy similares, aunque uno de ellos presenta una sordera moderada, con un umbral de 60 dB SPL y media de 46 dB SPL (DS= 9,52) (fig. 9).

Los GASH:Sal presentan umbrales muy elevados (fig. 9), iguales o superiores a los 90 dB SPL lo que que indicaría una sordera profunda si no se presentaran las crisis audiógenas. La intensidad máxima que proporciona el equipo de estimulación-registro es de 90 dB SPL, y desde esta intensidad va disminuyendo gradualmente en pasos de 5-10 dB hasta llegar a los 20 dB SPL como intensidad mínima. Algunos animales, sólo mostraron registros válidos (morfología característica, amplitud de los picos superior a la amplitud del ruido eléctrico) con la intensidad máxima, y se les asignó un umbral de 90 dB SPL. Otros, presentaron registros aberrantes a todas las intensidades. En estos casos, el umbral queda indeterminado, aunque sabemos que es superior a los 90 dB SPL. Por razones prácticas y para poder representarlo gráficamente, asignamos a estos animales un umbral de 100 dB SPL.

Partiendo de que todos los GASH:Sal presentaron umbrales iguales o superiores a los 90 dB SPL (Fig. 9), nos parece interesante comentar que el número de animales con umbral mayor de 90 dB SPL fue aumentando con la edad, de tal

manera que en grupo de 3 meses no encontramos ninguno (0/4), en el grupo de 6 meses aparecen dos animales (2/4) y en el grupo con 14 meses, tres (3/4).

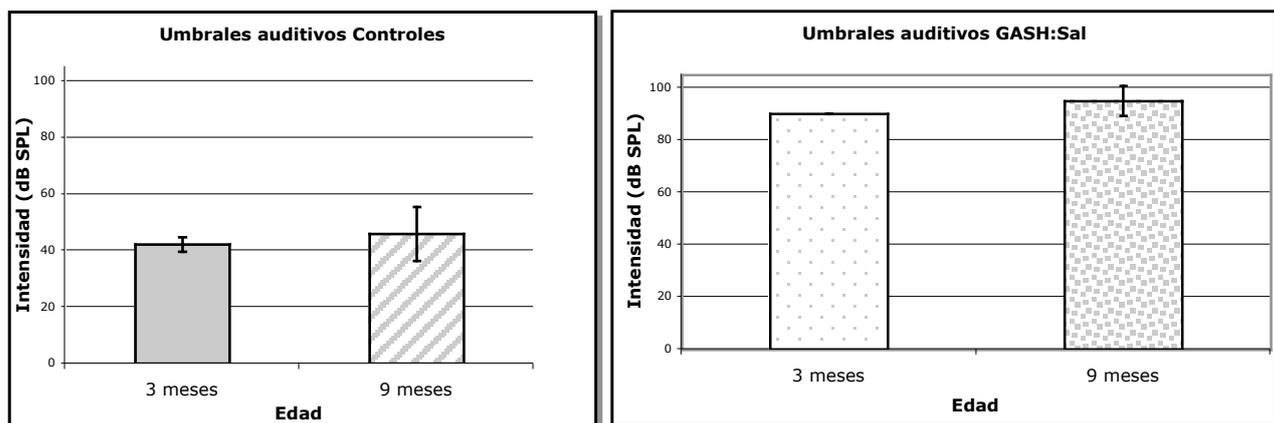


Fig. 9. Umbrales auditivos de animales controles (A) y GASH (B) de 3 y 9 meses de edad

Los controles presentan un umbral de respuesta medio a los 3 meses de 42,25 (DS= 2,3) frente a los 90 dB SPL (DS= 0) de los GASH:Sal. A los 9 meses, el umbral de respuesta medio de los controles es de 46 dB (DS= 0), frente a los 95 dB (DS= 5,77) de los GASH:Sal. Los animales de 3 meses presentan valor de umbral media de 90 dB (y los de 9 meses presentan un valor media de umbral de 95 dB (DS= 5,77). n = 4

1.2. Velocidad de conducción

Las latencias determinan el momento en el que aparece cada uno de los picos del registro ABR tras las emisión del estímulo y reflejan la velocidad de transmisión del estímulo a lo largo de la vía auditiva. Las latencias interpico determinan la velocidad con la que dicho estímulo se transmite entre diferencias estaciones de la vía auditiva.

Hemos calculado las latencias de los cinco picos característicos del registro ABR, así como las latencias interpico I-II, I-III, y I-IV tras las estimulación con sonido tipo click a 30 pps e intensidad 70 dB SPL. No se encuentran diferencias entre los controles y los gash: a los 3 meses (Fig 10B), lo que indica que los

hamsters problema no presentan alteraciones en la conductividad del estímulo nervioso a lo largo de la vía auditiva.

Los datos de las mediciones individuales que han dado origen a las gráficas posteriores, se encuentran en el anexo IV.

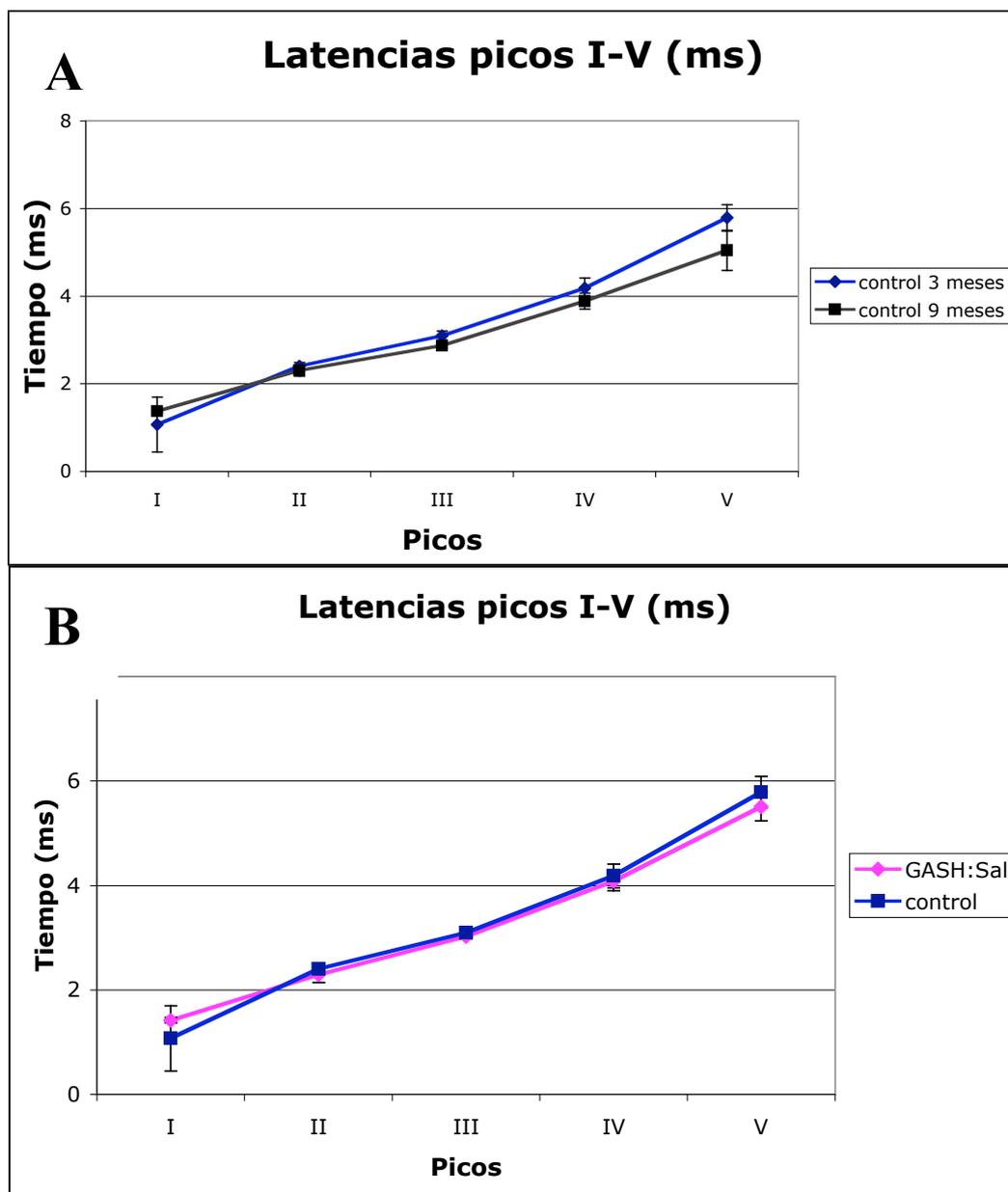


Figura 10. Latencias de los picos I a V, medidas a 70 dB, en el hámster sirio *Mesocricetus auratus*

Valores medios y desviaciones estándar (DS) de las latencias de los picos I a V de los animales controles (A) y (B), comparación entre las poblaciones de hámster control y GASH:Sal de 3 meses de edad. Los valores se han obtenido tras la estimulación con clips (30pps) y medidas a 70 dB. n = 4

Por otro lado, hemos calculado las latencias interpico I-II, I-III y I-IV en hámsters del grupo control y GASH:Sal de 3 meses de edad. Puesto que los animales GASH:Sal presentan un umbral alto de respuesta al sonido a todas las edades, el único modo de comparar las latencias absolutas e interpico entre animales problema y control fue a la máxima intensidad sonora (90 dB SPL).

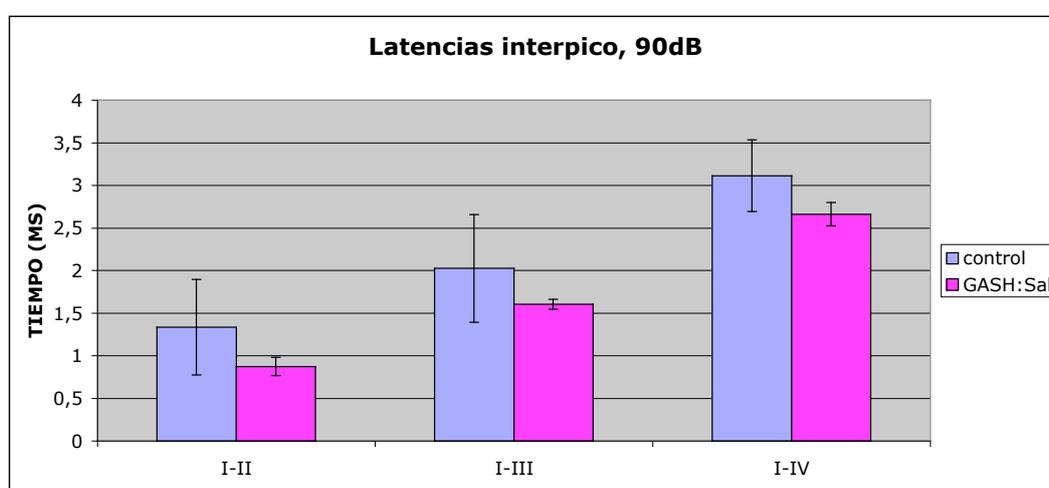


Figura 11. Latencias interpico, medidas a 90 dB SPL, en hámsters controles y GASH:Sal de 3 meses.

Los registros utilizados para el análisis de las latencias en los individuos problema son cuatro del grupo con 3 meses, 2 del grupo con 6 meses y tan sólo 1 del grupo con 14 meses (tabla 3).

ID HAMSTER	EDAD (meses)	I	II	III	IV	V
2787	3	1,481	2,509	3,044	4,277	5,881
2788	3	1,398	2,262	2,961	3,907	5,306
2789	3	1,439	2,221	3,044	4,195	5,306
2790	3	1,357	2,18	3,044	3,948	5,552
2755	6	1,481	2,221	2,879	3,743	4,894
2756	6	1,481	2,303	3,249	3,866	5,676
2675	14	1,769	2,591	3,537	4,318	5,306

Tabla 3. Latencias interpico, medidas a 90 dB SPL, en animales GASH:Sal.

Las latencias absolutas de los picos son mayores para los animales GASH:Sal, en todas las edades. Además, las latencias se van incrementando con la edad.

1.3. Audiograma

El audiograma se realizó determinando el umbral auditivo para una serie de frecuencias o tonos puros en un rango entre 4 y 40 kHz. En los animales controles, los audiogramas son muy similares en los individuos de 3 y 9 meses, presentando los mejores umbrales para frecuencias entre 4 y 16 kHz.

Como puede observarse en la figura 12, los umbrales para las diferentes frecuencias del audiograma de los GASH:Sal son muy altos, pudiéndose apreciar la gran diferencia existente entre ambos grupos experimentales. Los animales problema presentan umbrales más elevados para todas las frecuencias estudiadas. La morfología del audiograma en el rango analizado es sigmoidea, similar a la de los animales problema, con mejores umbrales para las frecuencias 8 y 16 kHz.

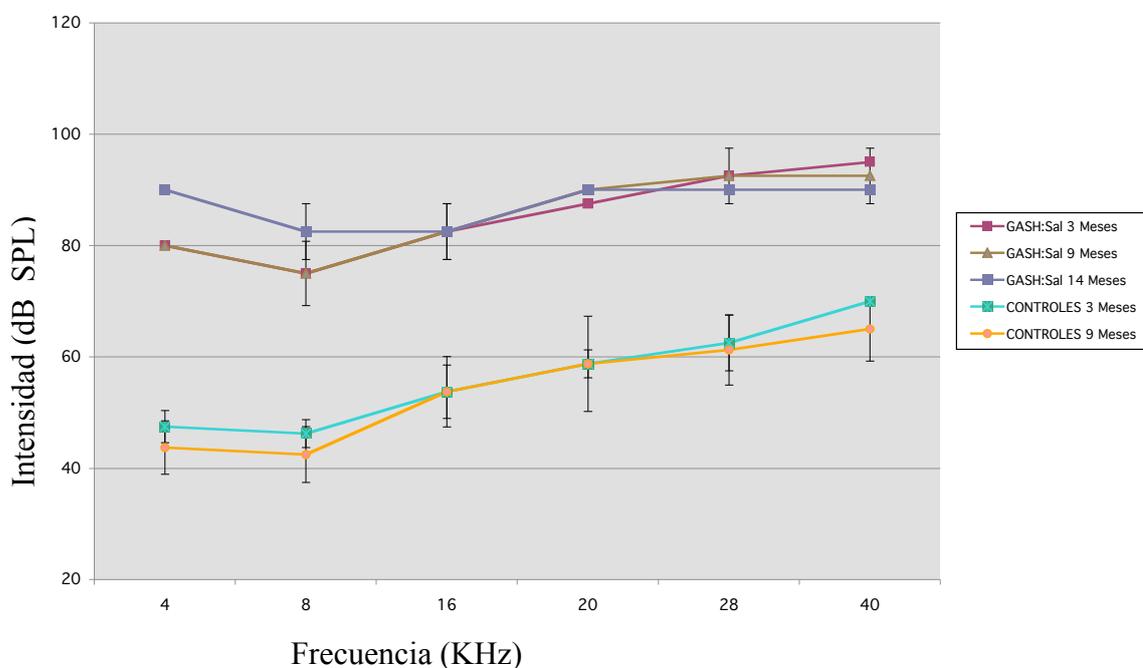


Fig. 12. Audiograma de hámsters controles y GASH:Sal

Audiograma promedio de los GASH:Sal de 3, 6 y 14 meses, así como el de los individuos del grupo control de 3 y 9 meses, y desviaciones estándar. n= 4 para los controles; n= 4 GASH:Sal de 3 meses; n=2 para los de 6 meses y n= 1 para los de 14 meses.

2. EEG

Todos los animales GASH:Sal presentaron una respuesta motora más o menos compleja tras la estimulación auditiva intensa. La mayoría presentaron crisis generalizadas completas, aunque, esporádicamente, algunos animales sólo mostraron la fase de carrera tras la sobrestimulación acústica. Los animales del grupo control no presentaron ninguna actividad de crisis, por lo que no se incluye el análisis de sus registros electroencefalográficos. Las crisis incompletas presentan varias fases de carrera salvaje que terminan con la inmovilidad del animal al apagar el estímulo. En estos casos, los animales no exhibieron marcadores electroencefalográficos típicos de actividad de crisis, por lo que no se realizaron más análisis de estos animales. En los animales GASH:Sal, una crisis completa típica, desencadenada por el estímulo acústico, comienza con un periodo de latencia de unos 20 s, continúa unos 20-30 s [MC1] con una carrera salvaje, para cesar de forma brusca y caer el animal al suelo adoptando postura de opistótono (con el tronco arqueado hacia delante). Inmediatamente, se presentan convulsiones tónico-clónicas generalizadas, continuando con una fase tónica de progresión craneocaudal y concluyendo en un período estuporoso postictal (Fig. 14). La inspección visual de los datos de EEG sincronizados con la grabación de vídeo permitió la detección de patrones característicos de la progresión de la crisis, que se corresponden con las fases conductuales de las convulsiones audiogénicas del hámster GASH:Sal (Fig. 13); tanto la fase de carrera salvaje, como la de contracciones tónico-clónicas se diferencian de las demás en la amplitud y en la frecuencia de descarga. En los EEG, se aprecia una secuencia progresiva típica de actividad; tras la carrera salvaje, hay un descenso en la

actividad eléctrica durante el opistótono, caracterizado por una disminución en la amplitud de las ondas registradas, continuando con ondas rápidas reclutantes de punta-onda complejas, de gran amplitud y frecuencia rápida, que se corresponden con las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y que alcanzan su máximo en la fase de extensión tónica (Fig. 13). Estas descargas disminuyeron en amplitud conjuntamente con la atenuación y el cese de las convulsiones. En el periodo postictal, el EEG se aplanó, mostrando una disminución casi total de la actividad cerebral, permaneciendo así hasta que el animal se recupera espontáneamente.

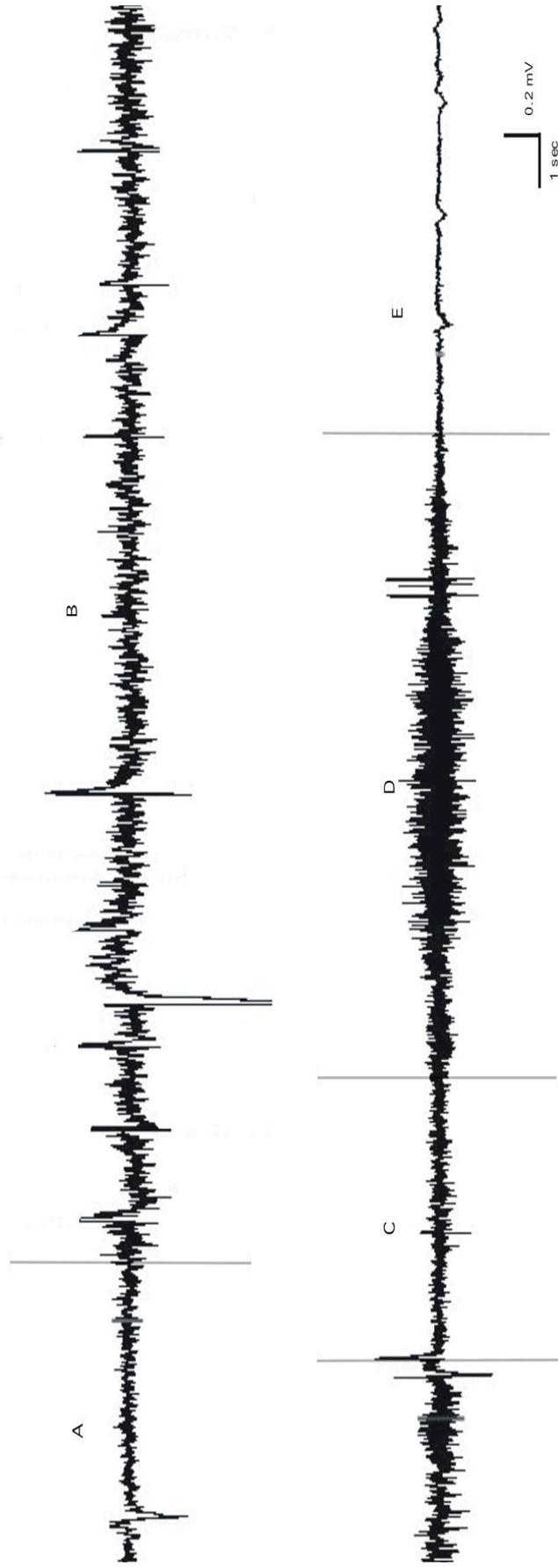


Figura 13. Patrón de descarga del EEG en el que se aprecian diferentes intervalos que se corresponden con las fases conductuales de las convulsiones audiogénicas del hámster GASH:Sal. (A) Principio del estímulo acústico; (B) fase de carrera salvaje; (C) opistótono; (D) convulsiones tónico-clónicas y transición hacia la extensión tónica de los miembros; (E) fase de estupor.

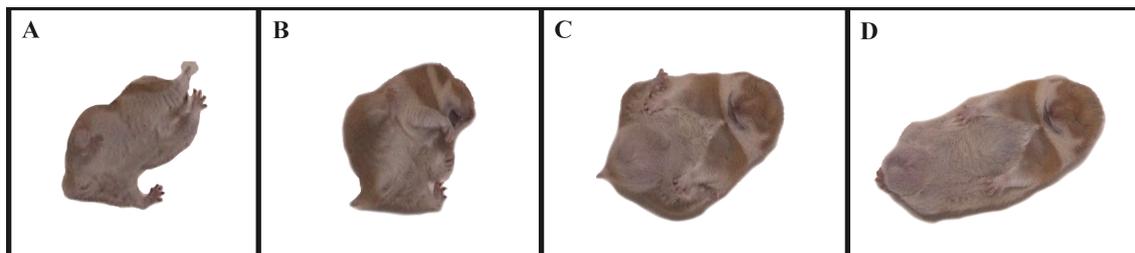


Figura 14. Comportamiento ictal durante una crisis audiogénica. (A) Opistótono; (B) convulsiones tónico-clónicas; (C) Inicio de fase tónica; (D) Final de fase tónica con hiperextensión de miembros anteriores y posteriores

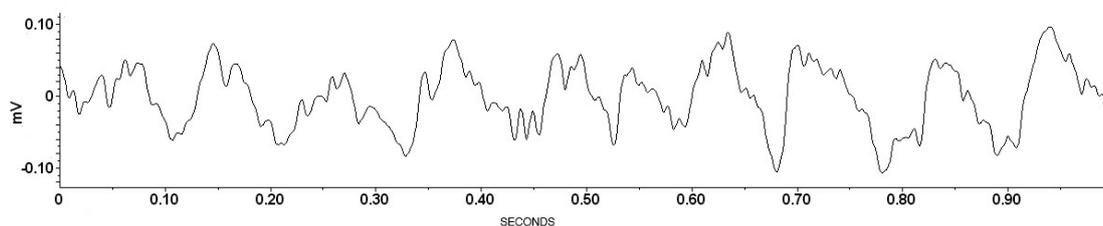


Figura 15. EEG constituido por complejos de punta-onda correspondiente a la fase de transición tónica superimpuesta con clonus

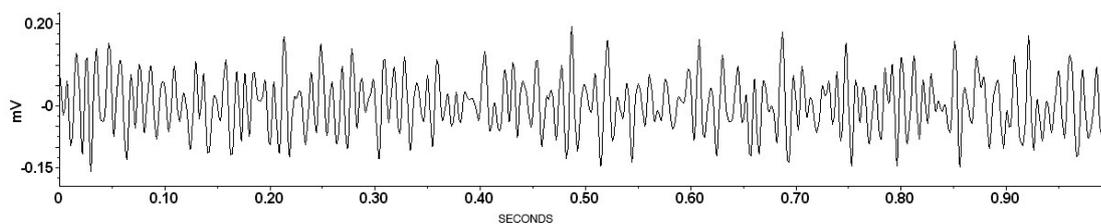


Figura 16. Patrones electroencefalográfico durante las contracciones tónico-clónicas del hámster GASH:Sal. Las ondas de alta frecuencia y gran amplitud coinciden con la actividad clónica creciente.

El análisis cuantitativo de las grabaciones de los EEG consistió en la transformada rápida de Fourier (FFT), calculada para intervalos de 2 s recogidos en cada una de las 5 etapas de la actividad epiléptica. El análisis de Fourier es

muy útil para el análisis de datos, ya que descompone una señal en sinusoides constituyentes de diferentes frecuencias. Simplemente, transforma datos de un “dominio de tiempo” a un “dominio de frecuencia”.

Los resultados eran consistentes entre los diferentes animales y en cada una de las diferentes fases de la crisis. Las figuras 17 y 18 muestran las medias de FFT para la fase de opistótono y tónico-clónica respectivamente. Durante el opistótono, se encontró la menor frecuencia de descarga, entre 2 Hz y 6 Hz (fig. 5). Por el contrario, la mayor frecuencia de descarga, entre 70 Hz y 130 Hz, se observa durante la fase tónico-clónica, en la que se aprecia un incremento en la amplitud cada vez mayor mientras el clonus aumenta (fig. 18). El espectro de energía de los datos de EEG tomados de los intervalos de 2s a partir de la fase del electrodecrement se asoció a opistotonus estimada por el método de FFT.

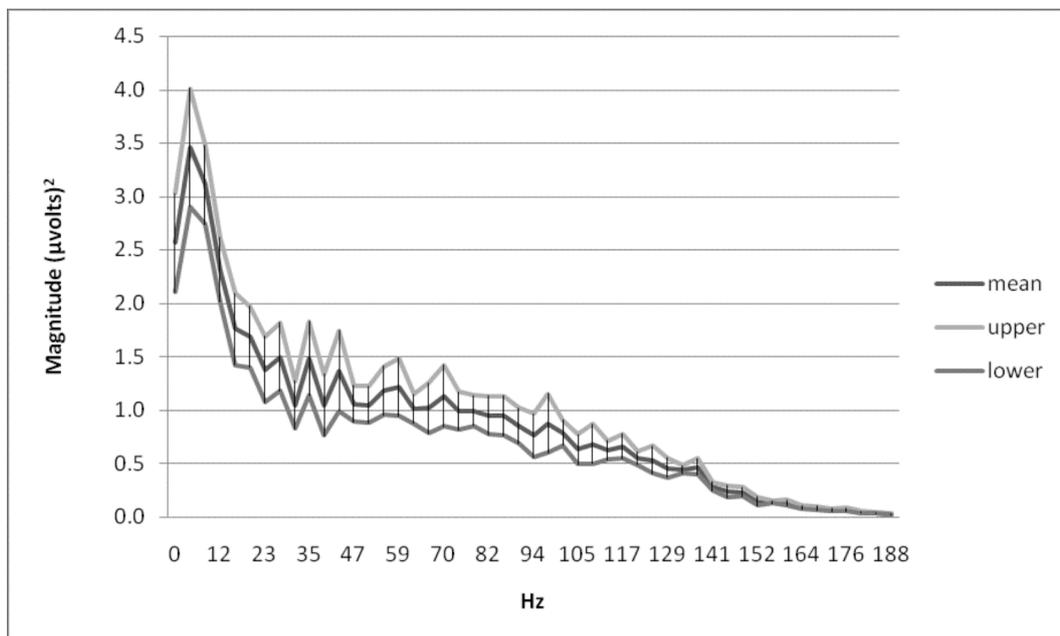


Figura 17. Análisis de la señal electroencefalográfica durante el opistótono.

Gráfica con la transformada de Fourier (FFT) de los datos electroencefalográficos del GASH durante el opistótono, en un intervalo de 2 s. Se muestra el espectro de frecuencia de los picos característicos en esa etapa. En ordenadas se muestra la amplitud de la señal en microvoltios, con los valores medios y el rango de desviación estándar; en abscisas se expresal la frecuencia de la señal (Hz).

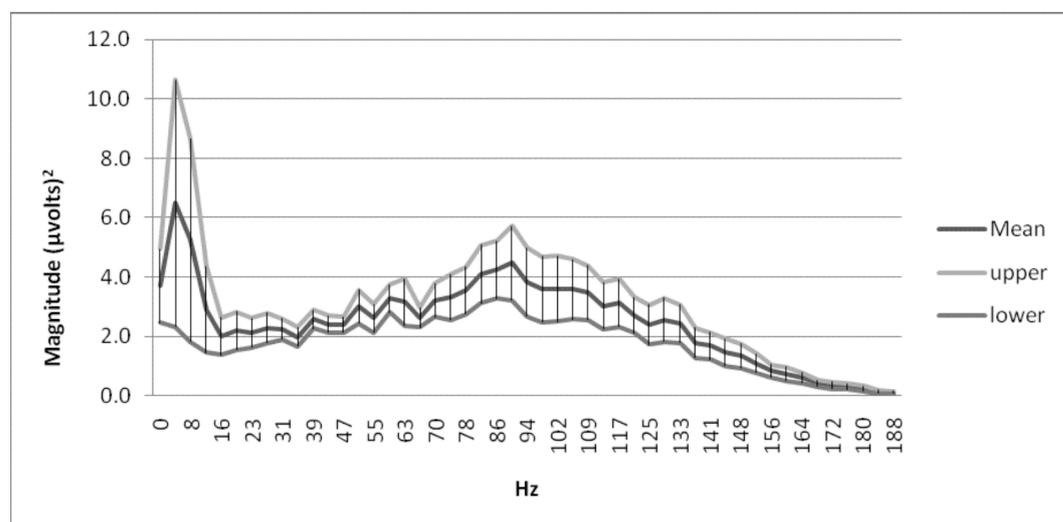


Figura 18. Análisis de la señal electroencefalográfica durante la fase tónico-clónica.

Gráfica con la transformada de Fourier (FFT) de los datos electroencefalográficos del GASH durante la fase tónico-clónica, en un intervalo de 2 s. Se muestra el espectro de frecuencia de los picos característicos en esa etapa. Se muestra el espectro de frecuencia de los picos característicos en esa etapa. En ordenadas se muestra la amplitud de la señal en microvoltios, con los valores medios y el rango de desviación estándar; en abscisas se expresal la frecuencia de la señal (Hz).

4. AFLP

Tras la acción de las enzimas de restricción combinadas EcoRI/MseI, se obtuvieron diferentes fragmentos de DNA de las dos poblaciones de hámster. Fueron seleccionados seis pares de cebadores (primers) para generar el patrón de bandas de AFLP para cada combinación y la tasa del polimorfismo se calculó en función del número de bandas polimórficas detectada. La comparación de los perfiles de AFLP a través de las 6 combinaciones de cebadores nos indica que los genomas de las dos poblaciones muestran diferencias. Un ejemplo de una comparación de los perfiles de las dos poblaciones para una de las combinaciones de cebadores empleadas (E32/M58) se muestra en figura 19.

Las combinaciones de cebadores nos dieron un total de 660 fragmentos, con un promedio de 110 loci por combinación para cada cebador, y un tamaño medio de fragmento de 185,97 pb. Como valor promedio, el 49,28% de las 660 bandas distinguibles era polimórfico a través de todas las combinaciones (Tabla 8).

Combinaciones de cebadores	# fragmentos (pb)	# fragmentos fijos	% de polimorfismos
E32/M48	113 (192.99)	40	45,13
E32/M58	73 (207.58)	9	65,07
E32/M60	105 (174.91)	33	45,24
E35/M48	157 (183.99)	46	43,31
E35/M58	82 (168.16)	23	46,95
E35/M60	130 (188.20)	34	50
Total/media	660/110 (185.97)		49,28

Tabla 8. Polimorfismos existentes entre la población de hámsters controles y GASH:Sal

Número de polimorfismos AFLP observados entre las poblaciones GASH:Sal y control por cada combinación de cebadores. Abreviaturas: (pb) pares de bases

La diversidad genética y la estructura genética de la población se estimaron en función del acercamiento de Lynch y de Milligan (1994). El grado

de heterocigosis total (HT) previsto fue calculado haciendo un promedio sobre todo loci de las dos poblaciones para cada combinación de cebadores, encontrándose en un rango de $0,3025 \pm 0,0122$ a $0,3727 \pm 0,0286$, con una media de 0,3381. De las seis combinaciones de cebadores, la diversidad genética más baja (H_w) la presentó la combinación E32/M48, y la más alta la de E35/M60. En este estudio, el valor medio del índice de fijación de Wright (FST), (otro indicador que mide la variabilidad genética en las diferentes subpoblaciones), a través de todos loci fue de 0,0839, indicando que aproximadamente un 8,4% de la variación genética total se podría explicar por diferencias entre cepas, mientras que los 91.6% restantes se pueden explicar por diferencias entre individuos. La estimación más baja de FST (0,0177) era de E32/M58, y significa poca diferenciación genética dentro de las poblaciones. E35/M48 presentó el valor más alto en 0,1329, indicando una diferencia genética moderada dentro de las poblaciones analizadas. Los parámetros empleados para evaluar la diversidad genética, incluyendo la *heterocigosis media esperada* (HT), la *diversidad génica intra-poblacional* (H_w), la *diversidad génica entre de las poblaciones* (HB), y el *índice de fijación de Wright* (FST) se demuestran en la tabla 9.

Combinaciones de cebadores	Ht (SE)	Hw (SE)	HB (SE)	FST
E32/M48	0,3191	0,2878	0,031	0,0929
E32/M58	0,314	0,3082	0,0059	0,0177
E32/M60	0,3724	0,3245	0,0479	0,1279
E35/M48	0,3478	0,2989	0,0489	0,1326
E35/M58	0,3025	0,2914	0,0111	0,0366
E35/M60	0,3727	0,3413	0,0313	0,0839
Media	0,3381	0,3087	0,0294	0,0819

Tabla 9. Valores medios de los índices de la variabilidad genética entre la población de hámsters controles y GASH:Sal

Abreviaturas: heterocigosis media esperada (HT), la diversidad génica intra-poblacional (H_w), la diversidad génica entre de las poblaciones (HB), y el índice de fijación de Wright (FST)

El análisis de AMOVA demostró que el componente principal aproximado de la variación (el 83%) es atribuido a variaciones dentro de la población. En términos de variabilidad inter-población, la variabilidad total hizo un promedio del 17% entre las 6 combinaciones de primers. Los valores de PhiPT (tabla 10), que representan la diferenciación genética entre los pares de poblaciones, se encuentran en un rango entre 0,064 a 0,239, siendo las diferencias significativas ($p < 0,079$ y 0,00 respectivamente).

Combinaciones de cebadores	d.f.	suma de cuadrados	media de cuadrados	estimación de la varianza	% var, intra-pob.	% var, inter-pob.	PhiPT	p
E32/M48	14	148,4	32,297	11,473	84%	16%	0,157	0,001
E32/M58	13	126,714	23,207	10,05	94%	6%	0,064	0,079
E32/M60	9	114,3	35,05	14,276	79%	21%	0,0207	0,017
E35/M48	11	179,417	51,617	18,18	78%	22%	0,219	0,002
E35/M58	10	91,818	23,966	9,765	87%	13%	0,131	0,030
E35/M60	13	202,429	55,533	17,558	76%	24%	0,239	0,000
Overall		total			83%	17%	0,1695	

Tabla 10. Resultado del Análisis de la varianza molecular (AMOVA) sobre variaciones genéticas dentro y entre las poblaciones de hámster control y GASH:Sal

Se muestran los análisis estadísticos sobre la diversidad de AFLP entre los grupos mencionados, que reflejan el porcentaje de de variación intra o inter poblaciones. Abreviaturas:d.f.-grados de libertad; PhiPT- proporción de varianza entre la población relativa a la varianza total; p- probabilidad

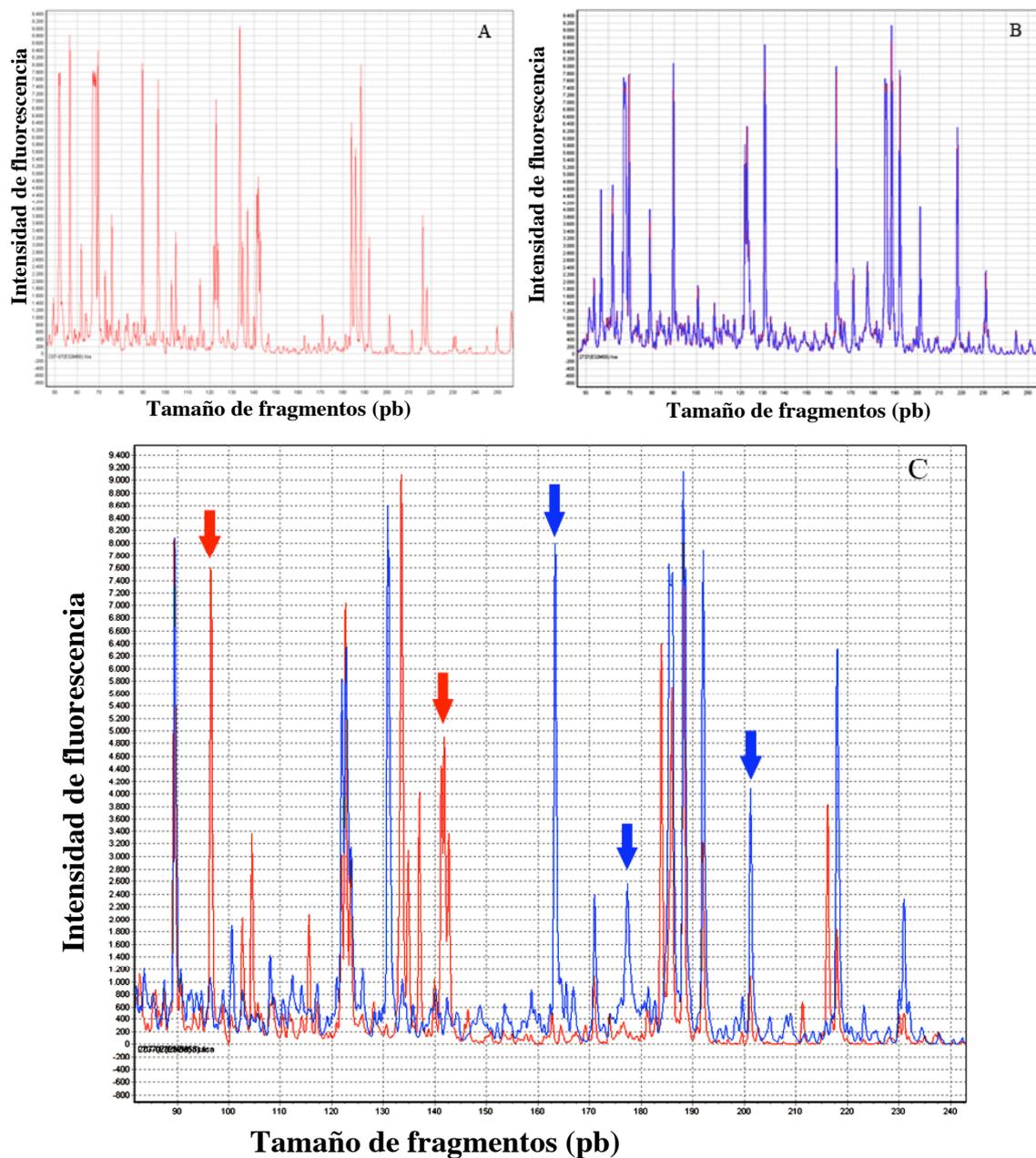


Figura 19. Picos deAFLP generados usando la combinación de cebadores E32/M58.

(A) hámster controles. (B) GASH:Sal. (C) combinación de animales controles y GASH:Sal para distinguir picos exclusivos de cada población. Color rojo: hámsters controles; color azul: GASH:Sal. En ordenadas, intensidad de fluorescencia; abscisas: tamaño de fragmentos, en pares de bases.

Para entender las relaciones genéticas entre las dos poblaciones de hámster, usando marcadores de AFLP, construimos árboles filogenéticos (dendrogramas), por el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining, o N-J), basado en encontrar vecinos secuencialmente que minimicen la longitud total del árbol. Para la construcción de los dendrogramas, empleamos los valores genéticos de la distancia de Nei (1978). Este parámetro nos permite ver el grado de homocigosidad entre dos poblaciones, para ver su proximidad filogenética. El dendrograma resultante, muestra la semejanza genética entre las muestras individuales obtenidas a partir de los AFLP resultantes de la combinación de enzimas E35/M48. Se puede apreciar cómo todos los individuos del grupo control de *Mesocricetus auratus* se agrupan en un racimo. También, se aprecia un segundo racimo, que representa exclusivamente a las muestras de GASH:Sal.

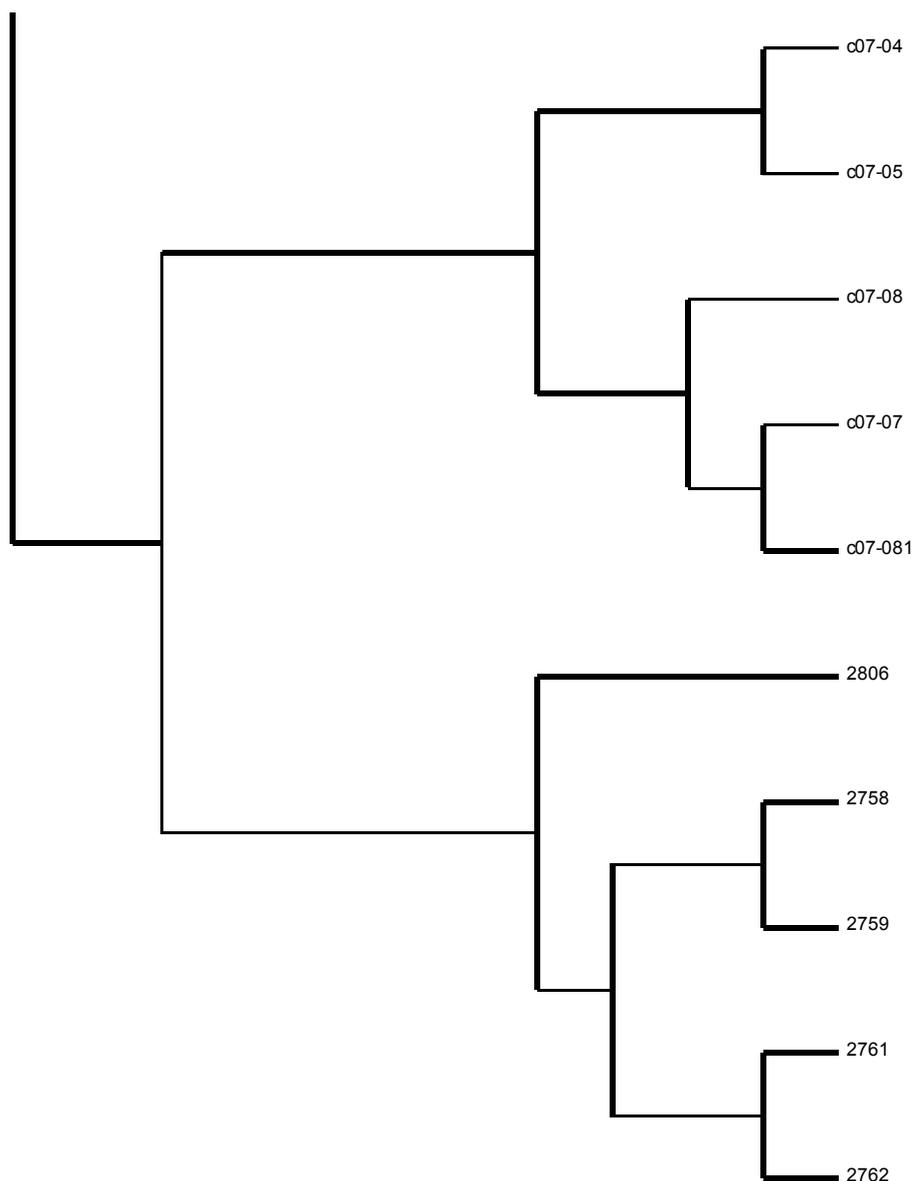


Figura 20. Dendrograma que muestra agrupación de 12 individuos a partir de dos poblaciones de *Mesocricetus auratus*. Los AFLP se obtuvieron con la combinación E35/M48 y el dendrograma se basó en la distancia genética de Nei, con 1.000 permutaciones aleatorias

4. Detección inmunohistoquímica de la proteína Fos

Las secciones de hámsters procesadas para visualizar la proteína Fos, se ordenaron utilizando el patrón de cortes ordenados e histoquímicamente teñidos para visualizar acetil- colinesterasa de Fuentes-Santamaría (2001) (ver anexo 2) y el Atlas estereotáxico de Morin y Wood (2001) para hámsters.

El marcado de la proteína Fos tras la estimulación auditiva por técnicas inmunohistoquímicas, muestra una fuerte presencia de la misma en el núcleo neuronal (figura 21), que distingue perfectamente las neuronas que expresan el gen c-fos de las que no se expresan.

El colículo inferior del GASH:Sal, tras el desencadenamiento de las crisis, presenta una fuerte inmunorreactividad para la proteína Fos en todas sus subunidades., siendo mayor en la corteza dorsal (CDCI) y en la corteza externa (CECI). El núcleo central del CI (NCCI) y en la comisura interculicular, se aprecia también una fuerte inmunorreactividad, aunque lieramente menor que las regiones anteriores.

También se observó un afuerte inmunotinción en la región de la sustancia gris periacueductal (SGP). En las figuras 22 y 23 apreciamos las diferencias cuanlitativas de inmunotinción entre los dos grupos experimentales, en función de la distribución topográfica del marcaje. Los esquemas de los cortes inmunoteñidos y organizados caudorostralmente se ilustran en el anexo 4 (control) y 5 (GASH:Sal).

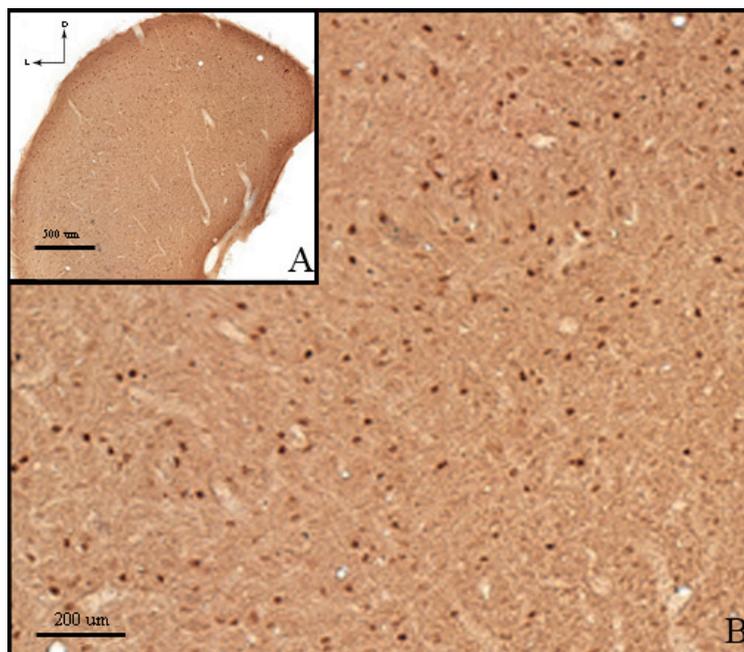


Figura 21. Immunotinción con anticuerpo biotinado c-fos sc-52 en secciones de hámster GASH:Sal. A. Sección coronal del colículo inferior, B. Detalle a mayor aumento para visualizar con detalle las neuronas inmunotenidas.

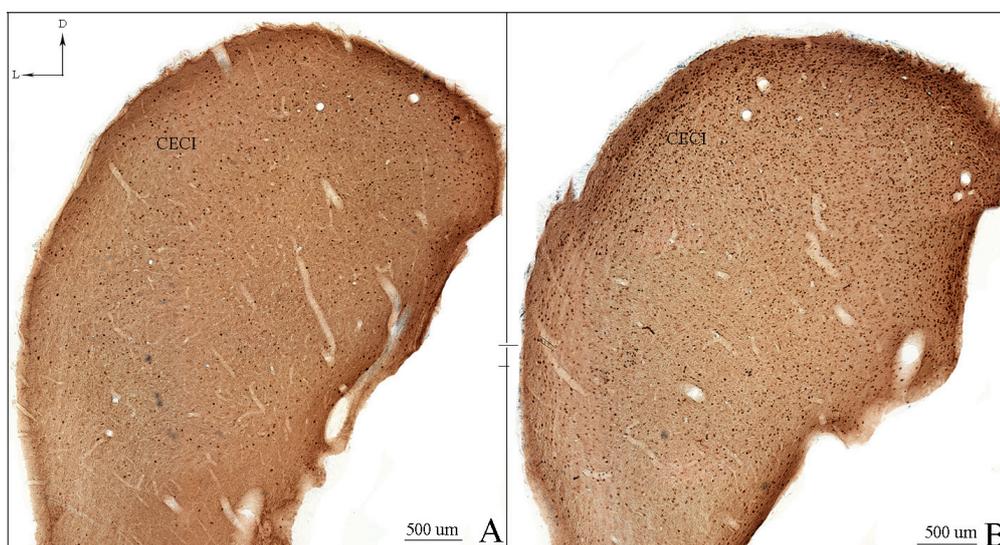


Figura 22. Detalle del CI en cortes coronales obtenidos tras estimulación acústica intensa. Se observa una menor densidad en la expresión de la proteína Fos en el control (A) que en el GASH:Sal (B). Abreviaturas: CECI, corteza externa del colículo inferior; 4v, cuarto ventrículo; D, dorsal; L, lateral. Barra de calibración 500µm. Nivel Bregma: -6,0

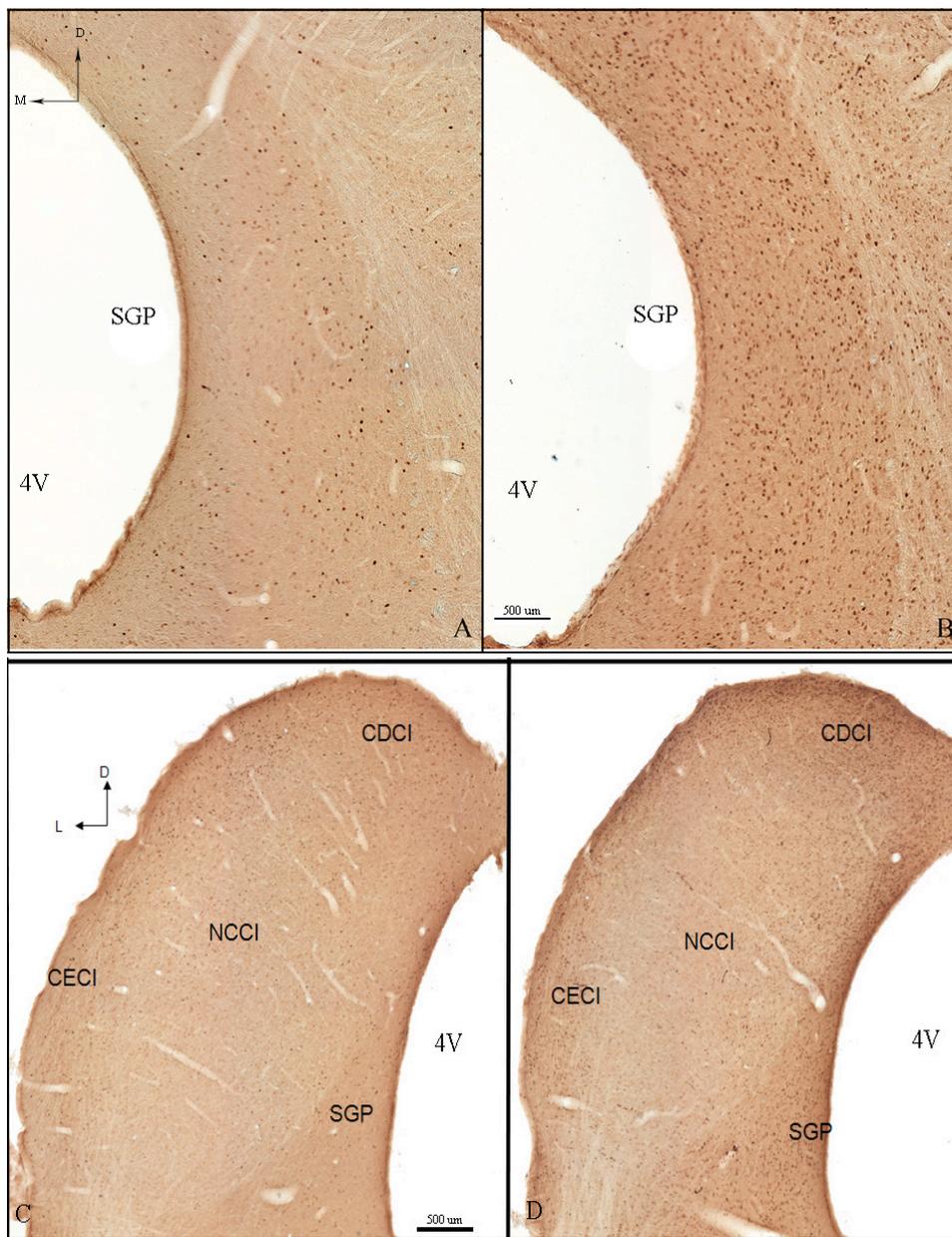


Figura 23. Detalle de secciones inmuoteñidas para visualizar la proteína Fos en cortes coronales de hámster obtenidos tras estimulación acústica intensa.

Se observa una menor densidad de expresión de la proteína Fos en el control (A, C) que en el GASH:Sal (B,D). Abreviaturas: CDCI, corteza externa del CI; CECI, corteza externa del CI; NCCI, núcleo central del CI; SGP, sustancia gris periacueductal; 4v, cuarto ventrículo; D, dorsal; L, lateral; M, medial. Nivel bregma: -5,4 (Ay B); -5,7 (Cy D)

Para asociar un valor objetivo a la intensidad de la inmunotinción, medimos la densidad óptica de secciones de los colículos inferiores inmunotinizadas para el reconocimiento de la proteína Fos. Los resultados obtenidos los normalizamos para intentar minimizar los errores en relación al pedúnculo cerebelar medio, zona que presenta una inmunotinción negativa. Los datos empleados para el análisis son, por tanto, los datos tipificados de la densidad óptica integrada. Estos datos nos indican que el CI presenta una mayor inmunotinción para la proteína Fos que los controles, especialmente en las zonas más caudales, ocupada fundamentalmente por la corteza externa. Sucede lo mismo y en mayor grado con la sustancia gris periacueductal (anexo VII).

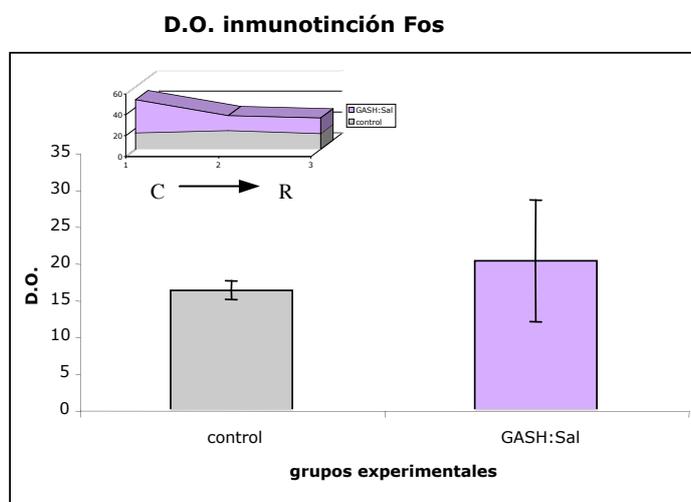


Figura 24. Valores medios de la densidad densidad óptica integrada

Las mediciones corresponden a secciones de colículo inferior (CI) a lo largo de su extensión caudo (C) rostral (R). Objetivamente, los hámsters GASH:Sal presentan una mayor inmunotinción para esta proteína tras sufrir un estímulo acústico intenso. El inset representa los valores medios de densidad de inmunotinción a través del eje caudo-rostral.

5. Análisis de las tomografías por emisión de positrones

Se realizaron estudios de PET con ^{18}F -FDG en condiciones basales y tras someter a los animales a una estimulación auditiva intensa. Los resultados de incorporación de radioactividad se analizaron estadísticamente para ver el efecto de la estimulación sobre la actividad del animal y el efecto de la posible diferencia entre las líneas de hámster usadas.

Las comparaciones múltiples por pares efectuadas (métodos de comparación de muestras independientes t de Student, Newman, y Keuls) indican que las imágenes metabólicas no muestran diferencias en el animal control entre el estado basal y tras la estimulación, ni entre el control y el GASH:Sal en estado basal. Donde sí se aprecian diferencias es en la captación metabólica de glucosa en el hámster GASH:Sal, entre el estado basal y tras la activación auditiva intensa ($p = 0,034$).

Cuando estimulados con un sonido intenso a los animales controles y a los GASH, sólo en los últimos se producen las crisis epileptogénicas, que se verán reflejadas en la incorporación de glucosa radioactiva inyectada veinte minutos de la estimulación acústica. La observación visual de las imágenes nos indica que, aparentemente, la zona alrededor del cuarto ventrículo, colículo inferior, capta más glucosa que en el control, como se aprecia en la figura 24.

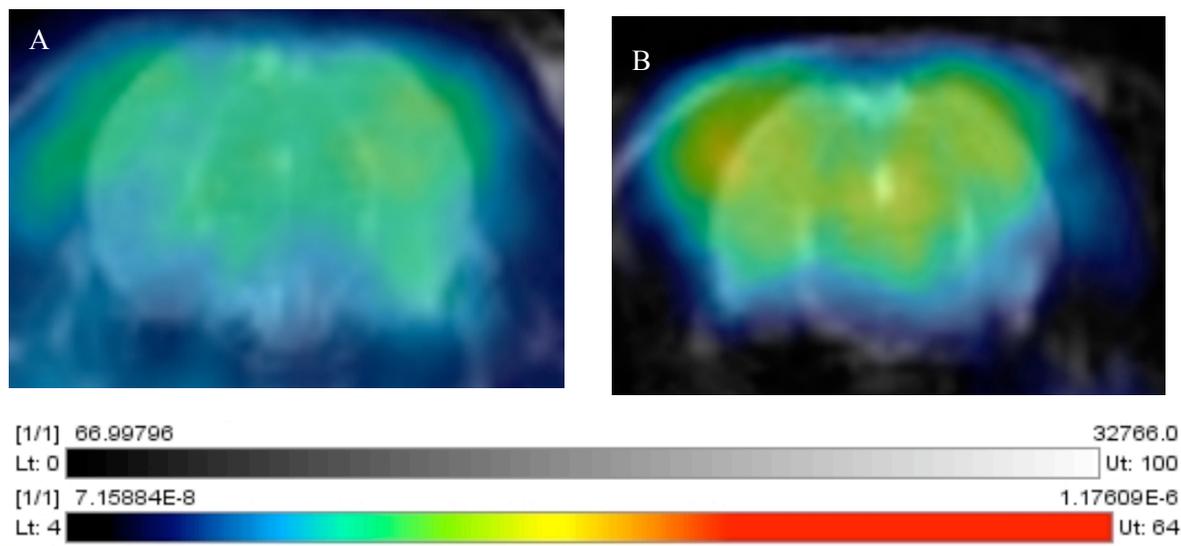


Figura 24. Imágenes Micro-PET con ^{18}F -FDG de los cortes coronales de la zona de interés en un hámster Control (A) vs GASH:Sal (B).

Se aprecia una mayor captación del radiotrazador en las áreas cerebrales correspondientes a los colículos inferiores de los hámsters GASH:Sal en comparación con los hámsteres controles.

Al cuantificar los datos obtenidos en función de la dosis de radiotrazador inyectada, la gráfica que obtenemos indica, sin embargo, que hay una menor de captación de glucosa en el CI del GASH:Sal durante la crisis.

Al normalizar los valores de cuentas en relación a una estructura de referencia, en este caso el cerebelo, obtenemos unos valores relativos de captación de glucosa en el CI, que nos indica también que esta estructura resulta metabóicamente menos activa durante las crisis.

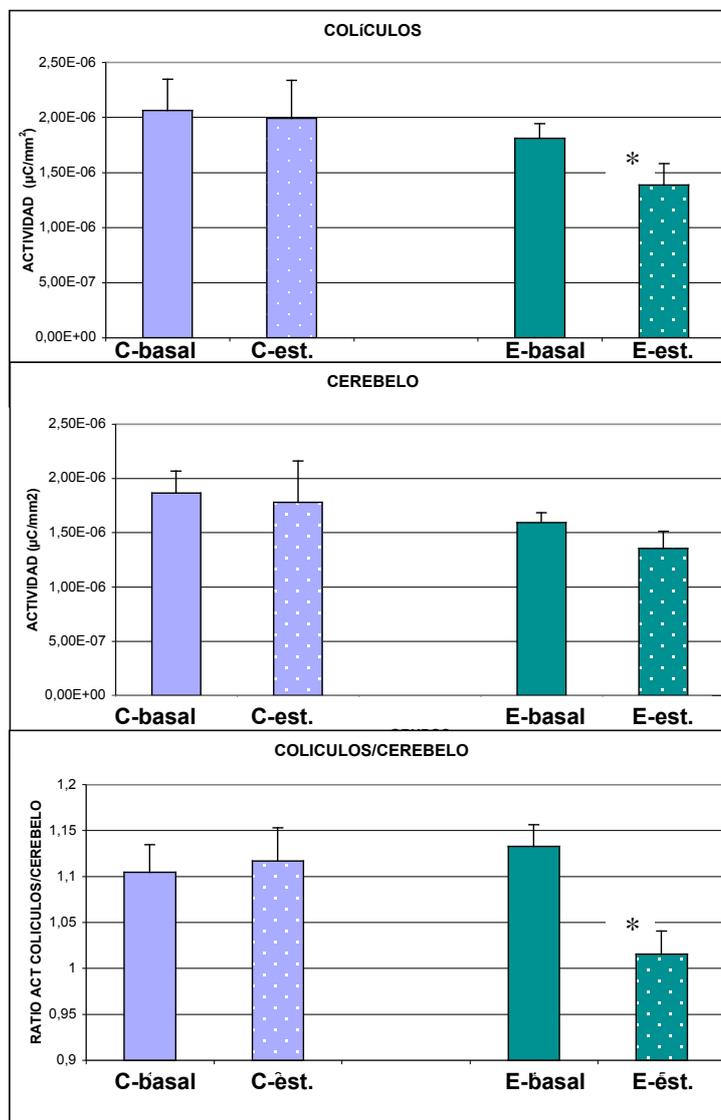


Figura 25. Cuantificación de la imagen metabólica.

Actividad de los tejidos en $\mu\text{curios}/\text{mm}^2$. La cuantificación de la glucosa radioactiva indica una menor actividad metabólica en el colículo de los GASH, tanto de forma absoluta como en relación al cerebelo como estructura de referencia. Abreviaturas: C- control; E- epiléptico (GASH:Sal). Est- animal estimulado acústicamente.

V. DISCUSIÓN

La inspección visual de los datos de EEG sincronizados con la grabación de vídeo permitió la detección de patrones característicos de la progresión de la crisis, que corresponden con las fases conductuales de las convulsiones audiogénicas del hámster GASH:Sal. El patrón cortical de los EEG durante las crisis convulsiva coinciden con el observado en otros modelos de epilepsia, pero a diferencia de éstos, el origen de las crisis es troncoencefálico, no cortical.

Hemos encontrado que los GASH:Sal presentan una función auditiva deficiente, con umbrales auditivos muy elevados. Esta situación parece empeorar con el edad. Los análisis genéticos, por otra parte, muestran diferencias significativas entre los GASH:Sal y los controles.

Capacidad auditiva de los GASH:Sal

ABR (Auditory Brainstem Response) es una técnica neurofisiológica que permite la obtención de datos de forma rápida, reproducible, cuantitativa y no invasiva, salvaguardando la vida del animal explorado y que proporciona información sobre la funcionalidad de las estructuras nerviosas periféricas y centrales que conforman la vía auditiva (Huang,1980). Esta técnica se basa en la estimulación auditiva con sonidos de características conocidas (frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación, etc) y posterior registro de la actividad eléctrica generada por las neuronas de la vía auditiva mediante electrodos colocados en posiciones estándar. La discriminación de la actividad eléctrica auditiva frente a otra actividad eléctrica (cerebral, muscular, equipos) se consigue mediante la estimulación repetida y la promediación de la respuesta sincronizada al estímulo.

Aunque no contamos con valores de referencia para esta especie, los umbrales de 40 dB SPL encontrados los hamsters controles son similares a los que hemos encontrado en otros roedores de laboratorio, rata (Borg,1982; Cooper y cols., 1990) y ratón (Li y Borg, 1991; Sha y cols., 2008;) de la misma edad. Por lo tanto, pueden considerarse dentro del rango de normalidad.

Las diferencias de latencia encontradas entre individuos controles de 3 y 9 meses de edad, con mejores valores para los individuos de 9 meses, podrían deberse a que tienen orígenes distintos, ya que los de 3 meses se originaron a partir de individuos existents en el animalario de la usal y los de 9 se adquirieron comercialmente.

Los ABR se puede utilizar para estudiar las variaciones auditivas durante el de desarrollo y en diversas patologías (Huang,1980). Nuestros resultados en los GASH:Sal demuestran que hay conductividad del sonido a través de la vía auditiva, pero que existe un déficit auditivo importante. Esta característica es común en muchos roedores que exhiben crisis audiogénicas (Henry y Saleh, 1973; Penny y cols., 1983). Éstos, suelen presentar una reducción en sus latencias de respuesta observadas en los ABR, incluso a 8 kHz de estimulación, que la frecuencia óptima de audición para la rata y para la mayor parte de los roedores (Coleman y cols., 1994). En ratones propensos a crisis convulsivas audiógenas, se ha encontrado una excitabilidad auditiva aumentada, observada por una mayor amplitud de respuesta de los potenciales evocados en el núcleo coclear y en el colículo inferior a intensidades por encima de su umbral auditivo (Saunders y cols., 1972).

Se ha visto en ratas Long-Evans que las reducciones en la capacidad auditiva frente a estímulos supra-umbral, tanto a nivel periférico como central, preceden niveles de intensidades necesarios para la generación de crisis (Ross y Coleman, 1999); esto sugiere una alteración sináptica que induce una reducción en la capacidad auditiva, imprescindible para la génesis de la actividad epileptica a altas intensidades de estímulo. En cepas de rata genéticamente propensas a epilepsia (GEPR), la susceptibilidad a las CCA se asocia a los umbrales elevados de ABR y al aumento en la latencia de las ondas (Faingold y cols., 1990).

Nuestros datos revelaron una excitabilidad alterada en la periferia de la vía auditiva. La sobreestimulación de la cóclea se puede asociar a patología estructural incluyendo daño a las células ciliadas (Clark y Pickles, 1996). En un estudio histológico de la cepa GEPR, se observó una degeneración severa de las células ciliadas, especialmente de las ciliadas externas de la espira basal (Darrouzet y cols., 1967; Penny y cols., 1983). En los GPG/Vall, también existía una pérdida de células ciliadas externas (Fuentes-Santamaria y cols., 2005), de lo que se infiere que los modelos genéticamente propensos a crisis demuestran una degeneración programada de la cóclea.

Cambios en las latencias entre los picos del ABR sugiere la presencia de modificaciones adicionales en la vía auditiva de animales susceptibles a padecer CCA, particularmente entre ondas IV-V que pueden involucrar al colículo inferior (Funai y Funasaka, 1980). En ratas sensibles a CCA, las bandas tonotópicas del CI se ensanchan (Faingold et al., 1986; Pierson y Snyder-Keller; 1994), lo que sugiere una hiperexcitabilidad de las vías aferentes y/o intrínsecas del CI, además de un cambio en la organización funcional de la vía auditiva central (Pierson and

Snyder-Keller; 1994). La excitabilidad aumentada a nivel del CI puede explicarse por modificaciones en la cantidad de neuronas GABAérgicas y/o en las características de sus receptores (Roberts et al., 1985; Ribak and Morin, 1995), por lo que la inhibición resultante sería menor. Hay varios trabajos que establecen la relación entre una deficiencia en la neurotransmisión GABAérgica y la susceptibilidad a presentar crisis audiógenas (Faingold y cols. 1986, 2002; Roberts y Ribak, 1986); en la misma línea, está descrita una disminución significativa en neuronas GABAérgicas en el hámster GPG/Val (Soria Milla y cols., 1987; Fuentes-Santamaría y cols., 2008).

Un aumento en la excitación puede deberse también a la presencia de modificaciones en sinapsis glutamatérgicas en el CI, como la sobre-expresión de receptores glutamatérgicos en este núcleo (Marianoski y cols., 1995) o a un incremento en la liberación de neurotransmisores excitatorios (Ribak y cols., 1988).

La correlación entre un déficit auditivo y la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas parece ser una constante en los animales que presentan crisis convulsivas audiógenas; se ha detectado pollos con crisis audiógenas (pollos blancos Leghorn), quienes presentan ABRs alterados, con los picos tempranos normales y un aumento en la latencia y una disminución en la amplitud en los componentes tardíos (Beck y cols., 1987); el ratón mutante Frings *Mgr1* (que presenta una mutación en el gen *Mass1*) también muestra un deterioro en la audición de suave a moderado (Klein y cols. 2005), que aparece durante el desarrollo postnatal temprano y se continúa hasta edades avanzadas; gatos con epilepsia inducida por penicilina presentn un incremento en todos los componentes del ABR (Burchiel y cols., 1976); finalmente, en humanos, algunos

tipos de epilepsia (epilepsia de la ausencia) concurren con decrementos en los componentes posteriores del ABR (Mirsky, 1988).

Electroencefalogramas de los GASH durante las crisis epilépticas

La biotelemedría es una herramienta útil para medir una gran variedad de parámetros comportamentales y fisiológicos (EEG, ECG, EMG, presión arterial, temperatura de base del cuerpo, actividad, etc.) en animales libres y conscientes. Ha demostrado ser eficaz en la caracterización de los varios modelos animales de enfermedades específicas humanas, tales como epilepsias (Guler y Ubeyli, 2002; Jeutter, 1982). Antes de la aparición de esta técnica, había una gran variedad de métodos que recogían datos fisiológicos en animales de experimentación con diferentes grados de inmovilización o con radiotransmisores no implantados (Nakano y cols., 1994). En la actualidad, hay disponibles en el mercado una gran variedad de sistemas de radiotelemedría para realizar este tipo de registros.

Los registros de datos obtenidos por telemedría en animales conscientes son muy superiores a los obtenidos en animales anestesiados, ya que representan el estado normal y los resultados son más extrapolables a los que se obtendrían en seres humanos (Kramer y Kinter, 2003). También, los métodos de inmovilización del animal inducen artefactos de tensión e influyen seriamente sobre los parámetros fisiológicos básicos. Un método de inmovilización clásico en la grabación de EEG es el la inmovilización del animal, conectando los electrodos con un enchufe en miniatura anclado al cráneo y expuesto para poder acceder con el cable de registro (Bertram y cols., 1997).

En nuestro estudio, utilizando métodos radiotelemétricos, hemos caracterizado los registros electroencefalográficos corticales del hámster GASH:Sal, que presentan crisis audiógenas. La sincronización de los datos de vídeo con las grabaciones fisiológicas permitió la clasificación de las crisis, dato esencial para la distinción entre crisis epilépticas y otros episodios paroxísticos no epilépticos (Spehlmann, 1981). Nos ha permitido también, la confirmación de las diversas etapas que constituyen las crisis.

En nuestro trabajo, hemos intentado conseguir un registro de la crisis del hámster GASH:Sal con un foco particular en las descargas electrográficas dominantes y su comportamiento correlativo (fig. 4). En la actual investigación, confirmamos que los hámsters GASH:Sal, que experimentan crisis audiógenas, exhiben patrones EEGs corticales y comportamiento convulsivo que coincide con el presentado por otros modelos animales de epilepsia generalizada ya consolidados.

El patrón ictal-epileptiforme de EEG de los hámsters GASH:Sal se asemeja a la epilepsia generalizada humana (Jobe y cols., 1995, 1998). Los patrones típicos de EEG de crisis Grand Mal en humanos abarcan los complejos multionda iniciales, que se corresponden a las convulsiones mioclónicas, seguidas por una atenuación generalizada de la actividad eléctrica en respuesta a la tonicidad del músculo, que lleva a una serie de picos de gran amplitud y complejos de onda lenta del tonus y de las contracciones clónicas, y terminan en una relajación muscular y una somnolencia postictal, caracterizadas por una baja amplitud y un aplanamiento del de EEG. Los complejos de punta-onda de 4-6 hertzios son peculiares de las descargas epileptiformes generalizadas y se

distinguen tanto por su duración como la ocurrencia sucesiva de un pico seguido de una onda lenta.

En el EEG del GASH:Sal, se aprecian patrones secuenciales distintos durante la crisis, que se corresponden con las fases conductuales de las convulsiones audiogénicas del hámster, y son correlativos a la grabación en vídeo de su comportamiento paroxístico.

Los métodos típicos de procesamiento de los EEG se basan en la transformada rápida de Fourier; este abordaje se basa en observaciones que un espectro de EEG contiene las formas de onda características que pertenecen a cuatro tipos de bandas de frecuencia. De las cuatro, las bandas clínicamente significativas están entre 0,1 a 100 Htz, que se pueden subdividirse o clasificar más a fondo en el **delta** (0,5 ~ 4 hertzios), la **theta** (~ 4- 8 hertzios), la **alfa** (~ 8 -13 hertzios), **beta** (13 ~30 hertzios) y **gamma** (~ 30- 60 hertzios).

Los desórdenes epilépticos exhiben frecuencias específicas y, previo a la fase de descenso eléctrico inicial, presentan excesivas ondas de theta, y en la fase de clonus y de rigidez tónica, presentan picos pertenecientes a las ondas theta y gamma (Bosnyakova y cols., 2007; Noebels y cols., 1989).

Los patrones del comportamiento y electrográficos presentados en nuestro trabajo son similares a los de crisis que se presentan en la rata epiléptica Noda (NER) (Noda y cols., 1998; Iida y cols., 1998) y en la rata GEPR-9 (Moraes y cols., 2005). Ambos modelos muestran la secuencia típica comportamental en las crisis: salto o carrera salvaje, opistótono y convulsiones tónico-clónicas. Electroencefalográficamente, los modelos exhiben patrones similares.

Los modelos animales de la epilepsia son críticos en muchas facetas de la investigación de la epilepsia, incluyendo la evaluación terapéutica de drogas antiepilépticas y de la identificación de las bases genéticas de la epilepsia. Nuestros resultados proporcionan considerable evidencia electrográfica que permite que clasifiquemos los aspectos clínicos de las convulsiones sufridas por el hámster GASH:Sal siguiendo un insulto audiogenico como crisis epilépticas verdaderas comparables a éstas vistas en los modelos animales de crisis tónico-clónicas generalizadas. Por lo tanto, este modelo genético definido puede servir como modelo útil para promover más lejos el estudio de epilepsias humanas.

La similitud prominente entre el patrón EEG del GASH:Sal y el exhibido por otros modelos animales de epilepsia generalizada (Jobe y cols., 1996) y el observado en las crisis tónico-clónicas generalizadas de nuestra especie, podría potencialmente permitir el empleo de este animal como modelo de epilepsia, estudiando sus mecanismos íntimos y llegar así a una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes responsables de la epilepsia humana.

Variabilidad genética de los GASH

Al no existir la descripción del genoma del hámster, hemos de buscar la manera de localizar las diferencias entre el DNA de los hámsters controles y los GASHA:Sal. El análisis de AFLP es un primer paso para evaluar la diversidad genética entre las dos poblaciones de hámsters.

La especie *Mesocricetus auratus*, también conocido como hámster sirio dorado, originado en el norte de Siria, es un animal de experimento fuertemente

consolidado. En 1930, un científico del israelí recogió una camada de hámsters, y de sólo una pareja de hermanos, se obtuvo una población cautiva del hámster. Hoy, casi todas las poblaciones de laboratorio de hámsters sirios dorados son descendientes de ese único apareamiento del hermano/ hermana.

Los hámsters sirios se utilizan considerablemente en la investigación biomédica, incluyendo la inducción experimental de tumores, las enfermedades infecciosas, así como investigaciones patológicas. A pesar de su popularidad, se han divulgado pocos estudios que identifiquen características genéticas de estos animales (McGuire y cols., 1985; Watkins y cols. 1990; Yigit y cols., 2007). Los estudios publicados, demuestran que los niveles de diferenciación genética de los hámsters sirios dorados salvajes y del laboratorio son escasos, confirmando que todos los miembros supervivientes de la especie *Mesocricetus auratus* derivan de un número limitado de progenitores (McGuire y cols., 1985). Recientemente, el análisis de los loci de microsatélites, usado para establecer un análisis del acoplamiento y el rastro de patrones de la herencia, entre las poblaciones de hámsters dorados de oro salvajes y del laboratorio, presenta una reducción en la variabilidad genética de la población del laboratorio (Neumann y cols., 2005). Tal reducción se puede atribuir a la violación del principio Hardy-Weinberg en las poblaciones del laboratorio, así como el efecto de endogamias, ambos dan lugar a una homocigosis creciente de la población.

Debido a la baja variabilidad genética esperada dentro de las poblaciones animales de laboratorio, es necesaria una técnica conveniente de genotipado para determinar los niveles de variación genotípica.

El análisis de AFLP puede detectar el tipo de mutaciones (e.g., mutaciones puntuales inserciones, deleciones..etc) que sean responsables de variaciones de la secuencia génica. En el presente, AFLP es un método eficiente para la caracterización del ADN de plantas, hongos y de bacterias (Bensch y cols., 2005).

Esta técnica, descrita por Vos y cols. (1995), se puede aplicar al ADN de cualquier complejidad, empleándose también con éxito para deducir niveles de variación genética en animales (Arjmone-Marsan y cols., 1997; Ovilo y cols., 2000; Kim y cols., 2001, Razzoli y cols., 2003). La característica dominante de AFLP es su capacidad para investigar simultáneamente diversas regiones de la ADN distribuidas aleatoriamente a través del genoma. Para alcanzar la alta confiabilidad del muestreo, el ADN genómico se prepara en una técnica ingeniosa pero directa, que combina las fuerzas de dos métodos, la replicación del análisis de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción y la energía de la polimerización en cadena (Vos y Kulper, 1997; Vos y cols., 1995). Los marcadores de AFLP se han demostrado útiles para determinar diferencias genéticas entre los individuos, poblaciones y linajes independientemente desarrollando, tales como especie.

Debido a la carencia de la información genética de la especie de *Mesocricetus auratus*, AFLP tiene varias ventajas sobre otras técnicas de huella genómica, ya que realiza múltiples comparaciones de regiones de la ADN distribuidas dentro de un genoma entero sin la necesidad de cualquier conocimiento anterior de la secuencia (Mueller y Wolfenbarger, 1999). Por ello, hemos empleado esta técnica para determinar la variación genética entre el hámster dorado control (*Mesocricetus auratus*) y el de la línea GASH:Sal.

Estructuras cerebrales implicadas en las crisis epilépticas

Las técnicas de Neuroimagen, incluyendo la Imagen por Resonancia Magnética (MRI) y Tomografía por Emisión de Positrones, especialmente cuando se emplea 18-Flúor-Desoxi-Glucosa, se han utilizado con éxito para identificar las regiones del cerebro responsables de la generación de crisis (Diehl y cols., 2003; Lamusuo y cols., 2001). La evidencia reciente relaciona la disfunción eléctrica característica de epilepsia de lóbulo temporal (TLE) al metabolismo de la glucosa (Atlay y cols., 2005; Joo y cols., 2005; Vielhaber y cols., 2003). Es conocido ampliamente que la neurotransmisión y el metabolismo están íntimamente ligados (Schousboe y cols., 1992).

Se ha utilizado el PET para estudiar neuroplasticidad y la recuperación funcional en pacientes con lesiones cerebrales producidas por cirugía, golpes, heridas en la cabeza y malformaciones arteriovenosaa (Chugani y Jacobs, 1994; Iglesias y cols., 1996). En eso casos, frecuentemente se empleaba FDG como marcador de la actividad metabólica, de una forma análogo al uso de ^{14}CDG en animales. PET también se ha utilizado para demostrar el patrón de la activación neuronal en seres humanos durante crisis convulsivas (Kuhl y cols., 1980; Chugani y cols., 1994). El uso del PET en modelos animales de enfermedades neuronales del sistema nervioso, permitiría observaciones y una gran variedad de paradigmas experimentales *in vivo*. El uso de roedores como modelos animales ha demostrado ser crítico para la comprensión de respuestas anatómicas, bioquímicas, y moleculares a lesiones cerebrales, así como para proporcionar los

medios de probar terapias nuevas, como administración de factores tróficos o trasplante de células madres del SNC (Kornblum y Cherry, 2001).

Muchos síndromes epilépticos se asocian a menudo con las anomalías estructurales y funcionales del cerebro, por lo que la Neuroimagen está tomando cada vez más un papel más preponderante en el diagnóstico de la epilepsia y en la decisión sobre las estrategias de tratamiento a los pacientes, particularmente si presentan crisis refractarias. El uso de radioisótopos para etiquetar moléculas implicadas en procesos biológicos, data del principio del sXX (Ploux y Mastrippolito, 1998), siendo la Fluorodeoxiglucosa (2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose), que traza la absorción y el metabolismo de la glucosa, radiotrazador más común usado para el PET en práctica y en la investigación clínicas.

Kornblum y cols. (2000) fueron los primeros en publicar resultados del metabolismo *in vivo* de la FDG durante crisis agudas usando microPET. Durante las crisis, la absorción de FDG aumentó en varias regiones del cerebro.

Un estudio reciente del microPET usando pilocarpina para inducir *status epilepticus* en los ratones C57B16 confirmó que la absorción de FDG fue aumentada 10 veces o más en el hipocampo (Mirrione y cols., 2006). El aumento en la absorción de FDG correlacionó otra vez directamente con la severidad del crisis durante el período de la absorción. Estos resultados coinciden con experimentos anteriores de 2-deoxy-14C glucosa después de inducir las crisis por KA (Collins y cols., el año 80) y pilocarpine (Scorza y cols., 2002). También en pacientes, crisis parciales complejas dan lugar a aumentos marcados en metabolismo de la glucosa en el foco de la crisis (Tatum and Stecker, 1995; Fong y Delgado-Escueta, 1999; Millan, 2001).

Las crisis parciales complejas que coinciden con la absorción de 18FDG demuestran un aumento marcada en el metabolismo de glucosa en el foco de la crisis (Fong y Delgado-Escueta, 1999; Millan y cols., 2001; Tatum y Stecker, 1995). Otros estudios demostraron que las crisis recurrentes espontáneos pueden inducir una disminución de la actividad en ciertas regiones específicas del cerebro (Choi y cols., 2003; Hong y cols., 2002), que se puede asociar a la degeneración neuronal (Diehl y cols., 2003; Theodore y cols., 2004).

Es bien conocido que el estímulo auditivo repentino e intenso puede inducir la expresión del *c-fos* en ciertas áreas del cerebro (Bullitt, 1990). En nuestra línea, hay una correlación entre la expresión del Fos en las *áreas del cerebro* analizadas en GASH:Sal después de la inducción de crisis. En el CI, se induce la expresión del gen *c-fos* de manera, sitio y contexto-específica 1,5-2 h, tras el desencadenamiento de una crisis inducida por sonido (Pierson y Snyder-Keller, 1992; Barrios, 2008).

La expresión inducida por crisis de c-Fos se ha utilizado para identificar las estructuras del cerebro implicadas en el CCA y en otro tipos de crisis (Dragunow and Robertson, 1988; Daval , 1989; Le Gal La Salle and Naquet, 1990; Shebab , 1992; Snyder-Keller and Pierson, 1992; Clough , 1997; Samoriski, 1998; Barton , 2001). Los patrones corticales de Fos inducidos por crisis en el grupo experimental no son demasiado asombrosos; la capacidad de las áreas específicas del cerebro de sostener actividad epileptiforme es una característica de circuitos locales constitutivos. Por ejemplo, bajo condiciones de disinhibición, la actividad epileptiforme ocurre solamente en regiones corticales de secciones in vivo del IC (Pierson y cols., 1989) de ratas no-susceptibles. Esto indica que

cualquier conectividad neuronal necesaria para apoyar la actividad epileptiforme es una que es una característica intrínseca de la corteza del CI. La localización del sitio de la iniciación de la crisis no aclara donde dentro de la vía auditivo esta la anomalía que distingue susceptible de animal no-susceptible. Esto es porque la susceptibilidad de CCA es una epilepsia refleja sensorial y así bajo circunstancias in vivo, las entradas ascendentes es también una parte integrante del circuito de crisis-iniciación. Concebible, las anomalías de circuitos locales o de inervaciones aferentes podían potencialmente ser la base de la susceptibilidad. En el actual estudio, se explora la posibilidad que la anomalía fundamental es una que afecta sobre todo al camino auditivo ascendente, es decir, sus campos terminales terminan en el núcleo central del CI también, el núcleo central recibe la información convergente de los núcleos cocleares, del complejo olivary superior, y del lemnisco lateral (Beyerl, 1978; Adams, 1979; Brunso-Bechtold y cols., 1981).

De acuerdo con estudios en otros roedores CCA-susceptibles basados en lesiones, electrofisiológico, y el técnicas de trazado, el IC, se ha implicado como el sitio de la iniciación del CCA (Kesner, 1966; Willott y Lu, 1980; Faingold ., 1988; Millan , 1988; Le Gal Le Salle y Naquet, 1990; Snyder-Keller y Pierson, 1992). La expresión extensa de c-fos se observa en el CI después del CCA (Snyder-Keller y Pierson, 1992; Ross y Coleman, 2000). Wada y cols., (1970) propuso que el núcleo central pueda ser el sitio de la iniciación para el CCA según lo demostrado por una atenuación o una desaparición de la actividad de crisis que sigue la destrucción bilateral.

Los resultados en el CI son igualmente intrigantes; aunque el CI demostrara un notable aumento de la absorción de FDG en los GASH:Sal, la expresión de “*fos*” se diferenciaba entre las regiones secundarias del CI después de una crisis. Las crisis, por tanto, provocan una inducción selectiva de la inmunoreactividad al Fos en las cortezas del CI (Barrios, 2008). Esta respuesta es selectiva, ya que el mismo estímulo de 90dB, en el hámster control no produce inducción apreciable en la expresión de *c-fos*

El estudio de la expresión de Fos y del metabolismo de la glucosa constituyen métodos diferentes de mapeo funcional de las convulsiones y que no son comparables en cuanto a analizar los niveles de actividad cerebral. El estudio de la expresión de Fos constituye un marcador de incremento en la actividad génica como consecuencia del aumento en el nivel de actividad neuronal. El aumento en los niveles de captación de glucosa se relaciona con el incremento de forma aguda en los requerimientos metabólicos de la neurona y sus terminales. Cada método posee su propia utilidad para el mapeo de áreas cerebrales asociadas con las convulsiones (Clough y cols., 1997; Eells y cols., 1997, 1998, 2000; Morgan y cols., 1987; White y Price, 1993). Sin embargo, se debe ser muy cuidadoso en la interpretación de los resultados de expresión de Fos y del metabolismo de la glucosa. La captación de 2-DG puede ser cuantificada más fácilmente que la expresión de Fos, pero para ello hay que tener en cuenta el tiempo, la edad y la correlación entre tratados y controles.

Como la captación de DG se correlaciona con el incremento de la actividad neuronal, ello puede ocurrir tanto en regiones que convulsionan como en las que no, debido al incremento de la actividad inhibitoria, que para los efectos

de captación de glucosa es casi exactamente como la actividad excitadora. Nehlig y cols., 1996 mostraron disminución de la actividad metabólica Inter-ictal en regiones auditivas de ratas Wistar con susceptibilidad convulsiva de tipo audiogénico en comparación con los controles, lo cual es muy probable que se deba a alteraciones auditivas de los animales. También se ha encontrado una disminución significativa local de la utilización de glucosa en ratas Spargue-Dawley en comparación con GEPRs (Saija y cols., 1992). Estos hallazgos corroboran el hecho de que tanto el metabolismo de glucosa como los niveles de expresión de Fos no siempre ofrecen la misma información y hay que ser muy cauteloso a la hora de interpretar los resultados.

Resultados anteriores realizados en nuestro laboratorio (Barrios, 2008) indican que la diferencia de activación entre los subnúcleos coliculares, medida por el incremento en la expresión de c-fos entre los GASH:Sal y los controles, es altamente significativa para el subnúcleo CECI y para la región SGP ($p \leq 0,01$) y significativa entre los subnúcleos CDCI y NCCI ($p \leq 0,05$) de ambas líneas. El NCCI recibe proyecciones ascendentes de casi todos los núcleos auditivos del médula oblonga y proyecta a los núcleos dorsales y externos del IC (Coleman y Clerici, 1987) donde se observa una inmunoreactividad de Fos moderado hasta pesado en los GASH:Sal. El núcleo externo es el núcleo de la salida del IC y se piensa que propaga CCA a otras estructuras del cerebro implicadas en el CCA (Ribak y Morin, 1995; Faingold, 1999; Ross y Coleman, 2000). Las estructuras del médula oblonga que reciben la entrada directa o indirecta del enIC que exhibió el Fos-ir inducido por crisis en el estudio actual incluyen las capas profundas del colliculus superior, gris periacueductal, porción lateral superior del núcleo

parabrachial lateral y de núcleo cuneiforme. Estas estructuras del cerebro se han demostrado para ser implicadas en crisis tónicas (Clough ., 1997; Samoriski ., 1997; Faingold, 1999; Klein ., 2004). Piensan que CCA se inicia en el colliculus inferior que liga la entrada sensorial auditiva a las estructuras del médula oblonga de la salida motora que propagan a CCA. El patrón de la inmunoreactividad c-Fos observado en este estudio después del estímulo del CCA, sugiere que el colliculus inferior inicia la red que es la base de CCA en el GASH:Sal.

El futuro de los GASH:Sal

Al consolidar estos hámsters en el estabulario del servicio de experimentación animal (S.E.A.) de la Universidad de Salamanca, se ha recuperado el patrimonio genético de los hámsters GPG/Vall, permitiendo su estabilización y el desarrollo de estudios de estandarización, con la idea última de poner a disposición de la comunidad científica un nuevo modelo experimental de epilepsia.

Este modelo servirá tanto para estudiar los mecanismos básicos de la epilepsia, así como una herramienta farmacológica muy interesante para probar diferentes drogas antiepilépticas existentes en el mercado y/o de nueva aparición.

No hay que olvidar que el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) presenta una serie de ventajas adicionales como animal de experimentación, ya que tiene:

- *una reproducción fácil (seis crías por parto unas seis veces al año en su ciclo reproductivo útil de aproximadamente un año).

- *una relativa falta de infecciones específicas.

- *un rápido desarrollo con un corto ciclo vital.

Este modelo presenta innumerables ventajas, sobre todo por ser un animal que no ha sufrido modificaciones en su material genético, sino que una mutación espontánea por cruzamientos endogámicos repetitivos ha desenmascarado la alteración, mucho más parecido a lo que sucede en la especie humana.

Finalmente, una vez aisladas e identificadas las secuencias de ADN que diferencien los GASH:Sal de los controles, no descartamos introducirlas en un ratón para obtener un modelo de ratón epiléptico transgénico, más fácilmente patentable según la legislación europea actual.

VI. CONCLUSIONES

1. Los hámsters control presentan unos valores de umbral auditivo homogéneos y están dentro del rango de la normalidad para los roedores.
2. Los hámsters GASH:Sal presentan una función auditiva deficiente, con umbrales auditivos muy elevados. Esta situación parece empeorar con el edad.
3. Los hámsters control presentan un audiograma de morfología sigmoidea en el rango estudiado (4-40 KHz), con mejores umbrales para las frecuencias más bajas.
4. El audiograma de los GASH/Sal está muy afectado, con umbrales iguales o superiores a 70 dB para todas las frecuencias.
5. Las latencias pico e interpico medidas tras estimulación tipo click a 90 dB de intensidad son similares para los hámsters controles y los GASH:Sal de 3 meses, lo que indica que los GASH:Sal no presentan alteraciones en la conductividad del estímulo nervioso a lo largo de la vía auditiva.
6. Todos los GASH:Sal presentan una crisis convulsiva generalizada completa generada por un estímulo acústico intenso.
7. En el patrón de descarga del EEG se aprecian los diferentes intervalos que corresponden con las fases conductuales de las convulsiones audiógenas del hámster GASH:Sal; tanto la fase de carrera salvaje, como la de contracciones tónico-clónicas se diferencian de las demás en la amplitud y en la frecuencia de descarga.
8. Existen diferencias entre el genoma de GASH:Sal y el hámster sirio normal.
9. El tipo de epilepsia que presentan los GASH:Sal es troncoencefálica, estando implicado el colículo inferior en el inicio de las crisis audiógenas

VII. BIBLIOGRAFIA

A

- Adams, J. C. (1979). "Ascending projections to the inferior colliculus." *J Comp Neurol* **183**(3): 519-38.
- Akbar, M. T., Rattray M. Williams, R.J., Chong, N.W., Meldrum, B.S. (1998). "Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat." *Neuroscience* **85**(4): 1235-51.
- Albala, B. J., Moshe S.L., Okada, R. (1984). "Kainic-acid-induced seizures: a developmental study." *Brain Res* **315**(1): 139-48.

B

- Bajo VM, Moore DR (2005) Descending projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Comp Neurol* **486**(2):101-16.
- Barrios Rodríguez, LF (2008). "El receptor tipo opioide ORL1 en los GASH/Sal, una nueva línea de Hámsters Sirios con epilepsia audiógena". Memoria de tesis doctoral. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
- Barton, M. E., Klein, B.D., Wolf, H.H., White, H.S. (2001). "Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy." *Epilepsy Res* **47**(3): 217-27.
- Beck, M. M., Brown-Borg, H.M., Jones, T.A. (1987). "Peripheral and brainstem auditory function in paroxysmal (px) White Leghorn chicks." *Brain Res* **406**(1-2): 93-8.
- Beig, M. I., Bhagat, N., Talway, A., Chanra, R., Fahim, M., Katyal, A.(2007). "Simultaneous recording of electroencephalogram and blood pressure in conscious telemetered rats during ictal state." *J Pharmacol Toxicol Methods* **56**(1): 51-7.
- Ben-Ari, Y. (1981). "Epilepsy: changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid." *Adv Biochem Psychopharmacol* **27**: 385-94.
- Berkovic, S. F.,Howell, R.A., Hay, D.A., Hopper, J.L. (1998). "Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes." *Ann Neurol* **43**(4): 435-45.
- Berkovic, S. F. and I. E. Scheffer (1997). "Epilepsies with single gene inheritance." *Brain Dev* **19**(1): 13-8.
- Beyerl, B. D. (1978). "Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat." *Brain Res* **145**(2): 209-23.
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K. (1998). "A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy." *Science* **279**(5349): 403-6.
- Blume, W. T., Luders, H.O., Mizrahi, E., Tassinari, C., van Emde Boas, W., Engel, J., Jr. (2001). "Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology." *Epilepsia* **42**(9): 1212-8.
- Bobbin, R. P., Ceasar, G., Fallon, M. (1990). "Potassium induced release of GABA and other substances from the guinea pig cochlea." *Hear Res* **46**(1-2): 83-93.
- Borg, E. (1982). "Auditory thresholds in rats of different age and strain. A behavioral and electrophysiological study." *Hear Res* **8**(2): 101-15.
- Bosnyakova, D., Gabova, A., Zharikova, A., Gnezditski, V., Kuznetsova, G., van Luijtelaa, G. (2007). "Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats." *Clin Neurophysiol* **118**(8): 1736-43.
- Browning, R. A. (1986). "Neuroanatomical localization of structures responsible for seizures in the GEPR: lesion studies." *Life Sci* **39**(10): 857-67.
- Bruehl, C., Kloiber, O., Hossman, K.A., Dorn, T., Witte, O.W. (1995). "Regional hypometabolism in an acute model of focal epileptic activity in the rat." *Eur J Neurosci* **7**(2): 192-7.
- Brunso-Bechtold, J. K., Thompson, G.C., Masterton, R.B. (1981). "HRP study of the organization of auditory afferents ascending to central nucleus of inferior

- colliculus in cat." *J Comp Neurol* **197**(4): 705-22.
- Buchhalter, J. R. (1993). "Animal models of inherited epilepsy." *Epilepsia* **34 Suppl 3**: S31-41.
- Burchiel, K. J., Myers, R.R., Bickford, R.G. (1976). "Visual and auditory evoked responses during penicillin-induced generalized spike-and-wave activity in cats." *Epilepsia* **17**(3): 293-311.
- Burda, H. (1985). "Qualitative assessment of postnatal maturation of the organ of Corti in two rat strains." *Hear Res* **17**(3): 201-8.
- Burgess, D. L., Jones, J.M., Meisler, M.H., Noebels, J.L. (1997). "Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse." *Cell* **88**(3): 385-92.

C

- Camfield, P. R., Metrakos, K., Andermann, F. (1978). "Basilar migraine, seizures, and severe epileptiform EEG abnormalities." *Neurology* **28**(6): 584-8.
- Caminos, E., Garcia-Pino, E., Martinez-Galan, J.R., Juiz, J.M. (2007). "The potassium channel KCNQ5/Kv7.5 is localized in synaptic endings of auditory brainstem nuclei of the rat." *J Comp Neurol* **505**(4): 363-78.
- Cavalheiro, E. A. (1995). "The pilocarpine model of epilepsy." *Ital J Neurol Sci* **16**(1-2): 33-7.
- Chakravarty, D. N. and C. L. Faingold (1997). "Aberrant neuronal responsiveness in the genetically epilepsy-prone rat: acoustic responses and influences of the central nucleus upon the external nucleus of inferior colliculus." *Brain Res* **761**(2): 263-70.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M. (1998). "A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family." *Nat Genet* **18**(1): 53-5.
- Chini, B., Raimons, E., Elgohyen, A.B., Moralli, D., Balzaretto, M., Heinemann, S. (1994). "Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunit gene (*CHRNA7*)." *Genomics* **19**(2): 379-81.
- Chioza, B., Goodwin, H., Blower, J., McCormick, D., Nashef, L., Asherson, P., Makoff, A.J. (2000). "Failure to replicate association between the gene for the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (*CHRNA4*) and IGE." *Am J Med Genet* **96**(6): 814-6.
- Choi, J. Y., Kim, S.J., Hong, S.B., Seo, D.W., Hong, S.C., Kim, B.T., Kim, S.E. (2003). "Extratemporal hypometabolism on FDG PET in temporal lobe epilepsy as a predictor of seizure outcome after temporal lobectomy." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**(4): 581-7.
- Chugani, H. T., Hovda, D.A., Villablanca, J.R., Phelps, M.E., Xu, W.F. (1991). "Metabolic maturation of the brain: a study of local cerebral glucose utilization in the developing cat." *J Cereb Blood Flow Metab* **11**(1): 35-47.
- Chugani, H. T. and B. Jacobs (1994). "Metabolic recovery in caudate nucleus of children following cerebral hemispherectomy." *Ann Neurol* **36**(5): 794-7.
- Cid, L. P., Montrose-Rafizadeh C., Smith, D.I., Guggino, W.B., Cutting, G.R. (1995). "Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (*CIC-2*) cDNA widely expressed in human tissues." *Hum Mol Genet* **4**(3): 407-13.
- Clark, J. A. and J. O. Pickles (1996). "The effects of moderate and low levels of acoustic overstimulation on stereocilia and their tip links in the guinea pig." *Hear Res*

99(1-2): 119-28.

- Clough, R. W., Eells, J.B., Browning, R.A., Jobe, P.C. (1997). "Seizures and proto-oncogene expression of fos in the brain of adult genetically epilepsy-prone rats." Exp Neurol **146**(2): 341-53.
- Coenen, A. M. and E. L. Van Luijtelaaar (2003). "Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats." Behav Genet **33**(6): 635-55.
- Coleman, J. R., Campbell, D., Cooper, W.A., Welsch, M.G., Moyer, J. (1994). "Auditory brainstem responses after ovariectomy and estrogen replacement in rat." Hear Res **80**(2): 209-15.
- Coleman, J. R. and W. J. Clerici (1987). "Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat." J Comp Neurol **262**(2): 215-26.
- Collins, R. C. (1978). "Use of cortical circuits during focal penicillin seizures: an autoradiographic study with [¹⁴C]deoxyglucose." Brain Res **150**(3): 487-501.
- Cooper, W. A., Coleman, J.R., Newton, E.H. (1990). "Auditory brainstem responses to tonal stimuli in young and aging rats." Hear Res **43**(2-3): 171-9.
- Cox, G. A., Lutz, C.M., Yang, C.L., Biemesderfer, D., Bronson, R.T., Fu, A., Aronson, P.S., Noebels, J.K., Frankel, W.N. (1997). "Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice." Cell **91**(1): 139-48.
- Crowley, D. E., Swain, R.E., Schramm, V.L., Swanson, S.N. (1972). "Analysis of age-related changes in electric responses from the inner ear of rats." Ann Otol Rhinol Laryngol **81**(5): 739-46.

D

- Dailey, J.W., Reigel, C.E., Mishra, R.K., Jobe, P.C. (1989) "Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat" Epilepsy Res **3**(1): 3-17
- Dallos, P. and M. A. Cheatham (1992). "Cochlear hair cell function reflected in intracellular recordings in vivo." Soc Gen Physiol Ser **47**: 371-93.
- Darrouzet, J. and A. Giulhaume (1967). "[Absence of cochlear microphonic potential. Histological study of the organ of Corti in the mouse]." Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) **88**(11): 813-33.
- Daval, J. L., Nakajima, T., Gleiter, C.H., Post, R.M., Marangos, P.J. (1989). "Mouse brain c-fos mRNA distribution following a single electroconvulsive shock." J Neurochem **52**(6): 1954-7.
- Deprez, L., Claes, L.R., Audenaert, D., Van Dyck, T., Goossens, D., Van Paesschen, W., Del-Favero, J., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P. (2006). "Genome-wide linkage of febrile seizures and epilepsy to the FEB4 locus at 5q14.3-q23.1 and no MASS1 mutation." Hum Genet **118**(5): 618-25.
- Diehl, B., LaPresto, E., Najm, I., Raja, S., Rona, S., Babb, T., Ying, Z., Bingaman, W., Luders, H.O., Ruggieri, P. (2003). "Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism correlates with temporal lobe atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia." Epilepsia **44**(4): 559-64.
- Dragunow, M., MacGibbon, G.A., Lawlor, P., Butterworth, N., Connor, B., Henderson, C., Walton, M., Woodgate, A., Hughes, P., Faull, R.L. (1997). "Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration." Rev Neurosci **8**(3-4): 223-65.
- Dragunow, M. and H. A. Robertson (1988). "Seizure-inducible c-fos protein(s) in mammalian neurons." Trends Pharmacol Sci **9**(1): 5-6.

E

- Eells, J. B., Clough, R.W., Browning, R.A. (1998). "Expression of Fos in the superior lateral subdivision of the lateral parabrachial (LPBSl) area after generalized tonic seizures in rats." Brain Res Bull **47**(2): 155-61.
- Eells, J. B., Clough, R.W., Browning, R.A., Jobe, P.C. (1997). "Fos in locus coeruleus

neurons following audiogenic seizure in the genetically epilepsy-prone rat: comparison to electroshock and pentylenetetrazol seizure models." *Neurosci Lett* **233**(1): 21-4.

- Eells, J. B., Clough, R.W., Miller, J.W., Jobe, P.C., Browning, R.A. (2000). "Fos expression and 2-deoxyglucose uptake following seizures in developing genetically epilepsy-prone rats." *Brain Res Bull* **52**(5): 379-89.
- Elmslie, F. V., Rees, M., Williamson, M.P., Kerr, M., Kjeldsen, M.J., Pang, K.A., Sundqvist, A., Friis, M.L., Chadwaick, D., Richens, A., Covanis, A., Santos, M., Arzimanoglou, A., Panayiotopoulos, C.P., Curtis, D., Whitehouse, W.P., Gardiner, R.M. (1997). "Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q." *Hum Mol Genet* **6**(8): 1329-34.
- Engel, J., Jr. (1992). "Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena." *Epilepsy Res Suppl* **8**: 9-20.

F

- Faingold, C. L. (1988). "The genetically epilepsy-prone rat." *Gen Pharmacol* **19**(3): 331-8.
- Faingold, C. L. (1998). "Locomotor behaviors in generalized convulsions are hierarchically driven from specific brain-stem nuclei in the network subserving audiogenic seizure." *Ann N Y Acad Sci* **860**: 566-9.
- Faingold, C. L. (1999). "Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat." *Adv Neurol* **79**: 311-21.
- Faingold, C. L. (2002). "Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology - audiogenic seizures." *Hear Res* **168**(1-2): 223-37.
- Faingold, C. L. (2004). "Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action." *Prog Neurobiol* **72**(1): 55-85.
- Faingold, C. L., Gehlbach, G., Travis, M.A., Caspary, D.M. (1986). "Inferior colliculus neuronal response abnormalities in genetically epilepsy-prone rats: evidence for a deficit of inhibition." *Life Sci* **39**(10): 869-78.
- Faingold, C. L., Marcinczyk, M.J., Casebeer, D.J., Randall, M.E., Arneric, S.P., Browning, R.A. (1994). "GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures." *Brain Res* **640**(1-2): 40-7.
- Faingold, C. L., Walsh, E.J., Maxwell, J.K., Randall, M.E. (1990). "Audiogenic seizure severity and hearing deficits in the genetically epilepsy-prone rat." *Exp Neurol* **108**(1): 55-60.
- Ferraz, A. C., Pereira, L.F., Ribeiro, R.L., Wolfman, C., Medina, J.H., Scorza, F.A., Santos, N.F., Cavalheiro, E.A., Da Cunha, C. (2000). "Ricinine-elicited seizures. A novel chemical model of convulsive seizures." *Pharmacol Biochem Behav* **65**(4): 577-83.
- Fisher, R.S., (1989) "Animal models of the epilepsies." *Brain Res Rev* **14**(3): 245-78.
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. Jr.(2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* **46**(4): 470-2.
- Fletcher, C. F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D., Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1996). "Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects." *Cell* **87**(4): 607-17.
- Fong, C. Y. and A. V. Delgado-Escueta (1999). "Ictal PET in temporal lobe epilepsy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**(3): 409.
- Fong, G. C., Shah, P.U., Gee, M.N., Serratosa, J.M., Castroviejo, I.P., Khan, S., Ravat, S.H., Mani, J., Huang, Y., Zhao, H.Z., Medina, M.T., Treiman, L.J., Pineda, G.,

- Delgado-Escueta, A.V. (1998). "Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispikes-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24." *Am J Hum Genet* **63**(4): 1117-29.
- Friauf, E. (1992). "Tonotopic Order in the Adult and Developing Auditory System of the Rat as Shown by c-fos Immunocytochemistry." *Eur J Neurosci* **4**(9): 798-812.
- Fuentes-Santamaria, Cantos, R., Alvarado, J.C., Garcia-Atares, N., Lopez, D.E. (2005). "Morphologic and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall)." *Epilepsia* **46**(7): 1027-45.
- Fuller, J. L. and M. E. Smith (1953). "Kinetics of sound induced convulsions in some inbred mouse strains." *Am J Physiol* **172**(3): 661-70.
- Funasaka, S. and H. Abe (1979). "Cochlear and fast electrical responses to frequency modulated tones: a frequency specific stimulus." *Auris Nasus Larynx* **6**(2): 59-69.

G

- Garcia-Cairasco, N. and R. M. Sabbatini (1989). "Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats." *Behav Brain Res* **33**(1): 65-77.
- Garcia-Cairasco, N. and R. M. Sabbatini (1991). "Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats." *Physiol Behav* **50**(2): 421-7.
- Goddard, G. V. (1967). "Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity." *Nature* **214**(5092): 1020-1.
- Goddard, G. V., McIntyre, D.C., Leech, C.K. (1969). "A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation." *Exp Neurol* **25**(3): 295-330.
- Gotman, J., Levtova, V., Farine, B. (1993). "Graphic representation of the EEG during epileptic seizures." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **87**(4): 206-14.
- Goutieres, F. and J. Aicardi (1985). "Atypical presentations of pyridoxine-dependent seizures: a treatable cause of intractable epilepsy in infants." *Ann Neurol* **17**(2): 117-20.
- Greenberg, D. A., Delgado-Escueta, A.V., Wideltitz, H., Sparkes, R.S., Treiman, L., Maldonado, H.M., Park, M.S., Terasaki, P.I. (1988). "Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6." *Am J Med Genet* **31**(1): 185-92.
- Greer, C. A., Stewart, W.B., Kauer, J.S., Shepherd, G.M. (1981). "Topographical and laminar localization of 2-deoxyglucose uptake in rat olfactory bulb induced by electrical stimulation of olfactory nerves." *Brain Res* **217**(2): 279-93.
- Guler, N. F. and E. D. Ubeyli (2002). "Theory and applications of biotelemetry." *J Med Syst* **26**(2): 159-78.

H

- Hallmann, K., Durner, M., Sander, T., Steinlein, O.K. (2000). "Mutation analysis of the

- inwardly rectifying K(+) channels KCNJ6 (GIRK2) and KCNJ3 (GIRK1) in juvenile myoclonic epilepsy." *Am J Med Genet* **96**(1): 8-11.
- Haug, K., Hallmann, K., Horvath, S., Sander, T., Kubisch, C., Rau, B., Dullinger, J., Beyenburg, S., Elger, C.E., Propping, P., Heils, A. (2000). "No evidence for association between the KCNQ3 gene and susceptibility to idiopathic generalized epilepsy." *Epilepsy Res* **42**(1): 57-62.
- Haug, K., Sander, T., Hallna, K., Rau, B., Dullinger, J.S., Elger, C.E., Propping, P., Heils, A. (2000). "The voltage-gated sodium channel beta2-subunit gene and idiopathic generalized epilepsy." *Neuroreport* **11**(12): 2687-9.
- Heiss, W. D., Habedank, B., Klein, J.C., Herholz, K., Wienhard, K., Lenox, M., Nutt, R. (2004). "Metabolic rates in small brain nuclei determined by high-resolution PET." *J Nucl Med* **45**(11): 1811-5.
- Henry, K. R. (1967). "Audiogenic seizure susceptibility induced in C57BL-6J mice by prior auditory exposure." *Science* **158**(803): 938-40.
- Henry, K. R. and M. Saleh (1973). "Recruitment deafness: functional effect of priming-induced audiogenic seizures in mice." *J Comp Physiol Psychol* **84**(2): 430-5.
- Hironaka, N. and H. Niki (2000). "Effects of N-methyl-D-aspartate receptor subunit antagonists on regulation of susceptibility to audiogenic seizures in rats." *Neurosci Lett* **288**(2): 139-42.
- Hong, S. B., Han, J.J., Roh, S.Y., Seo, D.W., Kim, S.E., Kim, M.H. (2002). "Hypometabolism and interictal spikes during positron emission tomography scanning in temporal lobe epilepsy." *Eur Neurol* **48**(2): 65-70.
- Hovda, D. A., Lee, S.M., Smith, M.L., Von Stcuk, S., Bergsneider, M., Kelly, D., Shalmon, E., Martin, N., Caron, M., Mazziotta, J. (1995). "The neurochemical and metabolic cascade following brain injury: moving from animal models to man." *J Neurotrauma* **12**(5): 903-6.
- Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures." *J Histochem Cytochem* **29**(4): 577-80.
- Huang, C. M. (1980). "A comparative study of the brain stem auditory response in mammals." *Brain Res* **184**(1): 215-9.

I

- Iglesias, S., Marchal, G., Riouc, P., Beaudouin, V., Hauttement, A.J., de la Sayette, V., Le Doze, F., Derlon, J.M., Viader, F., Baron, J.C. (1996). "Do changes in oxygen metabolism in the unaffected cerebral hemisphere underlie early neurological recovery after stroke? A positron emission tomography study." *Stroke* **27**(7): 1192-9.
- Iida, K., Sasa, M., Serikawa, T., Noda, A., Ishihara, K., Akimitsu, T., Hanaya, R., Arita, K., Kurisu, K. (1998). "Induction of convulsive seizures by acoustic priming in a new genetically , defined model of epilepsy (Noda epileptic rat: NER)." *Epilepsy Res* **30**(2): 115-26.
- ILAE, (1981). "Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures." *Epilepsia*(22): 489-501.

J

- Jackson, P. J., Hill, K.K., Laker, M.T., Ticknor, L.O., Keim, P. (1999). "Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis." *J Appl Microbiol* **87**(2): 263-9.
- Janz, D. (1989). "Juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsy with impulsive petit mal." *Cleve Clin J Med* **56 Suppl Pt 1**: S23-33; discussion S40-2.
- Jentsch, T. J. (2000). "Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease." *Nat Rev Neurosci* **1**(1): 21-30.
- Jeutter, D. C. (1982). "Biomedical telemetry techniques." *Crit Rev Biomed Eng* **7**(2): 121-74.
- Jobe, P. C., Mishra, P.K., Adams-Curtis, L.E., Deoskar, V.U., Ko, K.H., Browning, R.A., Dailey, J.W. (1995). "The genetically epilepsy-prone rat (GEPR)." *Ital J Neurol Sci* **16**(1-2): 91-9.
- Joo, E. Y., Hong, S.B., Han, H.J., Tae, W.S., Kim, J.H., Han, S.J., Seo, D.W., Lee, K.H., Hong, S.C., Lee, M., Kim, S., Kim, B.T. (2005). "Postoperative alteration of cerebral glucose metabolism in mesial temporal lobe epilepsy." *Brain* **128**(Pt 8): 1802-10.

K

- Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Jehle, J.W., Reivich, M., Sharpe, F., Sokoloff, L. (1975). "Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with (14C)deoxyglucose." *Science* **187**(4179): 850-3.
- Kesner, R. P. (1966). "Subcortical mechanisms of audiogenic seizures." *Exp Neurol* **15**(2): 192-205.
- Killam, K. F., Killam, E.K., Naquet, R. (1967). "Studies on the epilepsy induced by photic stimulation in *Papio papio*." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **23**(1): 91.
- Kim, K. S., Jeong, H.W., Park, C.K., Ha, J.H. (2001). "Suitability of AFLP markers for the study of genetic relationships among Korean native dogs." *Genes Genet Syst* **76**(4): 243-50.
- Kim, K. S., Yeo, J.S., Kim, J.W. (2002). "Assessment of genetic diversity of Korean native pig (*Sus scrofa*) using AFLP markers." *Genes Genet Syst* **77**(5): 361-8.
- Klein, B. D., Fu, Y.H., Ptacek, L.J., White, H.S. (2004). "c-Fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the Frings mouse." *Epilepsy Res* **62**(1): 13-25.
- Klein, B. D., Fu, Y.H., Ptacek, L.J., White, H.S. (2005). "Auditory deficits associated with the frings mgr1 (mass1) mutation in mice." *Dev Neurosci* **27**(5): 321-32.
- Knipper, M., Kopschall, I., Rojbock, K., Kopke, A.K., Bonk, I., Zimmermann, U., Zenner, H. (1997). "Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear." *Cell Tissue Res* **287**(1): 23-41.
- Kornblum, H. I., Araujo, D.M., Annala, A.J., Tatsukawa, K.J., Phelps, M.E., Cherry, S.R. (2000). "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET)." *Nat Biotechnol* **18**(6): 655-60.
- Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B.P., Voss, H.P., Remie, R., Van Zutphen, B.L. (2001). "The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances." *Contemp Top Lab Anim Sci* **40**(1): 8-16.
- Kramer, K. and L. B. Kinter (2003). "Evaluation and applications of radiotelemetry in

- small laboratory animals." *Physiol Genomics* **13**(3): 197-205.
- Kuhl, D. E., Engel, J., Jr., Phelps, M.E., Kowell, A.P. (1978). "Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in man: investigation by emission computed tomography of 18F-fluorodeoxyglucose and 13N-ammonia." *Trans Am Neurol Assoc* **103**: 52-3.
- Kuhl, D. E., Engel, J., Jr., Phelps, M.E., Selin, C. (1980). "Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in humans determined by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3." *Ann Neurol* **8**(4): 348-60.
- Kwon, J. and M. Pierson (1997). "Fos-immunoreactive responses in inferior colliculi of rats with experimental audiogenic seizure susceptibility." *Epilepsy Res* **27**(2): 89-99.

L

- Lamusuo, S., Jutila, L., Ylinen, A., Kalviainen, R., Mervaala, E., Haaparanta, M., Jaaskelainen, S., Partanen, K., Vapalahti, M., Rinne, J. (2001). "[18F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage." *Arch Neurol* **58**(6): 933-9.
- Le Gal La Salle, G. and R. Naquet (1990). "Audiogenic seizures evoked in DBA/2 mice induce c-fos oncogene expression into subcortical auditory nuclei." *Brain Res* **518**(1-2): 308-12.
- Lefebvre, P. P., Weber, T., Leprince, P., Rigo, J.M., Delree, P., Rogister, B., Moonen, G. (1991). "Kainate and NMDA toxicity for cultured developing and adult rat spiral ganglion neurons: further evidence for a glutamatergic excitatory neurotransmission at the inner hair cell synapse." *Brain Res* **555**(1): 75-83.
- Lerche, H., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. (2001). "Ion channels and epilepsy." *Am J Med Genet* **106**(2): 146-59.
- Lerche, H., Scherer, C.R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A.D., Busch, A.E., Steinmeyer, K. (2000). "Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity." *J Biol Chem* **275**(29): 22395-400.
- Letts, V. A. (2005). "Stargazer-a mouse to seize!" *Epilepsy Curr* **5**(5): 161-5.
- Letts, V. A., Felix, R., Biddlecome, G.H., Arikath, J., Mahaffey, C.L., Valenzuela, A., Bartlett, F., Mori, Y., Campbell, K.P., Frankel, W.N. (1998). "The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit." *Nat Genet* **19**(4): 340-7.
- Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., Burke, E.P., Lifton, R.P., Philipson, K.D.(1994). "Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca²⁺ exchanger." *J Biol Chem* **269**(26): 17434-9.
- Li, H. S. and E. Borg (1991). "Age-related loss of auditory sensitivity in two mouse genotypes." *Acta Otolaryngol* **111**(5): 827-34.
- Luo, L., Brumm, D., Ryan, A.F. (1995). "Distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the developing rat cochlea." *J Comp Neurol* **361**(3): 372-82.

M

- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A. (1992). "Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review." *J Neural Transm Suppl* **35**: 37-69.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Kiesmann, M., Depaulis, A., Micheletti, G., Warter, J.M. (1987). "Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study." *Exp Neurol* **97**(1): 160-8.
- McGuire, K. L., Duncan, W.R., Tucker, P.W. (1985). "Syrian hamster DNA shows limited polymorphism at class I-like loci." *Immunogenetics* **22**(3): 257-68.
- Merchan-Perez, A., Gil-Loyzafa, P., Lopez-Sanchez, J., Eybalin, M., Valderrama, F.J. (1993). "Ontogeny of gamma-aminobutyric acid in efferent fibers to the rat cochlea." *Brain Res Dev Brain Res* **76**(1): 33-41.
- Millan, E., Abou-Khalil, B., Delbeke, D., Konrad, P. (2001). "Frontal Localization of Absence Seizures Demonstrated by Ictal Positron Emission Tomography." *Epilepsy Behav* **2**(1): 54-60.
- Millan, M. H., Meldrum, B.S., Boersma, C.A., Faingold, C.L. (1988). "Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. II. Efferent seizure propagating pathway." *Exp Neurol* **99**(3): 687-98.
- Mirrione, M. M., Schiffer, W.K., Siddiq, M., Dewey, S.L., Tsirka, S.E. (2006). "PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy." *Synapse* **59**(2): 119-21.
- Mirsky, A. F. and J. J. Tecce (1968). "The influence of paroxysmal spike and wave EEG activity on sensory evoked potentials in man." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **24**(2): 189.
- Mishra, P. K., Dailey, J.W., Reigel, C.E., Jobe, P.C. (1989). "Audiogenic convulsions in moderate seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-3s)." *Epilepsy Res* **3**(3): 191-8.
- Mishra, P. K., Dailey, J.W., Reigel, C.E., Tomsic, M.L., Jobe, P.C. (1988). "Sex-specific distinctions in audiogenic convulsions exhibited by severe seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-9s)." *Epilepsy Res* **2**(5): 309-16.
- Moraes, M. F., Chavali, M., Mishra, P.K., Jobe, P.C., Garcia-Cairasco, N. (2005). "A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s." *Brain Res* **1033**(1): 1-12.
- Moraes, M. F., Mishra, P.K., Jobe, P.C., Garcia-Cairasco, N. (2005). "An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures." *Brain Res* **1046**(1-2): 1-9.
- Morgan, J. I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T. (1987). "Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure." *Science* **237**(4811): 192-7.
- Muñoz De La Pascua, L., D.E. López, Ed. (2005). Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Salamanca.
- Muñoz, L., E. Saldaña, N. Garcia-Atarès, A. Viñuela, C. De Cabo, R. Cantos, J. Rueda, D.E. López (2003). "Estandarización y caracterización de una línea de hámsters (*Mesocricetus auratus*) con convulsiones audiógenas como modelo animal de epilepsia refleja." *Rev Neurol* **37**(11): 1081-1882.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1994). "Global and regional cause-of-death patterns in 1990." *Bull World Health Organ* **72**(3): 447-80.

N

- Nadler, J. V. (1981). "Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy." *Life Sci* **29**(20): 2031-42.
- Nakano, H., Saito, K., Suzuki, K. (1994). "Chronic implantation technique for monopolar EEG monitoring of epileptic seizures in mice." *Brain Res Bull* **35**(3): 261-8.
- Naquet, R. G. and A. Valin (1998). "Experimental models of reflex epilepsy." *Adv Neurol* **75**: 15-28.
- Naritoku, D. K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., Faingold, C.L. (1992). "Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors." *Exp Neurol* **115**(3): 317-24.
- Naritoku, D. K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., Faingold, C.L. (1992). "Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors." *Exp Neurol* **115**(3): 317-24.
- Negrini, R., Nijman, I.J., Milanese, E., Moazami-Goudarzi, K., Williams, J.L., Erhardy, G., Dunner, S., Rodellar, C., Valentini, A., Bradley, D.G., Olsaker, I., Kantanen, J., Ajmone-Marsan, P., Lenstra, J.A. (2007). "Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting." *Anim Genet* **38**(1): 60-6.
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A., Vergnes, M., Boyet, S., Marescaux, C. (1996). "Interictal cerebral metabolic levels in Wistar rats sensitive to audiogenic seizures." *Brain Res* **724**(1): 97-102.
- Nei, M. (1973). "Analysis of gene diversity in subdivided populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(12): 3321-3.
- Nei, M. (1978). "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals." *Genetics* **89**(3): 583-590.
- Neubauer, B. A., Fiedler, B., Himmelein, B., Kampfer, D., Lassker, U., Schwabe, G., Spanier, I., Tams, D., Bretscher, C., Moldenhauer, K., Kurlemann, G., Weise, S., Tedroff, K., Eeg-Olofsson, Ol., wadelius, C., Stephani, U. (1998). "Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14." *Neurology* **51**(6): 1608-12.
- Neumann, K., Maak, S., Stuermer, I.W., von Lengerken, G., Gattermann, R. (2001). "Low microsatellite variation in laboratory gerbrils." *J Hered* **92**(1): 71-4.
- Neumann, P. E. and R. L. Collins (1991). "Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5408-12.
- Niedermeyer, E. (1965). "Sleep Electroencephalograms in Petit Mal." *Arch Neurol* **12**: 625-30.
- Niedermeyer, E. (1996). "Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms." *Clin Electroencephalogr* **27**(1): 1-21.
- Niedermeyer, E. and R. Khalifeh (1965). "Petit mal status ("spike-wave stupor"). An electro-clinical appraisal." *Epilepsia* **6**(3): 250-62.
- Noda, A., Hashizume, R., Maihara, T., Tomizawa, Y., Ito, Y., Inoue, M., Kobayashi, K., Asano, Y., Sasa, M., Serikawa, T. (1998). "NER rat strain: a new type of genetic model in epilepsy research." *Epilepsia* **39**(1): 99-107.
- Noebels, J. L. (1999). "Single-gene models of epilepsy." *Adv Neurol* **79**: 227-38.
- Noebels, J. L. and R. L. Sidman (1989). "Persistent hypersynchronization of neocortical neurons in the mocha mutant of mouse." *J Neurogenet* **6**(1): 53-6.
- Novotny, E. J., Jr. (1998). "The role of clinical neurophysiology in the management of epilepsy." *J Clin Neurophysiol* **15**(2): 96-108.

O

- Oestreicher, E., Arnold, W., Ehrenberger, K., Felix, D. (1997). "Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs." *Hear Res* **107**(1-2): 46-52.
- Ottman, R. (2005). "Analysis of genetically complex epilepsies." *Epilepsia* **46 Suppl 10**: 7-14.
- Ovilo, C., Cervera, M.T., Castellanos, C., Martinez-Zapater, J.M. (2000). "Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers." *Anim Genet* **31**(2): 117-22.

P

- Pennacchio, L. A., Iehesjoki, A.E., Stone, N.E., Willour, V.L., Virtaneva, K., Miao, J., D'Amato, E., Ramirez, L., Faham, M., Koskiniemi, M., Warrington, J.A., Norio, R., de la Chapelle, A., Cox, D.R., Myers, R.M. (1996). "Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1)." *Science* **271**(5256): 1731-4.
- Penny, J. E., Brown, R.D., Hodges, K.B., Kupetz, S.A., Glenn, D.W., Jobe, P.C. (1983). "Cochlear morphology of the audiogenic-seizure susceptible (AGS) or genetically epilepsy prone rat (GEPR)." *Acta Otolaryngol* **95**(1-2): 1-12.
- Phelps, M. E., Hoffman, E.J., Mullani, N.A., Ter-Pogossian, M.M. (1975). "Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography." *J Nucl Med* **16**(3): 210-24.
- Pierson, M. and S. L. Liebmann (1992). "Noise exposure-induced audiogenic seizure susceptibility in Sprague-Dawley rats." *Epilepsy Res* **13**(1): 35-42.
- Pierson, M.G., Smith, K.L., Swann, J.W. (1989). "A slow NMDA-mediated synaptic potential underlies seizures originating from the midbrain". *Brain Res* **486**(2):381-6
- Ploux, L. and R. Mastroioppo (1998). "In vivo radiolabel quantification in small-animal models." *Nucl Med Biol* **25**(8): 737-42.
- Prasad, A. N., Prasa, C., Stafstrom, C.E. (1999). "Recent advances in the genetics of epilepsy: insights from human and animal studies." *Epilepsia* **40**(10): 1329-52.

R

- Razzoli, M., Papa, R., Valsecchi, P., Nonnis Marzano, F. (2003). "AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*)." *J Hered* **94**(6): 507-11.
- Reid, H. M. and R. L. Collins (1986). "Lateralized audiogenic seizure: motor asymmetries exhibited and the effects of interrupted stimulation." *Behav Neural Biol* **46**(3): 424-31.
- Reid, H. M. and R. L. Collins (1989). "Monaural and binaural audiogenic seizures in mice." *Behav Neural Biol* **51**(2): 136-44.
- Reid, K. H., Young, C., Schurr, A., Tseng, M., Payne, R.S., Keelen, P., Miller, J., Iyer, V.

- (1996). "Audiogenic seizures following global ischemia induced by chest compression in Long-Evans rats." *Epilepsy Res* **23**(3): 195-209.
- Ribak, C. E., Manio, A.L., Navetta, M.S., Gall, C.M. (1997). "In situ hybridization for c-fos mRNA reveals the involvement of the superior colliculus in the propagation of seizure activity in genetically epilepsy-prone rats." *Epilepsy Res* **26**(3): 397-406.
- Ribak, C. E. and C. L. Morin (1995). "The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures." *Anat Embryol (Berl)* **191**(4): 279-95.
- Robbins, J. (2001). "KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Ther* **90**(1): 1-19.
- Roberts, R. C., Ribak, C.E., Oertel, W.H. (1985). "Increased numbers of GABAergic neurons occur in the inferior colliculus of an audiogenic model of genetic epilepsy." *Brain Res* **361**(1-2): 324-38.
- Ross, K. C. and J. R. Coleman (1999). "Audiogenic seizures in the developmentally primed Long-Evans rat." *Dev Psychobiol* **34**(4): 303-13.
- Ross, K. C. and J. R. Coleman (2000). "Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates." *Neurosci Biobehav Rev* **24**(6): 639-53.

S

- Saija, A., Princi, P., De Pasquale, R., Costa, G., De Sarro, G.B. (1992). "Evaluation of local cerebral glucose utilization and the permeability of the blood-brain barrier in the genetically epilepsy-prone rat." *Exp Brain Res* **88**(1): 151-7.
- Samoriski, G. M., Piekut, D.T., Applegate, C.D. (1997). "Differential spatial patterns of Fos induction following generalized clonic and generalized tonic seizures." *Exp Neurol* **143**(2): 255-68.
- Samoriski, G. M., Piekut, D.T., Applegate, C.D. (1998). "Regional analysis of the spatial patterns of Fos induction in brain following flurothyl kindling." *Neuroscience* **84**(4): 1209-22.
- Sander, T., Bockenkamp, B., Hildmann, T., Blasczyk, R., Kretz, R., Wienker, T.F., Volz, A., Schmitz, B., Beck-Mannagetta, G., Riess, O., Epplen, J.T., Janz, D., Ziegler, A. (1997). "Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6." *Neurology* **49**(3): 842-7.
- Sander, T., Peters, C., Janz, D., Bianchi, A., Bauer, G., Wienker, T.F., Hildmann, T., Epplen, J.T., Riess, O. (1998). "The gene encoding the alpha1A-voltage-dependent calcium channel (CACN1A4) is not a candidate for causing common subtypes of idiopathic generalized epilepsy." *Epilepsy Res* **29**(2): 115-22.
- Sander, T., Scholz, L., Janz, D., Epplen, J.T., Riess, O. (1999). "Length variation of a polyglutamine array in the gene encoding a small-conductance, calcium-activated potassium channel (hKCa3) and susceptibility to idiopathic generalized epilepsy." *Epilepsy Res* **33**(2-3): 227-33.
- Sander, T., Schulz, H., Saar, K., Gennaro, E., Riggio, M.C., Bianchi, A., Zara, F., Luna, D., Bulteau, C., Kaminska, A., Ville, D., Cieuta, C., Picard, F., Prud'homme, J.F., Bate, L., Sundquist, A., Gardiner, R.M., Janssen, G.A., de Haan, G.J., Kasteleijn-Nolst-Trenite, D.G., Bader, A., Lindhout, D., Riess, O., Wienker, T.F., Janz, D., Reis, A. (2000). "Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies." *Hum Mol Genet* **9**(10): 1465-72.
- Sato, S., Dreiguss, F.E., Penry, J.K. (1973). "The effect of sleep on spike-wave discharges in absence seizures." *Neurology* **23**(12): 1335-45.
- Saunders, J. C., Bock, G.R., James, R., Chen, C.S. (1972). "Effects of priming for audiogenic seizure on auditory evoked responses in the cochlear nucleus and

- inferior colliculus of BALB-c mice." *Exp Neurol* **37**(2): 388-94.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., Jentsch, T.J. (2000). "KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents." *J Biol Chem* **275**(31): 24089-95.
- Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T.J., Saftig, P., Friedrich, T. (2006). "Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly." *J Neurosci* **26**(14): 3757-66.
- Scwake, M., Jentsch, T.J., Friedrich, T. (2003). "A corboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly." *EMBO Rep* **4**(1):76-81.
- Schwartz, W. J., Smoth, C.B., Davidsen, L., Savaki, H., Sokoloff, L., Mata, M., Fink, D.J., Gainer, H. (1979). "Metabolic mapping of functional activity in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat." *Science* **205**(4407): 723-5.
- Schwartzkroin, P. A. (1997). "Origins of the epileptic state." *Epilepsia* **38**(8): 853-8.
- Scorza, F. A., Arida, R.M., Priel, M.R., Calderazzo, L., Cavalheiro, E.A. (2002). "Glucose utilisation during status epilepticus in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study." *Arg Neuropsiquiatr* **60**(2-A): 198-203.
- Serikawa, T., Ohno, Y., Sasa, M., Yamada, J., Takaori, S. (1987). "A new model of petit mal epilepsy: spontaneous spike and wave discharges in tremor rats." *Lab Anim* **21**(1): 68-71.
- Serratos, J. M., Delgado-Escueta, A.V., Posada, I., Shih, S., Drury, I., Berciano, J., Zabala, J.A., Antunez, M.C., Sparkes, R.S. (1995). "The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q." *Hum Mol Genet* **4**(9): 1657-63.
- Seyfried, T. N., Todorova, M.T., Poderycki, M.J., . (1999). "Experimental models of multifactorial epilepsies: the EL mouse and mice susceptible to audiogenic seizures." *Adv Neurol* **79**: 279-90.
- Sha, S. H., Kanicki, A., Dootz, G., Talaska, A.E., Halsey, K., Dolan, D., Altschuler, R., Schacht, J. (2008). "Age-related auditory pathology in the CBA/J mouse." *Hear Res* **243**(1-2): 87-94.
- Sharp, F. R. (1976). "Relative cerebral glucose uptake of neuronal perikarya and neuropil determined with 2-deoxyglucose in resting and swimming rat." *Brain Res* **110**(1): 127-39.
- Sheng, M. and M. E. Greenberg (1990). "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system." *Neuron* **4**(4): 477-85.
- Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M., Marescaux, C. (1994). "C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats." *Neurosci Lett* **175**(1-2): 58-62.
- Simler, S., Vergnes, M., Marescaux, C. (1999). "Spatial and temporal relationships between C-Fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats." *Exp Neurol* **157**(1): 106-19.
- Singh, N. A., Charliers, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer, A., Anderson, V.E., Leppert, M. (1998). "A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns." *Nat Genet* **18**(1): 25-9.
- Snyder-Keller, A. M. and M. G. Pierson (1992). "Audiogenic seizures induce c-fos in a model of developmental epilepsy." *Neurosci Lett* **135**(1): 108-12.
- Sola, C., Barron, S., Tusell, J.M., Serratos, J. (2001). "The Ca²⁺/calmodulin system in neuronal hyperexcitability." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(5): 439-55.
- Soria Milla, M., Macias Fernandez, JA., Aguirre Berrocal, A. (1987). "Epilepsia audiogenica en una cepa endogamica de hamster dorado." *Rev Esp Epilepsia*(2): 7.
- Spehlmann, R. (1981). Generalized epileptiform patterns. *EEG Primer*. B. J. Fisch. Amsterdam, Elsevier/North-Hollan Biomedical Press: 285-308.
- Steinlein, O., Sander, T., Stoodt, J., Kretz, R., Janz, D., Propping, P. (1997). "Possible association of a silent polymorphism in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 with common idiopathic generalized epilepsies." *Am J*

Med Genet **74**(4): 445-9.

- Steinlein, O. K. and T. J. Jentsch (1998). "KCNQ2, the first gene found to be mutated in human generalized idiopathic epilepsy." Pathol Biol (Paris) **46**(9): 683-4.
- Steinlein, O. K., Magnusson, A., Stoodt, J., Bertrand, S., Weiland, S., Berkovic, S.F., Nakken, N.O., Propping, P., Bertrand, D. (1997). "An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Hum Mol Genet **6**(6): 943-7.
- Steinlein, O. K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Philips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F.(1995). "A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Nat Genet **11**(2): 201-3.
- Steinlein, O. K., Stoodt, J., Biervert, C., Janz, D., Sander, T. (1999). "The voltage gated potassium channel KCNQ2 and idiopathic generalized epilepsy." Neuroreport **10**(6): 1163-6.
- Sugimoto, Y., Morita, R., Amano, K., Fong, C.Y., Shah, P.U., Castroviejo, I.P., Khan, S., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K. (2000). "Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map." Genomics **68**(3): 264-72.
- Suzuki, J. and Y. Nakamoto (1977). "Seizure patterns and electroencephalograms of E1 mouse." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **43**(3): 299-311.
- Szabo, C. A., Leland, M.M., Knape, K., Elliott, J.J., Haines, V., Williams, J.T. (2005). "Clinical and EEG phenotypes of epilepsy in the baboon (*Papio hamadryas* spp.)." Epilepsy Res **65**(1-2): 71-80.

T

- Tatum, W. O. t. and M. M. Stecker (1995). "Serial FDG-PET scans in a patient with partial status epilepticus." Epilepsia **36**(2): 214-5.
- Theodore, W. H., Kelley, K., Toczek, M.T., Gaillard, W.D. (2004). "Epilepsy duration, febrile seizures, and cerebral glucose metabolism." Epilepsia **45**(3): 276-9.
- Timpe, L. C. and L. Y. Jan (1987). "Gene dosage and complementation analysis of the Shaker locus in *Drosophila*." J Neurosci **7**(5): 1307-17.
- Travis, L. E. and A. Gottlob (1937). "How Consistent Are an Individual's Brain Potentials from Day to Day?" Science **85**(2200): 223-224.
- Treiman, D. M., Walton, N.Y., Kendrick, C. (1990). "A progressive sequence of electroencephalographic changes during generalized convulsive status epilepticus." Epilepsy Res **5**(1): 49-60.

U

V

- van Dis, H., Corner, M., Dapper, R., Hanewald, G., Kok, H. (1979). "Individual differences in the human electroencephalogram during quiet wakefulness." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **47**(1): 87-94.
- Vielhaber, S., Von Oertzen, J.H., Kudin, A.F., Schoenfeld, A., Menzel, C., Biersack, H.J., Kral, T., Elger, C.E., Kunz, W.S. (2003). "Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy." Epilepsia **44**(2): 193-9.
- Vogel, V., Sanchez, C., Jennum, P. (2002). "EEG measurements by means of radiotelemetry after intracerebroventricular (ICV) cannulation in rodents." J Neurosci Methods **118**(1): 89-96.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995). "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Res **23**(21): 4407-14.

W

- Wada, J. A., Terai, A., White, B., Jung, E. (1970). "Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility." Exp Neurol **28**(2): 326-32.
- Wang, X., Wang, T., Yuan, M.X., Liu, M.G., Wang, Q. (2005). "[Advances in the studies on the molecular and genetic aspects of epilepsy]." Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao **27**(3): 388-93.
- Watanabe, Y., Johnson, R.S., Butler, L.S., Binder, D.K., Spiegelman, B.M., Papaioannou, V.E., McNamara, J.O. (1996). "Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy." J Neurosci **16**(12): 3827-36.
- Waymire, K. G. Mahuren, J.D., Jaje, J.M., Guilarte, T.R., Coburn, S.P., MacGregor, G.R. (1995). "Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6." Nat Genet **11**(1): 45-51.
- White, L. E. and J. L. Price (1993). "The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. I. Patterns of 14C-2-deoxyglucose uptake and Fos immunocytochemistry." J Neurosci **13**(11): 4787-809.
- Whitlon, D. S. and H. M. Sobkowitz (1989). "GABA-like immunoreactivity in the cochlea of the developing mouse." J Neurocytol **18**(4): 505-18.
- Wickenden, A. D., Zou, A., Wagoner, P.K., Jegla, T. (2001). "Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells." Br J Pharmacol **132**(2): 381-4.
- Willott, J. F. and S. M. Lu (1980). "Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice." Exp Neurol **70**(2): 288-99.

X

- Xu, G. Q., Yamano, T., Shimada, M. (1994). "Copper distribution in fetus and placenta of the macular mutant mouse as a model of Menkes kinky hair disease." Biol Neonate **66**(5): 302-10.

Y

- Yates, G. K., Johnstone, B.M., Patuzzi, R.B., Robertson, D. (1992). "Mechanical preprocessing in the mammalian cochlea." Trends Neurosci **15**(2): 57-61.

Yus-Najera, E., Munoz, A., Salvador, N., Jensen, B.S., Rasmussen, H.B., Defelipe, J., Villarroel, A. (2003). "Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation." Neuroscience **120**(2): 353-64.

Z

Zara, F., Bianchi, A., Avanzini, G., Di Donato, S., Castellotti, B., Patel, P.I., Pandolfo, M. (1995). "Mapping of genes predisposing to idiopathic generalized epilepsy." Hum Mol Genet **4**(7): 1201-7.

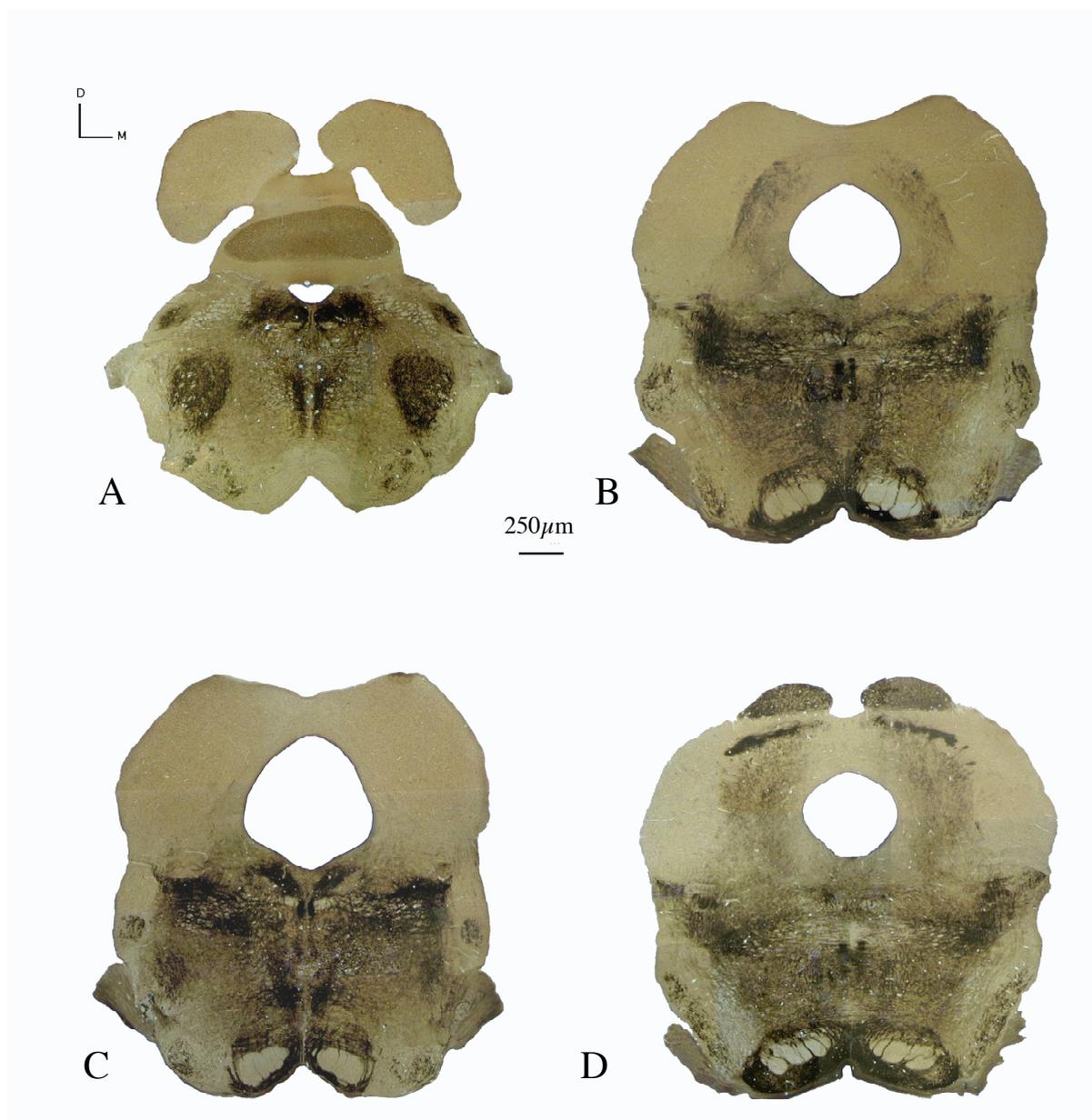
VIII. ANEXOS

<u>Agudos, focales simples</u>	<u>Tónico clónicos, generalizadas</u>	<u>Parciales complejos</u>
Convulsivantes tópicos <i>Penicilina</i> <i>Bicuculina</i> <i>Picrotoxina</i> <i>Estricnina</i> <i>Anticolinérgicos</i> <i>Otros</i>	Genéticas <i>Babuinos fotosensitivos</i> <i>Crisis audiógenas en roedores</i> <i>Ratones totterer y El</i> <i>Ratones modificados genet.</i> <i>Ratas (GEPR)</i> <i>Ratas WAR</i> <i>Gérbil mongol</i> <i>Drosofilas vibrantes</i>	Ácido kaínico Toxina tetánica Inyección en el área tempesta Estimulación repetida "Kindling" Rodajas de cerebro <i>Hipocampo de roedores</i> <i>Preparaciones celulares aisladas</i> <i>Tejidos cerebrales humanos</i>
Estimulación eléctrica Deplección de GABA Rodajas neocorticales	Electroshock máximo Convulsivantes químicos <i>Penilene tetrazol</i> <i>Bemegrade</i> <i>Picrotoxina</i> <i>Bicuculina</i> <i>Methionine sulfoximide</i> <i>Penicilina</i>	<u>Ausencia, generalizados</u> Estimulación talámica Focos bilaterales corticales Penicilina sistémica γ -hidroxibutirato Opiáceos intraventriculares
<u>Crónicos, focales simples</u>	Desórdenes metabólicos <i>Hipoxia</i> <i>Hipoglucemia</i> <i>Oxigenación hiperbárica</i> <i>Hipercarbia</i> <i>Uremia</i> <i>Deplección de drogas</i> <i>Altas temperaturas</i>	<u>Estatus epiléptico</u> Litio-pilocarpina Cobalto-homocistina Estimulación recurrente
Metales implantados <i>Hidróxido de Aluminio</i> <i>Cobalto</i> <i>Tungsteno</i> <i>Zinc</i> <i>Hierro</i>		
Daño criogénico Inyección de gangliósidos Epileptogénesis sist. focal		

I-. Modelos experimentales de epilepsia. Modificación de Fisher (1989)

<i>EcoRI</i> Adapters	
Eco-ad-5	5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'
Eco-ad-3	5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
<i>MseI</i> Adapters	
Mse-ad-5	5' GACGTAGAGTCCTGAG 3'
Mse-ad-3	5' TACTCAGGACTCAT 3'
Pre-amplification	
Eco-pre	5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
Mse-pre	5' GTAGAGTCCTGAGTAAC 3'
Selective Amplification	
<i>EcoRI</i> primers	
E32	5' GACTGCGTACCAATTCA AC 3'
E35	5' GACTGCGTACCAATTCA CA 3'
<i>MseI</i> primers	
M48	5' GTAGAGTCCTGAGTAAC AC 3'
M58	5' GTAGAGTCCTGAGTAAC GT 3'
M60	5' GTAGAGTCCTGAGTAAC TA 3'

II- Secuencias de los cebadores epleadas en el AFLP



III- Tinción histoquímica de la acetil-colinesterasa en secciones de hámster.

Secciones coronales de hámsters ordenadas caudo-rostralmente histoquímicamente procesadas para visualizar la acetil colinesterasa (Fuentes-Santamaría, 2001).

1. **Objetivo:** Teñir selectivamente diversas proteínas en cortes histológicos

2. **Procedimiento**

- a. Recoger las secciones cortadas en microtomo de congelación en series de 4 pocillos diferentes en TF.
- b. Lavado en TBS 0,05 M a pH 7,4, 3 x 5 minutos
- c. Eliminación de la peroxidasa endógena: solución TBS -Tritón X-100 a la que se añadió H₂O₂ al 0,5%, 5 minutos
- d. Lavado en TBS 0,05 M a pH 7,4, 3 x 5 minutos
- e. Bloqueo de la unión inespecífica de los anticuerpos, incubando en 4% de suero normal de cabra inactivado (NGS) en TBS -Tritón X-100 (#8603, Merck) al 0,5% durante 30 minutos
- f. Lavado en TBS 0,5 M a pH 7,4, 3 x 5 minutos
- g. Incubación con el anticuerpo primario durante 48-36 horas a 4° C, diluido en TBS-Tx 0,05 M, pH 7,4, con suero fetal de vaca (SFV) al 10%
- h. Lavado en TBS 0,5 M, pH 7,4, 3 x 5 minutos.
- i. Incubación con el anticuerpo secundario biotinado 2 h a tª ambiente, (dilución 1/200) en una solución TBS-Tx 0,05 M pH 7,4.
- j. Lavado en TBS 0,5 M , pH 7,4, 3 x 5 minutos.
- k. Incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (#PK-4000, Vectastain ABC Kit estándar), 90 minutos a tª ambiente, disuelto en TBS-Tx
- l. Lavado en TBS 0,5 M , pH 7,4, 3 x 5 minutos.
- m. Incubación entre 10 y 15 minutos en una solución de DAB 0,016% y H₂O₂ 0,006% en Tris HCl 0,05 M a pH 7,4
- n. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl a pH 7,4

Anticuerpos primarios:

1. Fos (# sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (producido en conejo): 1/2500 en TBS 0,05M +10% SFV (ó 5% leche en polvo) + 0,3% Tritón-Tx

Anticuerpos secundarios:

1. Anti IgG rabbit biotinado, 1/200 en TBS 0,1M + 10% SVF (ó 5% leche en polvo) + 0,3% Tritón-Tx, producido en cabra (BA-1000, Vector Labs)

IV- Procesamiento inmunohistoquímico seguido.

AnexoV: Datos de las pruebas de ABR

ID HAMSTER	EDAD (meses)	I	II	III	IV	V
CONTROL1	3	1,398	2,427	3,29	4,236	5,881
CONTROL2	3	1,398	2,55	3,044	4,318	6,128
CONTROL3	3	1,439	2,427	3,002	4,195	6,046
CONTROL4	3	1,275	2,303	2,756	3,825	5,347
CONTROL5	9	1,316	2,221	2,879	3,784	5,141
CONTROL6	9	1,398	2,468	2,961	4,154	5,635
CONTROL7	9	1,398	2,344	2,838	3,825	4,853
CONTROL8	9	1,398	2,18	2,838	3,784	4,565

ID HAMSTER	EDAD (meses)	I	II	III	IV	V
CONTROL1	3	1,357	2,385	3,249	4,195	5,758
CONTROL2	3	1,398	2,509	3,044	4,401	6,169
CONTROL3	3	1,398	2,427	3,002	4,277	5,799
CONTROL4	3	1,316	2,303	3,085	3,866	5,429
CONTROL5	9	1,357	2,262	2,673	3,784	4,935
CONTROL6	9	1,357	2,509	2,961	4,113	5,799
CONTROL7	9	1,275	2,385	2,797	3,989	4,853
CONTROL8	9	1,316	2,098	2,756	3,702	4,565

ID HAMSTER	EDAD (meses)	I	II	III	IV	V
2787	3	1,481	2,509	3,044	4,277	5,881
2788	3	1,398	2,262	2,961	3,907	5,306
2789	3	1,439	2,221	3,044	4,195	5,306
2790	3	1,357	2,18	3,044	3,948	5,552
2755	6	1,481	2,221	2,879	3,743	4,894
2756	6	1,481	2,303	3,249	3,866	5,676
2675	14	1,769	2,591	3,537	4,318	5,306

ID HAMSTER	EDAD	4	8	16	20	28	40
CONTROL 1	3 meses	45	45	55	60	60	70
CONTROL 2	3 meses	50	50	45	55	60	70
CONTROL 3	3 meses	45	45	55	60	60	70
CONTROL 4	3 meses	50	45	60	60	70	70
CONTROL 5	9 meses	40	40	60	70	70	70
CONTROL 6	9 meses	40	40	50	50	55	60
CONTROL 7	9 meses	45	50	50	55	60	60
CONTROL 8	9 meses	50	40	55	60	60	70

ID HAMSTER	EDAD	4	8	16	20	28	40
2787	3 meses	80	70	90	90	100	100
2788	3 meses	80	70	70	80	90	90
2789	3 meses	80	70	80	90	90	90
2790	3 meses	80	90	90	90	90	100
2754	9 meses	80	80	90	90	100	100
2755	9 meses	80	70	80	90	90	90
2756	9 meses	80	70	80	90	90	90
7552	3 meses	80	80	80	90	90	90
2675	14 meses	90	80	80	90	90	90
2677	14 meses	90	90	80	90	90	90
2778	14 meses	90	80	80	90	90	90
2779	14 meses	90	80	90	90	90	90

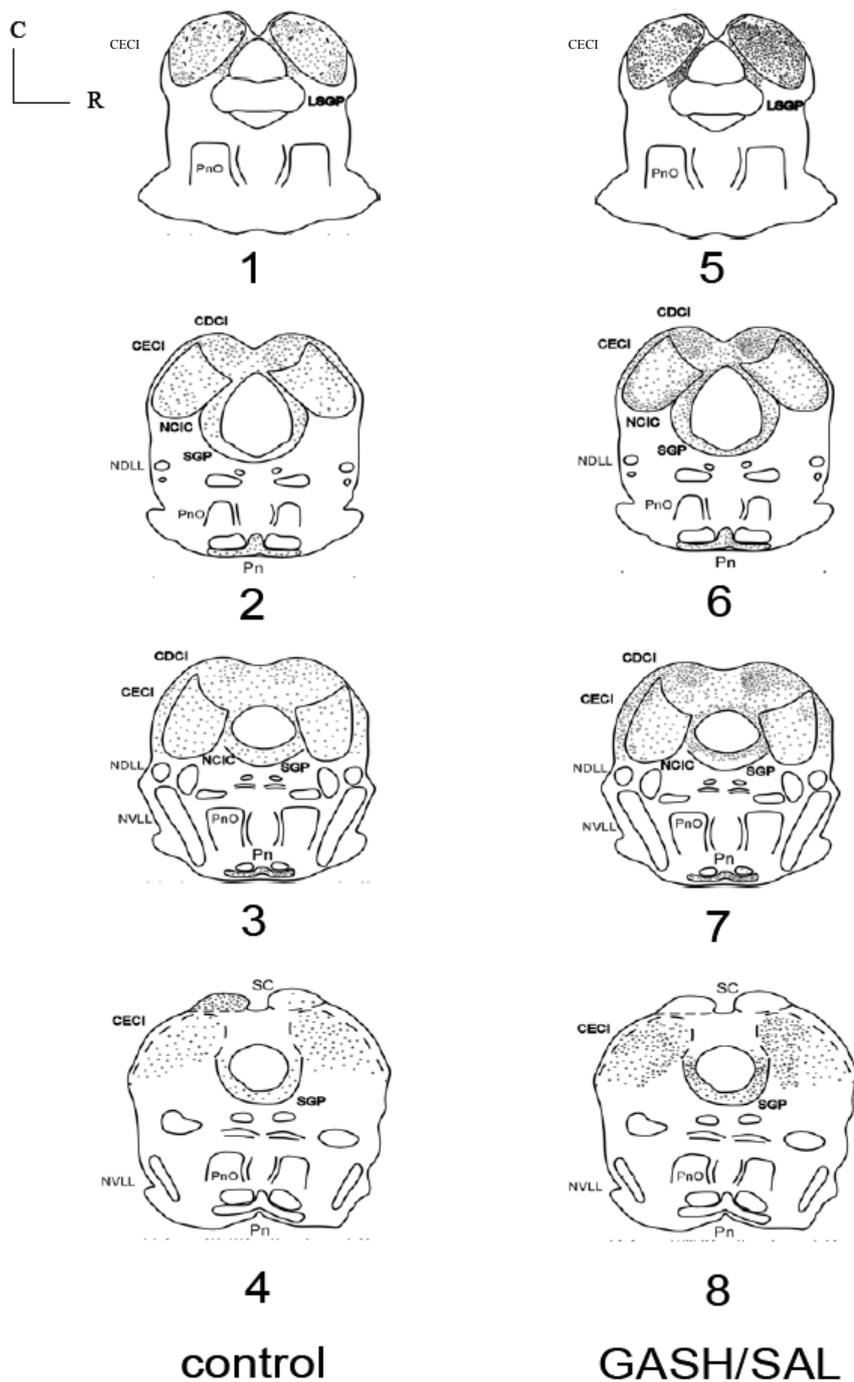


VI- Secciones coronales de hámsters GASH:Sal ordenadas caudo-rostralmente e histoquímicamente procesadas para visualizar proteína Fos tras crisis audiógenas. Mosaico realizado con fotos a 40X.Control 3D

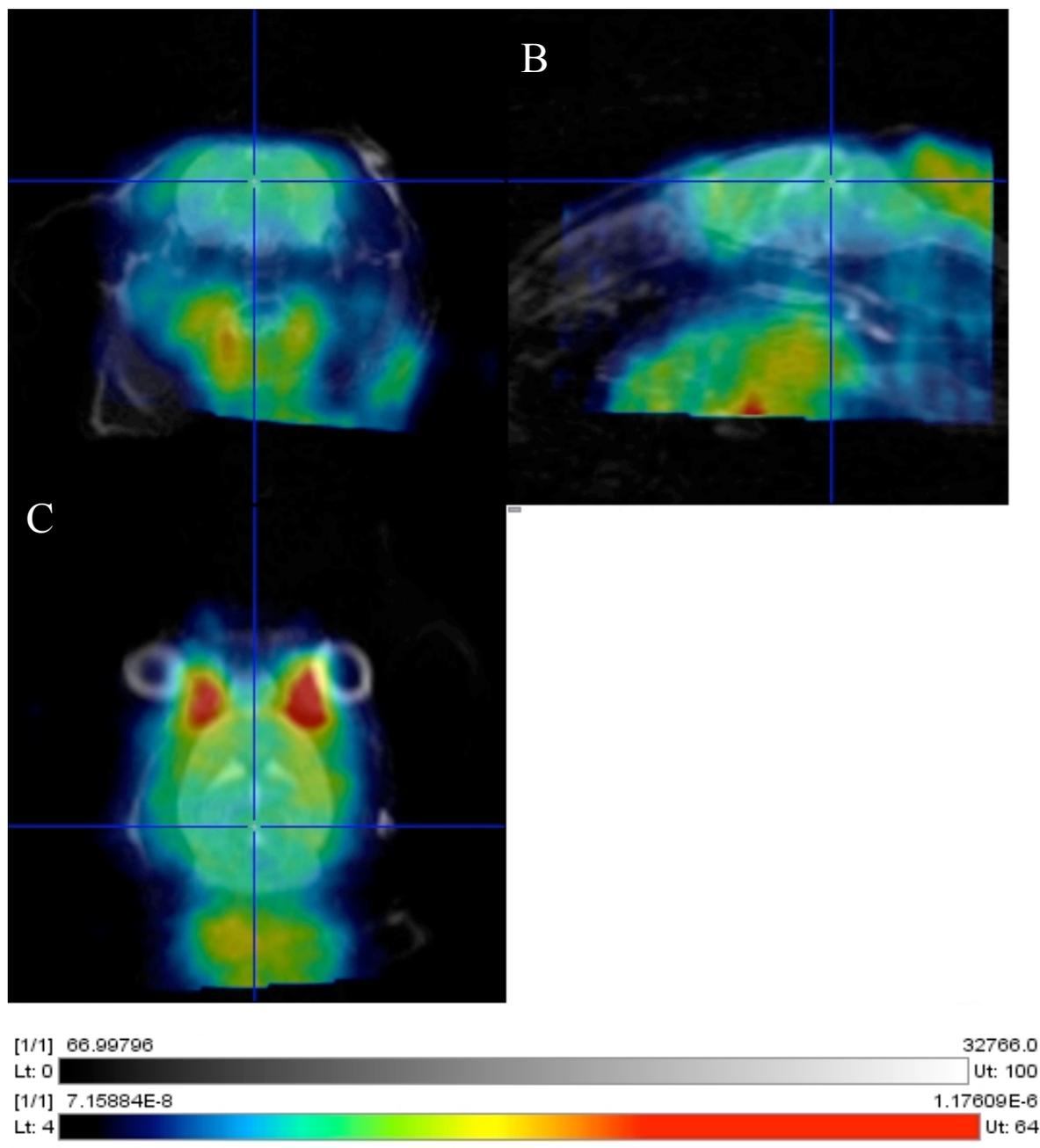
		sección	Area	Mean	StdDev	Min	Max	IntDen
control	referencia-1	fos control 7.tif	3966,00	0,20	0,08	0,03	0,67	0,78
		fos control 7.tif	43105,00	0,28	0,09	0,00	1151,00	12,13
	cortes nivel 1	fos control 7.tif	44663,00	0,27	0,11	0,01	1176,00	12,17
	média							12,15
	média tipificada							15,56
	referencia-2	fos control 8.tif	5061,00	0,15	0,06	0,01	0,55	0,74
		fos control 8.tif	53801,00	0,25	0,09	0,01	1176,00	13,36
	cortes nivel 2	fos control 8.tif	58343,00	0,23	0,08	0,01	1230,00	13,51
	média							13,44
	média tipificada							18,06
	referencia-3	fos control 9-1.tif	5746,00	0,10	0,05	0,00	0,56	0,55
		fos control 9-1.tif	56964,00	0,16	0,06	0,00	0,99	9,10
	cortes nivel 3	fos control 9-1.tif	49833,00	0,15	0,06	0,00	0,90	7,63
	média							8,36
média tipificada							15,26	
PAG	fos control 9-1.tif	57742,00	0,16	0,05	0,00	1128,00	9,20	
valor tipificado							16,78	
GASH:Sal	referencia-1	fos gash 9.tif	4606,00	0,07	0,05	0,00	0,47	0,34
		fos gash 9.tif	38121,00	0,27	0,13	0,00	1293,00	10,39
	cortes nivel 1	fos gash 9.tif	38897,00	0,29	0,14	0,00	1327,00	11,25
	média							10,82
	média tipificada							32,01
	referencia-2	fos gash 10.tif	4779,00	0,18	0,09	0,00	0,83	0,87
		fos gash 10.tif	45777,00	0,26	0,11	0,01	1128,00	12,09
	cortes nivel 2	fos gash 10.tif	50387,00	0,26	0,11	0,01	1151,00	12,83
	média							12,46
	média tipificada							14,27
	referencia-3	fos gash 11.tif	6484,00	0,19	0,09	0,00	0,77	0,68
		fos gash 11.tif	44564,00	0,23	0,10	0,00	1128,00	10,22
	cortes nivel 3	fos gash 11.tif	45773,00	0,21	0,10	0,00	1260,00	9,77
	média dos cortes							10,00
média tipificada							14,61	
PAG	fos gash 11.tif	52428,00	0,26	0,08	0,01	1128,00	13,39	
valor tipificado							19,57	

VII- Caso típico de la valoración densitométrica de la inmunotinción.

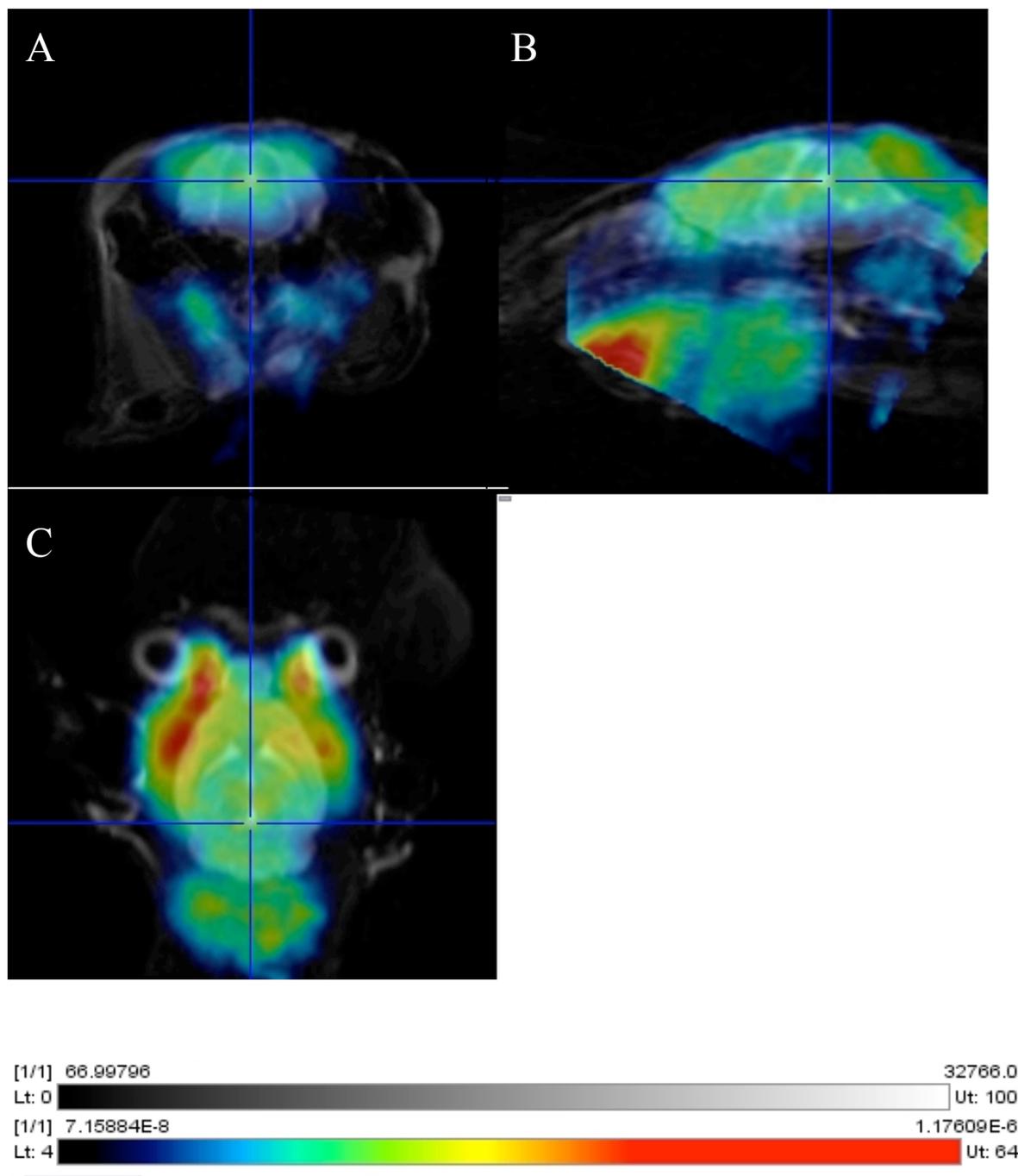
Densidad óptica obtenida y densidad óptica integrada (en negrita). La normalización de hizo con referencia a una estructura no inmunoteñida, el pedúnculo cerebelar medio. Abreviaturas: PAG- sustancia gris periacueductal



VIII- Comparación en expresión y densidad de cortes homólogos entre controles y GASH/Sal). Los cortes están en dirección del corte más caudal (arriba) a rostral como indica la flecha. Se Colículo inferior (**CDCI**), corteza externa del Colículo inferior (**CECI**), Núcleo central del Colículo inferior (**NCIC**); región de la sustancia gris periaqueductal (**SGP**), subregión Latera de la sustancia gris periaqueductal (**LSGP**); núcleo dorsal del lemnisco lateral (**NDLL**), núcleo ventral de lemnisco lateral (**NVLL**), Núcleo pontino reticular (**PnO**), el núcleo pontino (**Pn**) y la región del Colículo superior. Cada punto que aparece como marcaje representa 10 puntos de los marcajes originales en los cortes estudiados. (Barrios, 2008)



IX- Imágenes micro-PET de una reconstrucción tridimensional de los cortes coronales (A), sagitales (B) y horizontales (C) del cerebro de un hámster control en ayuno, 45 minutos después de la administración de una dosis vía intraperitoneal de 14.79 MBq de ^{18}F -FDG. Los animales fueron sometidos a una estimulación auditiva 15 minutos después de la administración del radiotrazador.



X- Imágenes micro-PET de una reconstrucción tridimensional de los cortes coronales (A), sagitales (B) y horizontales (C) del cerebro de un hámster GASH: Sal en ayuno, 45 minutos después de la administración de una dosis vía intraperitoneal de 14.79 MBq de ^{18}F -FDG. Los animales fueron sometidos A una estimulación auditiva 15 minutos después de la administración del radiotrazador.