

Efecto de las crisis repetitivas en el modelo experimental de epilepsia GASH:Sal

Tesis Doctoral

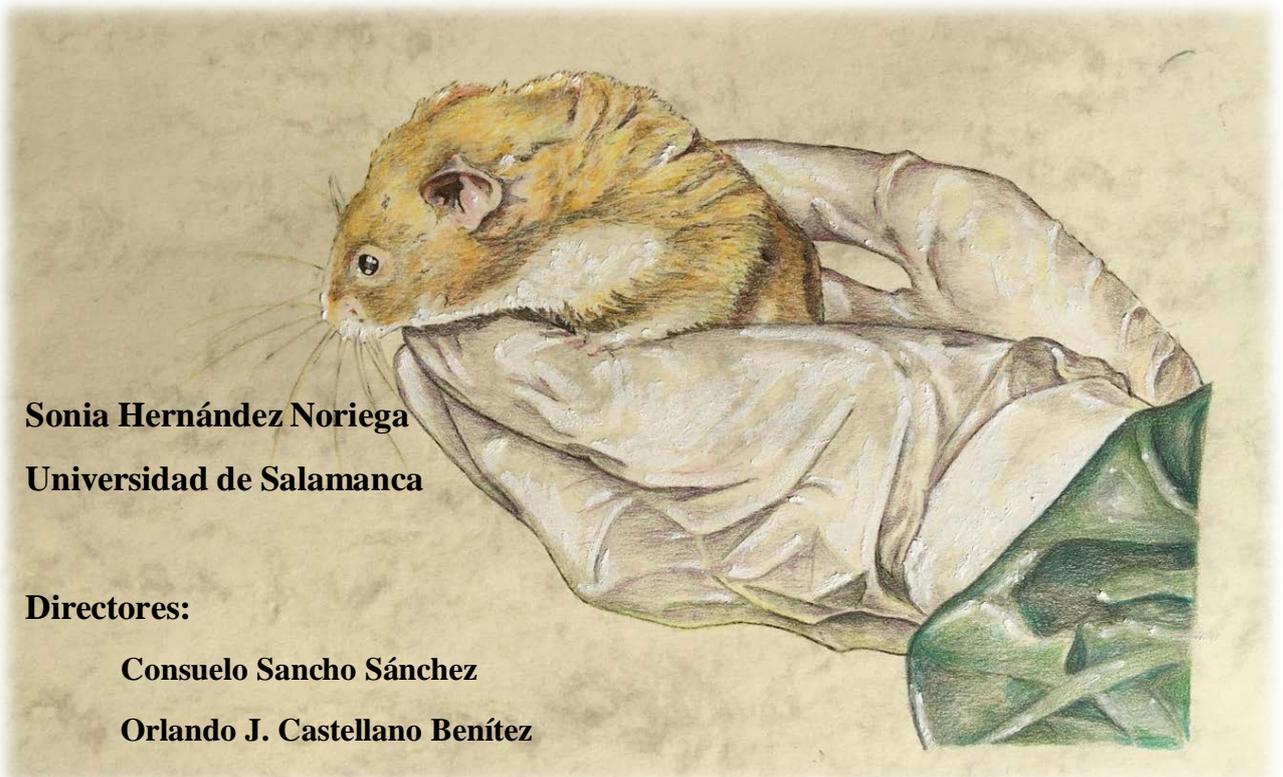
2017

Sonia Hernández Noriega
Universidad de Salamanca

Directores:

Consuelo Sancho Sánchez

Orlando J. Castellano Benítez





INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de Trastornos Audiomotores

Efecto de las crisis repetitivas en el modelo experimental de epilepsia GASH:Sal.

Memoria presentada por Sonia Hernández Noriega para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Directores:

Consuelo Sancho Sánchez

Orlando J. Castellano Benítez

Salamanca, 2017



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Los abajo firmantes, Drs. Dña Consuelo Sancho Sánchez y D. Orlando J. Castellano Benítez, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**Efecto de las crisis repetitivas en el modelo experimental de epilepsia GASH:Sal**”, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Sonia Hernández Noriega, y 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, a 13 de Julio de 2017.

Fdo.:

Dra. Consuelo Sancho Sánchez

Fdo.:

D. Orlando J. Castellano Benítez

Este trabajo ha sido subvencionado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Programa ERIDI 2007-2013) cofinanciado por el Fondo Social Europeo (Operational Programme ESF Castilla y León 2007-2013).

Subvencionado en parte también por el programa para la Promoción de la investigación bilateral USP/USAL (Proyecto #2011.1.23386.1.3) y Programas de apoyo a la Investigación de la Universidad de Salamanca (GIR) durante los años 2014, 2015 y 2016.



ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	15
ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	11
1. JUSTIFICACIÓN	17
2. INTRODUCCIÓN	21
2.1. La epilepsia	23
2.2. Modelos animales de epilepsia	26
2.2.1. Modelos de epilepsias reflejas de origen audiógeno	28
2.3. El modelo GASH:Sal	28
2.3.1. Clínica de las crisis	29
2.3.2. Sustrato anatómico de las crisis convulsivas audiógenas	29
2.4. Concepto de kindling	32
2.5. Reclutamiento neuronal	32
2.6. Indicadores comportamentales y fisiológicos de estrés	33
2.7. Apoptosis y neurogénesis tras el kindling	35
2.8. Estado glial tras el kindling	41
2.8.1. ¿Cómo ocurre la gliosis reactiva?	43
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
3.1. Hipótesis	47
3.2. Objetivos	47
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	53
5.1. Animales de experimentación	55
5.2. Estímulo sonoro y kindling audiogénico	56
5.3. Estudio neuroetológico	57
5.3.1. Adquisición de imágenes y evaluación comportamental	57
5.3.2. Evaluación de los índices de severidad	58
5.4. Indicadores comportamentales y fisiológicos de estrés	60
5.4.1. Prueba de campo abierto	60
5.4.2. Determinación de los niveles de glucocorticoides en sangre	61
5.5. Reclutamiento neuronal	62
5.5.1. Extracción y procesamiento de las muestras cerebrales	62

5.5.2. Protocolo de inmunotinción _____	63
5.5.3. Análisis cualitativo de expresión de c-fos _____	63
5.5.4. Análisis cuantitativo de la expresión de c-fos _____	64
5.6. Estudio de neurodegeneración _____	65
5.6.1. Técnica de NISSL _____	65
5.6.2. Demostración inmunocitoquímica de caspasa-3 activa _____	65
5.7. Evaluación de la neurogénesis _____	66
5.8. Estudio de la población glial _____	66
6. RESULTADOS _____	69
6.1. Estudio neuroetológico de las crisis convulsivas repetitivas en los grupos de estudio _____	71
6.1.1. Estudio de la primera crisis convulsiva en el GASH:Sal _____	71
6.1.2. Estudio neuroetológico tras la primera estimulación sonora en controles _____	71
6.1.3. Estudio neuroetológico del kindling en el GASH:Sal _____	72
6.1.4. Diferenciación de dos grupos de hámsteres GASH:Sal según su comportamiento durante el kindling _____	77
6.1.5. Estudio neuroetológico del hámster control durante el kindling _____	79
6.1.6. Análisis de los índices de severidad durante el kindling _____	81
6.1.7. Análisis de las latencias durante el kindling. _____	84
6.2. Prueba de Campo abierto _____	86
6.3. Marcadores bioquímicos de estrés _____	94
6.4. Marcadores hematológicos _____	95
6.5. Activación neuronal _____	97
6.5.1. Colículo Inferior _____	98
6.5.2. Locus Coeruleus _____	100
6.5.3. Sustancia Gris Periacueductal _____	101
6.5.4. Hipocampo _____	104
6.5.5. Núcleo Hipotalámico Periventricular _____	107
6.5.6. Complejo Amigdalino _____	109
6.5.6.1. Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal _____	109
6.5.6.2. Núcleo Basolateral Amigdalino _____	111
6.5.7. Todos los núcleos en conjunto _____	113
6.6. Neurodegeneración: Distribución de caspasa-3-activa en el cerebro del GASH:Sal	
115	

6.6.1. Colículo inferior y sustancia gris periacueductal	116
6.6.2. Hipocampo	120
6.7. Datos preliminares de neurogénesis en el GASH:Sal kindling	122
6.8. Estado de la población glial	123
6.8.1. Colículo Inferior	123
6.8.2. Hipocampo	125
7. DISCUSIÓN	127
7.1. Discusión metodológica	129
a) Protocolo de kindling audiógeno	129
b) Protocolos de extracción de sangre	131
c) Neurodegeneración: análisis de la Caspasa-3-activa	132
d) Gliosis	132
7.2 Discusión de los resultados	133
a)Comportamiento durante las estimulaciones sonoras: grupos de respuesta	133
b)Activación neuronal durante el kindling	134
c)Estrés: Campo abierto y parámetros fisiológicos	142
Comportamiento en la prueba de campo abierto	142
d)Neurodegeneración: análisis de la expresión de caspasa-3-activa	145
e)Gliosis reactiva	147
f)Heterogeneidad de la línea GASH:Sal	149
g)Futuras líneas de investigación en el GASH:Sal	150
8. CONCLUSIONES	153
9. BIBLIOGRAFÍA	157
11. ANEXOS	199
Anexo 1: Diccionario de comportamientos	201
Anexo 2: Protocolo de inmunotinción para c-fos, GFAP y caspasa-3-activa.	205
Solución ABC (Prepararlo al menos 30 minutos antes de utilizarlo)	207
Anexo 3: Protocolo de tinción de NISSL	208
Anexo 4: Protocolo para la demostración de NeuN y Ki67	209
Anexo 5: Tablas de parámetros de Campo abierto	211
Anexo 6: Tabla de parámetros hematológicos	213
Anexo 7: Artículo	214



AGRADECIMIENTOS

Durante el final de una tesis te das cuenta del apoyo que has tenido a lo largo de todos estos años. Y sé que he sido muy afortunada por contar con tanta gente...

Agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, **Consuelo Sancho Sánchez**, por su optimismo y energía, por sus ánimos cuando no lo veía tan claro y facilitarme la tarea, y a **Orlando Castellano Benítez**, por mostrarme que por muy en contra que se pongan las cosas, es posible alcanzar lo que te propones. A la directora de Laboratorio 12, **Dolores E. López, Lita**, por recibirme hace 6 años en su segundo hogar y haberlo convertido en el de todos; por cuidarnos durante estos años y no darse nunca por vencida con nosotros. A **Richard**, por sus consejos, el mejor estímulo que puede recibirse; a **Luis**, por sus ideas e iniciativas, por ser capaz de alegrarte el día y su enorme disponibilidad para cualquier experimento, duda o problema con los animales. Por supuesto, al resto de compañeros del Lab12 que ya no están por haberme formado cuando llegué, por las conversaciones y el tiempo compartido. A **Marisán** por su manera de enfocar y resolver los baches y su contagioso buen humor; a **Inés**, por atender mis dudas en todo lo relativo al estrés; a **Juan Carro**, por sus clases particulares de bioestadística. A mis muchachos del "Distrito Doce" (el **tito Masa, Ana, Belén** y **David**) porque sus locuras y sus ocurrencias hacían del laboratorio un sitio un poquito mejor. A **David**, que ha sido mi compañero en esta aventura desde que empezó el máster, modificador oficial de cualquier imagen (por complicada que sea) y organizador de todos y cada uno de los cafés entre ordenadores y experimentos, gracias por las conversaciones de las que poder sacar nuevas ideas... o simplemente fuerzas renovadas, gracias por tu apoyo, tiempo y amistad, has conseguido que cuatro años de tesis se queden cortos. A **Belén**, quien marcó un nuevo comienzo durante sus prácticas, dejando una huella imborrable entre portas y pipetas. A **Nicole**, cuya entrega es impresionante, por llegar al laboratorio para contagiarnos su idioma y alegría a todos, porque a pesar de la distancia, sigues siendo un gran apoyo. A **Nora**, que durante unos meses fue mis manos y mis ojos, mis energías; por impulsar un proyecto que necesitaba ser impulsado, cuando más lo necesitaba. Gracias por tus ganas de aprender y tu grandísima disposición; gracias también por todo lo que he aprendido contigo.

Al resto de profesionales del INCyL y la Universidad por colaborar, aconsejar y apoyar en las distintas etapas de la tesis. Al Laboratorio 4, por suponer un lugar de abastecimiento, tanto de material como de ideas. Al Laboratorio 3, por su apoyo logístico y resolución de dudas en los experimentos

comportamentales, y por supuesto a **David** y resto del Laboratorio 7 por tener el tiempo y la ilusión para echar una mano siempre que hiciera falta. A los vecinos del Laboratorio 13, por romper la rutina y demostrarme su apoyo. A **Javi Herrero**, a **Ana** (Lab. 11), **Telmo** y **Mamen** (CIC) por haberme facilitado el trabajo en muchísimos aspectos. A **César** y su equipo, por su amabilidad y rapidez con los datos cuando tantas ganas tienes de saber qué ha salido. A **Mamen**, que con sus visitas permitía desconectar. Al equipo de Brasil, coordinado por **Norberto**, en especial a **Jose Antonio**, por su resolución “on-line” de las dudas que iban surgiendo con los etogramas.

A **Nacho**, por ser un estupendo referente durante la carrera y un mejor guía y amigo al finalizarla; por las cañas y los cafés hablando de investigación, por los buenos consejos y las conversaciones que se pasaban volando...

A mi **Sarita**, mi pequeña, que siempre ha estado a mi lado, aunque un océano nos separase. Ha compartido mis “victorias” y ha tenido las palabras oportunas para que los momentos de “derrota” fuesen más llevaderos. Porque pese a la distancia, nunca ha estado lejos.

A **Sire**, por hacerme sonreír en todas y cada una de nuestras conversaciones, entenderme tanto y querernos así pese a vernos tan poco (y estar tan cerca); a **Mari Jose**, **Chema**, **Jenny**, **Mon** y **Rebe** por estar pendientes y animarme especialmente en esta recta final, por los cafés que nos quedan. A **Laura**, por aparecer en el tramo final y no dejar de apoyarme; porque compartir malas experiencias une, y nos hemos dado cuenta de que tenemos unas cuantas en común.

A ti, por obligarme a sacar fuerzas de donde no creía que hubiera y por confiar ciegamente en que lo iba a lograr incluso los días que ni yo misma lo creía.

A mis padres, por la educación que me han dado, donde la constancia y el esfuerzo eran la base de todos los logros; en especial, a mi **madre**, por haberse convertido en un pilar con quien compartir cada paso de este proyecto (por cada llamada en la que me recordaba que podía lograrlo durante todos estos días) y por ser un ejemplo de valor, optimismo, energía y coraje. Nos has inculcado algo valiosísimo, que la verdadera victoria está en volver a levantarse y seguir sonriendo. Gracias a mis **hermanos** y mi **padre** también, por compartir mis sesiones monotema en esta última etapa, en la que parecía que no sabía hablar de otra cosa... Y al resto de mi amplísima familia (también a la familia por extensión) por ser un oasis de buenos momentos. A mi **premah**, por su genial dibujo de la contraportada

y su traducción simultánea (libro incluido de "Sitúa tus comas"). Por supuesto, gracias a todos los que habéis participado en las ilustraciones de la tesis; me hacía una ilusión bárbara.

Por último, a los hámsteres que han hecho posible esta tesis, en especial a Boricua, Curruscusqueto y Churrusqui. Gracias también a Nora por bautizarlos a (casi) todos.

Durante el final de una tesis te das cuenta también de que es posible hacer lo que te gusta, como te gusta y de alcanzar aquello que te propongas, aunque a veces se vea muy difícil. "Cualquier cosa es posible; y no debemos perder ese espíritu; porque cuando un obstáculo aparece en nuestro camino, está por una razón, no para detenernos, sino para mostrarnos cuánto queremos conseguir realmente algo."

“Si tenéis el hábito de tomar las cosas con alegría, rara vez os encontraréis en circunstancias difíciles.”



ABREVIATURAS

ABC – Complejo Avidina-Biotina Peroxidasa	GC – Glucocorticoides
ACTH - Hormona Adrenocorticotropa	GFAP – Proteína Fibrilar Acídica de la Glía
ADN – Ácido Desoxirribonucleico	GH – Hormona del Crecimiento
AMG – Amígdala	GHRH – Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento
ARNm – Ácido Ribonucleico mensajero	GPG/Vall – Genetically Epilepsy.Prone Hamster Valladolid
ATP – Adenosin Trifosfato	GS – Enzima Glutamina Sintetasa
AVCN – Núcleo coclear ventral anterior	H₂O₂ – Agua Oxigenada
AVP – Arginina Vasopresina	HCl – Ácido Clorhídrico
BLP/BLA – Núcleo Basolateral Amigdalino (anterior-posterior)	HPLC – Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
CA1 (2 y 3) – Cornu Ammonis 1 (2 y 3)	HYP – Hipocampo
CB1 – Receptor Cannabinoide 1	IC – Colículo Inferior
CCAs – Crisis Convulsivas Audiógenas	IEGs – Genes de Respuesta Temprana
CDIC – Corteza Dorsal del Colículo Inferio	IL – Índice Límbico
CEIC – Corteza Externa del Colículo Inferior	IL-1 – Interleuquina 1
CHCM – Concentración de hemoglobina corpuscular media	ILAE – International League Against Epilepsy
CN – Núcleo Coclear	INCyL – Instituto de Neurociencias de Castilla y León
COX-2 – Ciclooxygenasa 2	ISc – Índice Mesencefálico
CRH – Hormona liberadora de corticotropina	iNOS – Óxido Nítrico Sintasa inducible
DAB - Diaminobencidina	LC – Locus Coeruleus
DAPI – 4', 6-diamino-2-fenilindol	ll – Núcleo del Lemnisco Lateral
dB – Decibelios	LTP – Long Term Potentiation
DG – Giro Dentado	MePD – Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal
EDTA – Ethylenediaminetetra Acetato	MGB – Cuerpo Geniculado Medial
EEG – Electroencefalografía	mm² – milímetro cuadrado
eHHA – Eje Hipotálamo-hipófisis	NaCl – Cloruro Sódico
FEpi – Raza de pollos Fayoumi	NCIC – Núcleo Central del Colículo Inferior
GABA – Ácido Gamma Aminobutírico	NOS – Óxido Nítrico Sintasa
GASH:Sal – Genetic Audiogenic Seizure Hamster (Salamanca)	PAG – Sustancia Gris Periacueductal
GEPR – Rata Genéticamente Propensa a la epilepsia	

PB – Tampón Fosfato

PBS – Tampón Fosfato Salino

PDW – Volumen Plaquetario

Pe – Núcleo Hipotalámico Periventricular

PET – Tomografía por Emisión de Positrones

PF – Paraformaldehido

PRF – Formación Reticular Pontina

PTZ – Pentilentetrazol

RM – Resonancia Magnética

RMf – Resonancia Magnética funcional

SBF – Suero Bobino Fetal

SC – Colículo Superior

SEA – Servicio de Experimentación Animal

SEM – Error Estándar de la Media

SGZ – Zona Subgranular del Hipocampo

SNC – Sistema Nervioso Central

SNR – Sustancia Nigra Reticular

SOC – Complejo Olivar Superior

SPECT – Tomografía por Emisión de Fotón Simple

SVZ – Zona Subventricular del Hipocampo

TBS – Trizma Base Salino

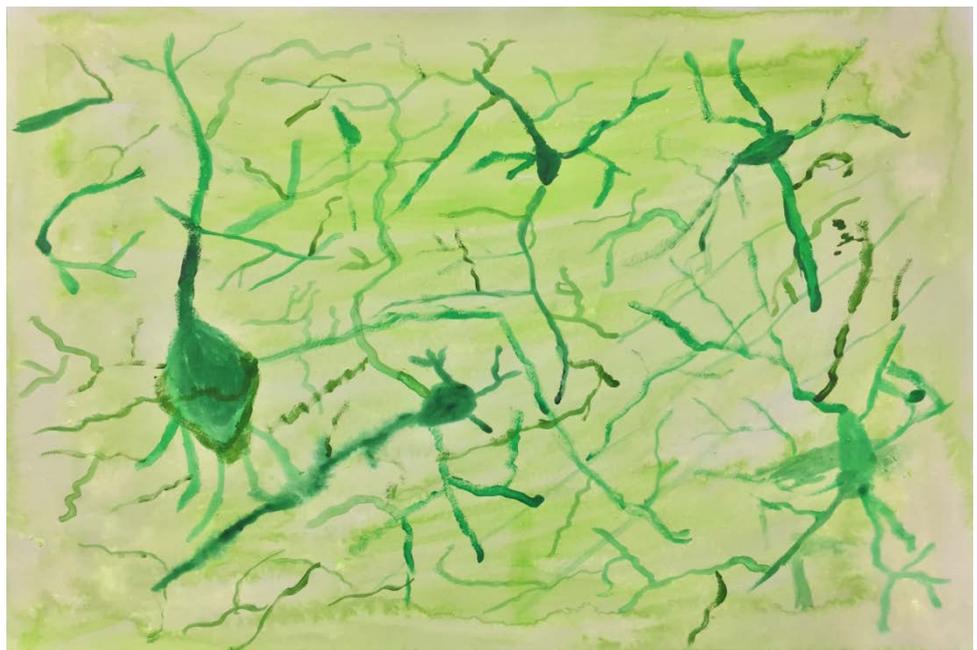
TLE – Epilepsia del Lóbulo Temporal

Tx – Tritón

USAL – Universidad de Salamanca

VCM – Volumen Corpuscular Medio

WAR – Rata Wistar Audiogénica



LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

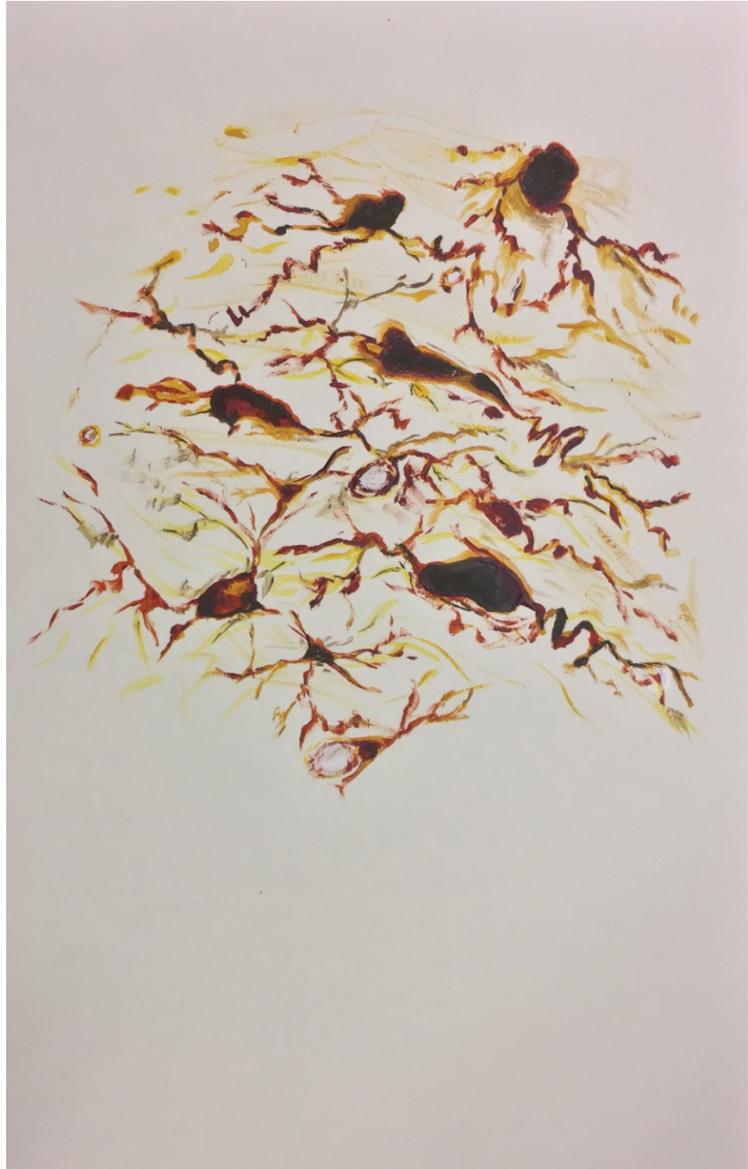
Núm.	Título	Pág.
1	Tipos de elementos que se pueden identificar en el EEG de una persona diagnosticada de epilepsia	25
2	Esquema general de los modelos de epilepsia y crisis epilépticas	27
3	Diagrama esquemático de los núcleos críticos implicados en los estados convulsivos audiogénicos y los comportamientos que subyacen a la crisis	31
4	Esquema de corte transversal del eje hipotálamo – hipofisario	35
5	Esquema que ilustra la regulación de la vía de liberación de glucocorticoides tras el estímulo estresor percibido	35
6	Concentración de cortisol y corticosterona en machos de hámster sirio	36
7	Estructura tridimensional de la proteína caspasa-3 en su conformación activa	38
8	Representación esquemática de las vías apoptóticas de mayor relevancia	39
9	Esquema del Giro Dentado del Hipocampo de un roedor	40
10	Identificación de áreas de formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto	41
11	Esquema de los eventos celulares asociados a daño, enfermedad, lesión o tóxicos que inducen la gliosis en el sistema nervioso central	45
12	Esquema del diseño experimental llevado a cabo	53
13	Material utilizado para la estimulación y grabaciones de las crisis	58
14	Esquema representativo de los aspectos gráficos y estadísticos que permite evaluar el sistema ETHOMATIC como resultado de los comportamientos observados	59
15	Fotografía del aparato usado para la realización de la prueba de Campo Abierto	62
16	Ejemplo de la sección Bregma – 2.9 mm, correspondiente a un hámster GASH:Sal sometido a una estimulación; tras el tratamiento de imagen en el ImageJ para la obtención del gradiente de color	66
17	Etograma donde se muestran los resultados de la primera crisis audiogénica del GASH:Sal	73
18	Etograma donde se muestran los resultados de la primera estimulación del Grupo de animales control	74
19	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal durante las 20 estimulaciones más la estimulación rebote del protocolo de kindling	77-79
20	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los hámsteres GASH:Sal, en las estimulaciones 1ª, 5ª, 10ª, 15ª y 20ª, agrupados según la presencia [Subgrupo A (izquierda)] o no [Subgrupo B (derecha)] de crisis durante el protocolo de kindling	80-81
21	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los hámsteres del Grupo control durante la 1ª, 5ª, 10ª, 15ª y 20ª estimulación (N=7)	83
22	Gráfica donde se muestra la evolución de los índices mesencefálico y límbico en las crisis de los animales GASH:Sal durante el kindling	84
23	Valores de los índices de severidad mesencefálico y límbico de los animales del subgrupo A	85
24	Valores de los índices de severidad mesencefálico y límbico del subgrupo B	85
25	Latencias observadas en el GASH:Sal kindling ante los comportamientos de Carrera salvaje, Convulsión tónica y Emprostotonus	87
26	Latencias de la Carrera salvaje, Convulsión tónica y Emprostotonus durante el kindling audiogénico en los subgrupos A y B del hámster GASH:Sal	88
27	Valores del comportamiento acicalamiento durante el 1 ^{er} día de estimulación	93
28	Valores del comportamiento escudriñar durante el 1 ^{er} día de estimulación	93
29	Valores de distancia total recorrida durante el 5º día de estimulación en los distintos grupos de estudio	94
30	Valores de velocidad media de desplazamiento de los diferentes grupos de animales durante el 5º día de estimulación	94
31	Valores de tiempo móvil durante el 5º día de estimulación	95
32	Valores de latencia de salida del inicio durante el 5º día de estimulación	95
33	Valores de número de acicalamientos durante el 5º día de estimulación	93
34	Número de comportamientos “escudriñar” durante el 5º día de estimulación	93
35	Valores de distancia total recorrida durante el 10º día de estimulación	94
36	Valores de velocidad media observados en los diferentes grupos de estudio durante el 10º día de estimulación acústica	94

37	Valores de tiempo móvil de los animales de los diferentes grupos de estudio durante el 10° día de estimulación	95
38	Valores de latencia de la primera salida del inicio el 10° día de estimulación	95
39	Valores de acicalamiento mostrado por los integrantes de cada grupo experimental durante el 10° día de estimulación acústica	94
40	Valores de escudriñar en los diferentes grupos de estudio durante el 10° día de estimulación	95
41	Niveles de cortisol en sangre observados en los diferentes grupos de estudio durante el 5° día de aplicación del protocolo de kindling audiogenico	97
42	Niveles de cortisol en sangre detectado en los grupos de estudio al 10° día de kindling audiogénico	97
43	Niveles de volumen corpuscular medio en los diferentes grupos de estudio	98
44	Concentración de hemoglobina corpuscular media en los diferentes grupos de estudio	99
45	Valores de amplitud de distribución del tamaño plaquetario obtenido en los animales de los diferentes grupos de estudio	99
46	Número total de linfocitos en sangre en los animales de los diferentes grupos de estudio	100
47	Valores de eosinófilos encontrados en los grupos de experimentales	100
48	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes al núcleo Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio	101
49	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio	101
50	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Colículo Inferior de los grupos estudiados	102
51	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes al núcleo Locus Coeruleus en los cuatro grupos de estudio	104
52	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Locus Coeruleus en los cuatro grupos de estudio	104
53	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Locus Coeruleus de los grupos estudiados	104
54	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes a la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio	106
55	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio	106
56	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en la Sustancia Gris Periacueductal de los grupos estudiados	106
57	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio	109
58	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Hipocampo en los cuatro grupos de estudio	109
59	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Hipocampo de los grupos estudiados	109
60	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes al Núcleo Hipotalámico Periventricular en los cuatro grupos de estudio	112
6	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Núcleo Hipotalámico Periventricular en los cuatro grupos de estudio	112
62	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Hipotalámico Periventricular de los grupos estudiados	112
63	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes al Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal en los cuatro grupos de estudio	114
64	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal en los cuatro grupos de estudio	114
65	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal de los grupos estudiados	114
66	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas	116

	correspondientes al Núcleo Basolateral Amigdalino en los cuatro grupos de estudio	
67	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el Núcleo Basolateral Amigdalino en los cuatro grupos de estudio	116
68	Valores de densidad de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Basolateral Amigdalino de los grupos estudiados	116
69	Valores de las densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas correspondientes a cada núcleo analizado en los cuatro grupos de estudio	118
70	Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas <i>c-fos</i> inmunorreactivas en el conjunto de núcleos analizados en los cuatro grupos de estudio	119
71	Doble tinción de caspasa-3 activa y Nissl en el Colículo Inferior (imagen superior) y en el Hipocampo (imagen inferior)	120
72	Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción de caspasa-3 activa correspondientes al Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio	120
73	Valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunoreactivas en las tres regiones estudiadas en el Colículo Inferior: Corteza Dorsal (CDIC), Núcleo Central (NCIC) y Corteza Externa (CEIC)	121
74	Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción de caspasa-3 activa correspondientes a la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio	121
75	Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción de caspasa-3 activa correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio	124
76	Valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunoreactivas en las tres regiones estudiadas en el Hipocampo: Cornu Ammonis 1 (CA1), Cornu Ammonis 2 (CA2) y Cornu Ammonis 3 (CA3)	124
77	Microfotografía de la zona subgranular del giro dentado hipocampal seleccionada de la sección de un animal perteneciente al subgrupo A de GASH:Sal kindling	127
78	Valores del marcaje de células GFAP inmunoteñidas correspondientes al Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio	127
79	Valores del marcaje de células GFAP inmunoteñidas en las tres secciones caudo-rostrales estudiadas en el Colículo Inferior	128
80	Valores del marcaje de células GFAP inmunoteñidas correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio	130
81	Valores del marcaje de células GFAP inmunoteñidas en las tres secciones caudo-rostrales estudiadas en el Hipocampo	130

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Resumen de los grupos experimentales utilizados en este trabajo, protocolo de estimulación al que se someten y número de muestra de hámsteres usados en cada grupo	57
2 y 3	Índices de Severidad Mesencefálica categorizado (ISc) y de Severidad Límbica (IL)	60 y 61
4	Relación de anticuerpos usados en las reacciones inmunohistoquímicas	69
5	Valores de latencias de carrera salvaje, convulsión tónica e hiperextensión de la pata anterior durante la 1ª y la 20ª estimulación de kindling	86
6	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo inferior. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas	103
7	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales del troncoencéfalo conteniendo el Locus coeruleus	105
8	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales de la sustancia gris periacueductal	107-108
9	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales del hipocampo	110-111
10	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales del Núcleo Hipotalámico Periventricular.	113
11	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales del Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal	115
12	Inmunotinción de <i>c-fos</i> en secciones coronales del Núcleo Basolateral Amigdalino.	117
13	Inmunotinción de caspasa-3 activa en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo Inferior y Sustancia Gris Periacueductal.	122-123
14	Inmunotinción de caspasa-3 activa en secciones coronales del Hipocampo. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas	125-126
15	Inmunotinción de GFAP en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo Inferior	129
16	Inmunotinción de GFAP en secciones coronales del Giro Dentado del Hipocampo. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas	131



1. JUSTIFICACIÓN

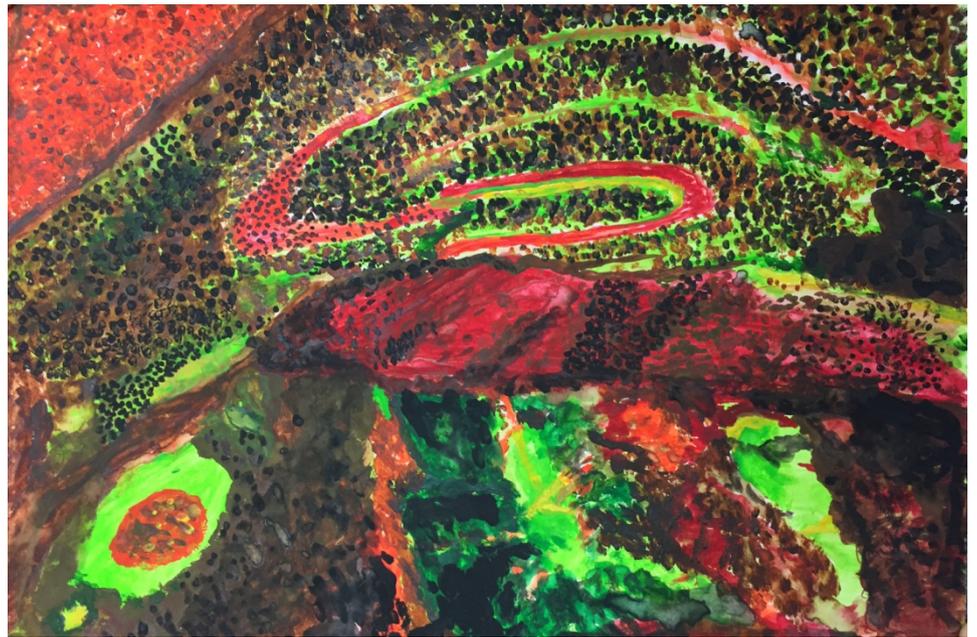
La epilepsia afecta aproximadamente al uno por ciento de la población mundial, constituyendo un importante problema de salud pública. En la generalidad de los casos se presenta en forma de crisis convulsivas reiteradas, debido a episodios repentinos y transitorios de descargas anormales y sincrónicas de un área determinada de neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC).

En la actualidad, se ha avanzado significativamente en el estudio de los mecanismos biológicos, así como en el de los marcadores genéticos involucrados, campos que abren las puertas a posibles dianas terapéuticas adaptadas a la persona, y no sólo a la enfermedad. Los hallazgos básicos con aplicaciones clínicas han sido posibles, en parte, gracias a la existencia de modelos experimentales animales de epilepsia.

El modelo GASH:Sal (Genetic Audiogenic Seizure Hamster, Salamanca), desarrollado en la Universidad de Salamanca, exhibe crisis tónico-clónicas generalizadas de origen genético, como respuesta a un estímulo sonoro. Presenta una alta repetibilidad de los episodios ictales, por lo que resulta un modelo fiable y reproducible a la hora de evaluar las características de las crisis, la eficacia de fármacos y otros tratamientos antiepilépticos. Al tratarse de un animal cuya susceptibilidad ha surgido de manera espontánea por el desenmascaramiento de genes recesivos en los cruces endogámicos, este modelo es fácilmente equiparable a los fenómenos surgidos *de novo* en humanos.

La comprensión de la etiopatogenia de la epilepsia, como los mecanismos de hiperexcitabilidad neuronal, propagación de las crisis, o formación de focos secundarios, así como las consecuencias de las crisis repetitivas (“efecto kindling”) resultan de gran importancia.

Como parte integrante de un proyecto más amplio orientado a la validación del GASH:Sal como modelo de epilepsia, en este trabajo se ha llevado a cabo una exhaustiva caracterización comportamental de las crisis producidas por estimulación repetitiva, así como investigaciones colaterales con distintos marcadores de estrés y marcadores histológicos cerebrales, procesos de apoptosis y neurogénesis. El fin último de nuestro estudio es contribuir al conocimiento de la etiología de la epilepsia y los factores que influyen en el reclutamiento de nuevas áreas cerebrales tras la repetición de las crisis.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. La epilepsia

La ILAE (International League Against Epilepsy) describe la epilepsia como un desorden del cerebro caracterizado por una predisposición continua a presentar crisis comiciales, siendo éstas definidas como la presencia de signos o síntomas transitorios debidos a una actividad neuronal anormal en el cerebro (Berg et al., 2010; Ficher et al., 2005). Las crisis epilépticas, cuyas características dependen de la región cerebral afectada, son la manifestación clínica de una descarga neuronal excesiva e hipersincrónica, que altera de forma transitoria el funcionamiento cerebral normal (Shorvon, 2009). Existen múltiples expresiones clínicas de las crisis epilépticas, siendo el 23% de las mismas el porcentaje de las crisis que cursan con convulsiones.

La epilepsia es una de las patologías cerebrales más comunes (World Health Organization, 2017). Afecta entre el 1 y el 3% de la población mundial (Kaneko et al., 2002; Pitkanen y Lukasiuk, 2009; Levira et al., 2017), lo que significa que, a día de hoy, se estima que hay más de 50 millones de personas con epilepsia en el mundo, la mayoría (4 de cada 5 casos descritos) viviendo en países en desarrollo.

Actualmente, la epilepsia no representa una enfermedad específica, ni siquiera un único síndrome, sino un amplio conjunto de síndromes causados por desórdenes cerebrales, que pueden ser a su vez, secundarios a gran variedad de procesos patológicos. Debido a esto, resulta de gran importancia la correcta utilización de los términos relativos a la epilepsia.

Se define “**crisis epiléptica**” como la presencia transitoria de signos y/o síntomas debidos a la actividad neuronal excesiva y sincrónica en el cerebro.

Las crisis epilépticas pueden exhibir distintas etapas: un periodo previo a la crisis, donde suelen tener lugar una serie de síntomas conocidos como “aura” que indica un inicio inminente de la crisis, el periodo propio de la crisis y un periodo post ictal, inmediatamente después de la finalización de la crisis. Estas fases varían en duración, y, en algunos tipos de epilepsia, pueden no presentar los periodos previos o posteriores.

Los términos “**desorden convulsivo**”, “**crisis convulsiva**” y “**crisis cerebrales**”, que se utilizan generalmente como sinónimos de epilepsia, en realidad se refieren a los episodios paroxísticos recurrentes a causa de una disfunción cerebral, manifestados por estereotipias en el comportamiento.

Desde la fundación de la ILAE en 1909 se han realizado cambios en la definición de los conceptos y en la clasificación de las terminologías referentes a la epilepsia, a medida que ha ido avanzando la investigación en este campo. Las **clasificaciones** realizadas entre 1981 y 1989, se basaban en conceptos que, en su mayor parte, son anteriores a las técnicas de neuroimagen, genómica y biología molecular en las que se centran las investigaciones actuales en epilepsia, por lo que ha resultado necesario una revisión de conceptos, terminología y enfoques que clasifiquen las crisis y formas de epilepsia (ILAE, 2014), aunque siempre hay un pequeño porcentaje de crisis de difícil categorización:

- Crisis generalizadas: aquéllas que se propagan afectando rápidamente a redes neuronales distribuidas bilateralmente. Se clasifican a su vez en:
 - o Epilepsia de ausencia: caracterizada por episodios de “desconexión”, de segundos de duración, donde el paciente se mantiene inmóvil, con la vista fija y no es reactivo a estímulos. Estas crisis no provocan inmovilización post-ictal.
 - o Crisis tónico-clónicas: caracterizadas por un episodio de inconsciencia del individuo, seguido de un periodo de rigidez corporal de hasta 30 segundos, tras el que aparecen convulsiones tónico-clónicas por todo el cuerpo, con una duración total entre 1 y 5 minutos. Finalmente, tiene lugar un estado de sopor profundo.
 - o Crisis tónicas: generalmente son breves y se caracterizan por la rigidez muscular.
 - o Crisis clónicas: son las crisis convulsivas generalizadas con movimientos repetitivos, sin fase tónica inicial.
 - o Crisis atónicas: se caracterizan por la pérdida de la fuerza muscular, generalmente acompañadas de pérdida de consciencia.
 - o Crisis mioclónicas: son movimientos involuntarios, breves, bruscos y repentinos, a modo de sacudidas, que afectan generalmente a las extremidades y músculos faciales. Se subdividen a su vez en mioclonías positivas (contracción muscular) y negativas (pérdida del tono muscular).

- Crisis focales: aquéllas en las que la crisis se encuentra bien localizada o extendida, pero afectando a un único hemisferio. En este segundo caso, existe un consenso según el cual las crisis deben describirse de acuerdo a sus manifestaciones (por ejemplo: focales motoras).

Por otro lado, existe un segundo eje de clasificación de las epilepsias en función de la causa subyacente, o etiológica, en:

- Epilepsias genéticas (anteriormente descritas como idiopáticas): se originan como resultado directo de un defecto genético que se conoce o se supone que existe, donde las crisis son el síntoma fundamental de la alteración. El hecho de que se describa como genética no excluye que determinados factores ambientales puedan contribuir a la expresión o no de la enfermedad, aunque en la actualidad no se conoce ninguna influencia ambiental específica que actúe como factor contribuyente de estas formas de epilepsia.
Se consideran benignas en el sentido de no estar asociadas a lesiones cerebrales; y autolimitadas, respondiendo fácilmente a los fármacos antiepilépticos. Generalmente este tipo de manifestaciones están relacionadas con la edad, iniciándose, con mayor frecuencia, durante la infancia (Nieto Barrera et al., 2008).
- Epilepsias estructurales/metabólicas (anteriormente descritas como sintomáticas): en este caso existe una condición o enfermedad estructural o metabólica que lleva asociado un mayor riesgo a desarrollar epilepsia.

Dentro de las relacionadas con las lesiones estructurales se incluyen los trastornos adquiridos, como traumatismos, accidente cerebrovascular e infecciones. También pueden deberse a enfermedades de origen genético como por ejemplo puede ser la esclerosis tuberosa o malformaciones del desarrollo cortical; sin embargo, en ambos casos, este tipo de epilepsias descritas como estructurales o metabólicas coinciden en la existencia de una alteración, lesión identificable o enfermedad diferente a la propia epilepsia que se encuentra entre el defecto genético del individuo y el desarrollo de la epilepsia.

- **Epilepsias de causa desconocida** (anteriormente descritas como criptogénicas): engloban aquellos tipos de epilepsia en los que aún se desconoce la naturaleza de la causa subyacente. Puede tratarse de una epilepsia genética, estructural/metabólica o ser consecuencia de una alteración diferente y todavía no reconocida.

En la actualidad, se manejan numerosas pruebas diagnósticas para etiquetar y clasificar las crisis y síndromes epilépticos: electroencefalografía (EEG) y vídeo-EEG, estudios de neuroimagen craneal, test neuropsicológicos y test genéticos. El EEG es el método diagnóstico más utilizado en la epilepsia. Es una exploración neurofisiológica que se basa en el registro de la actividad bioeléctrica cerebral, prueba no invasiva repetible, accesible y económica. Además, ayuda a precisar el tipo de crisis y determinar posibles factores facilitadores de las mismas (Mercadé Cerdá et al., 2012). En cuanto a las descargas registradas por EEG en un cerebro epiléptico, se reconocen los siguientes elementos: punta, onda aguda, punta – onda, polipunta y polipunta – onda (Fig. 1).

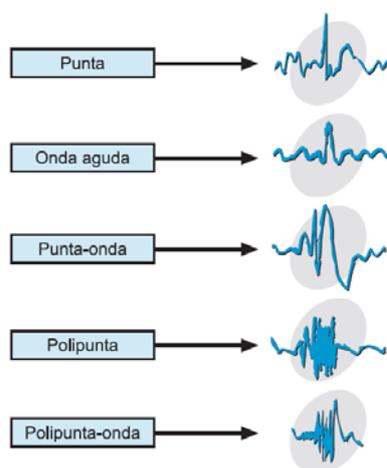


Figura 1. Tipos de elementos que se pueden identificar en el EEG de una persona diagnosticada de epilepsia. Se describen como punta, onda aguda, punta-onda, polipunta o polipunta-onda en función del registro electroencefalográfico que se observe (Fuente: Mercadé Cerdá et al., 2012).

Por su parte, los estudios de neuroimagen disponibles en la actualidad suponen un avance en el diagnóstico de la epilepsia, al proporcionar información acerca de las posibles anomalías tanto estructurales como funcionales en el foco epiléptico. Esta herramienta se ha introducido recientemente para el diagnóstico de la enfermedad y permitió, a partir de 2010, una clasificación más ajustada a la realidad atendiendo también a la implicación metabólica y estructural de la epilepsia (Alvarez-Linera Prado et al., 2012). Tanto la Resonancia Magnética (RM), la Resonancia Magnética funcional (RMf), la tomografía por emisión de fotón simple (SPECT) como la tomografía por emisión de positrones (PET)

han mostrado diferencias entre un cerebro sano y uno perteneciente a un paciente con epilepsia (Jackson et al., 2017; Kumar y Chugani, 2017a, 2017b; Theodore, 2017).

Se han hallado déficits cognitivos asociados tanto a la epilepsia como a su tratamiento (Carvalho et al., 2016; Huber y Bocchicchio, 2015; Law et al., 2015; Reilly et al., 2015), por lo que la realización de test neuropsicológicos permite evaluar las posibles alteraciones cognitivas asociadas generalmente al lenguaje y la memoria. Dichos test están altamente indicados cuando la RM muestra alteraciones en regiones cerebrales involucradas en la cognición (Galanopoulou, 2013; Losito et al., 2014).

La genética molecular ha ido ganando espacio en la investigación en epilepsia gracias a los protocolos que permiten la manipulación del ADN y la identificación de mutaciones genéticas. Se han descrito cerca de 130 posibles desórdenes genéticos relacionados con crisis epilépticas, asociados tanto con crisis parciales como generalizadas (Mercadé Cerdá et al., 2012), por lo que en la práctica clínica, resulta habitual realizar estudios genéticos, como por ejemplo, el estudio de la mutación GLUT1/SLC2A1 (Appavu et al., 2015; Helbig, 2015; Hildebrand et al., 2014; Larsen et al., 2015; Liu et al., 2016; Ragona et al., 2014; Reif et al., 2017; Wolking et al., 2014), o el estudio de mutaciones puntuales en los genes de la familia CHRN (Labate et al., 2013).

2.2. Modelos animales de epilepsia

En la actualidad, la comunidad científica cuenta con un gran número de modelos animales disponibles para el estudio de la epilepsia, justificados por dos motivaciones: en primer lugar, no existe un modelo que refleje en su totalidad los criterios clínicos de la epilepsia humana, por lo que se requiere la validación en varios modelos con objeto de constatar los hallazgos más relevantes; por otra parte, existen múltiples tipos de epilepsia en humanos a estudiar. Aunque la mayoría de los modelos se engloban en modelos de convulsiones, más que de epilepsia, pues para hablar de modelos de epilepsia es necesario poder asegurar que las crisis ocurren de manera recurrente.

Los modelos experimentales son múltiples y originados mediante distintos métodos: inducción de las crisis a través del uso de drogas convulsivantes, privación de metabolitos o estimulación eléctrica (Cioczek-Czuczwar et al., 2017; Gao et al., 2017; Pearce et al., 2016; Socala et al., 2017). También existen modelos animales con predisposición genética a padecer estas crisis convulsivas (Sloviter, 2009).

Los modelos animales mejor caracterizados en cuanto a su electrofisiología y comportamiento son los constituidos por modelos de roedores de crisis de ausencia, observados frecuentemente en la infancia temprana (Çarçcak et al., 2016; Depaulis et al., 2016; Witsch et al., 2015). La mayoría de las líneas existentes en roedores tienen cierta susceptibilidad congénita a padecer crisis audiogénicas, destacando los modelos de ratas y ratones (Fauvelle et al., 2015; Rossetti et al., 2012; Serikawa et al., 2015). Este rasgo no se observa en otros mamíferos y se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo auditivo y motor de estos roedores (Chernigovskaya et al., 2015; Quansah y N'Gouemo, 2014).

Actualmente, los animales más utilizados para la investigación científica en este campo se recogen en dos esquemas (Fig. 2), mediante los que es posible diferenciar los modelos de epilepsia o crisis epilépticas de los modelos de tipos específicos de epilepsia.

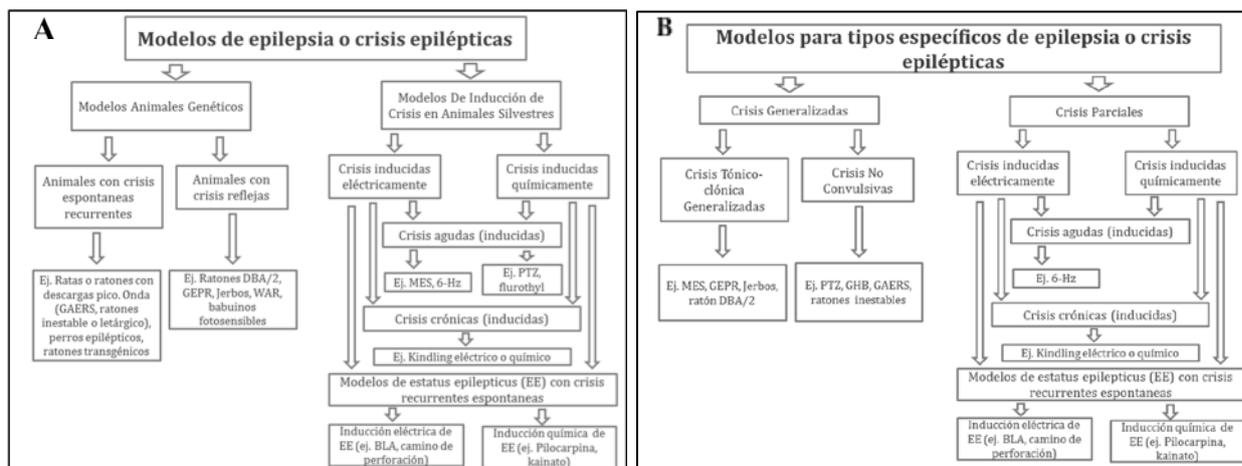


Figura 2. Esquema general de los modelos de epilepsia y crisis epilépticas. Esquemas simplificados de los modelos de epilepsia en cuanto al origen (A) o a los tipos de epilepsia (B). Se excluyeron de la figura muchos modelos animales, bien por encontrarse filogenéticamente más alejados del modelo utilizado en este trabajo o por tratarse de tipos de epilepsias diferentes a la que presenta el modelo objeto de estudio. Modificado y traducido de Löscher (2011) por Barrera-Bailón (2013).

Para que un animal pueda ser considerado como modelo de la condición humana particular de epilepsia según la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), debe satisfacer los siguientes criterios (Rubio, 2012):

- *El modelo debe exhibir patrones electrofisiológicos similares a los 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 farmacológicos 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.*

2.2.1. Modelos de epilepsias reflejas de origen audiógeno

Se han descrito varios modelos de epilepsias reflejas de origen audiógeno, como la raza de pollos Fayoumi (FEpi) (Batini et al., 1996), con predisposición genética de carácter autosómico recesivo a padecer crisis convulsivas cuando son expuestos a estímulos tanto sonoros como lumínicos intensos, desarrollándose en cada circunstancia un tipo convulsivo distinto (mioclonía de cabeza y cuello ante la luz, carrera salvaje frente al sonido). En estos animales, se cree que el foco epileptogénico se halla en el troncoencéfalo.

Entre los modelos de roedores encontramos la rata genéticamente propensa a la epilepsia (GEPR), con alta susceptibilidad ante estímulos sonoros pero también susceptibles a convulsivantes químicos, hipertermia e inflamación (Dailey et al., 1989), que tras el kindling, prolongan las crisis en la última fase clónica (Naritoku et al., 1992). La rata Wistar Audiogénica (WAR), que desarrolla crisis tónico-clónicas generalizadas cuyo foco se encuentra en el troncoencéfalo (Doreto et al., 2003; García-Cairasco et al., 1996). Los ratones DBA/2, altamente sensibles a estímulos auditivos intensos (Naquet y Valin, 1998; Seyfried y Todorova, 1999), que tras la estimulación sonora, desarrollan una fase de carrera salvaje, convulsiones clónicas y una fase final de extensión tónica, pudiendo llegar a morir por fallo respiratorio a causa de la gravedad de las mismas. En ambos modelos descritos, también se ha sugerido el tronco del encéfalo como foco de origen de las crisis.

Actualmente, las investigaciones en el modelo WAR combinan el estudio electroencefalográfico con la observación de los rasgos de comportamiento durante las crisis, mediante la utilización de programas específicos para el análisis neuroetológico, como el denominado ETHOMATIC (García-Cairasco et al., 1983) que analiza el movimiento generado por el animal durante las crisis y permite correlacionarlo con la zona cerebral subyacente (García-Cairasco y Sabbatini, 1983; García-Cairasco et al., 1996).

2.3. El modelo GASH:Sal

El modelo GASH:Sal (Genetic Audiogenic Seizure Hamster, Salamanca), desarrollado en el animalario de la Universidad de Salamanca, proviene de una cepa de la Universidad de Valladolid, denominada GPG/Vall, ya extinta, en la que se halló una epilepsia genética de origen troncoencefálico (Aparicio, 1983; Gil-Verona et al., 1991 y 1993). En este modelo, las crisis convulsivas audiógenas (en adelante, CCASs) se desencadenaban al exponer a los animales a un estímulo sonoro de frecuencia e intensidad determinadas (Soria et al., 1987).

Las crisis, similares a las observadas en el tipo *Grand Mal* en humanos, cursaban con convulsiones generalizadas tónico-clónicas. Posteriormente, ya en la Universidad de Salamanca, se encontró un patrón de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena (Muñoz et al., 2017), realizando nuevos cruces y constituyendo la nueva línea GASH:Sal.

Tal como ocurre en otros modelos animales de CCAs utilizados en investigación biomédica (Ross y Coleman, 2000), tras el estímulo sonoro se desencadenan las convulsiones tónico-clónicas, alcanzando el mayor grado de madurez entre el primer y el cuarto mes de edad. En el GASH:Sal se observan las fases características progresivas de una crisis convulsiva audiogénica (Muñoz et al., 2017).

2.3.1. Clínica de las crisis

La caracterización comportamental de las CCAs, se divide en varias fases con comportamientos definidos. La primera fase tras la aplicación del estímulo sonoro es la de **carrera salvaje**, en la que los animales corren a gran velocidad y de forma no controlada. A continuación, el animal cae, "opistótono" (arqueamiento acusado del raquis, extremidades anteriores, cola, orejas enhiestas y espasmo en abducción de los miembros posteriores), aparece la fase **tónico-clónica**, caracterizada por convulsiones generalizadas con fase clónica en miembros anteriores y espasmo tónico en abducción de miembros posteriores. Posteriormente, se produce la apertura tónica de la boca, flexión dorsoventral del cuello y tronco, cierre tónico de la boca y la **hiperextensión tónica** de los miembros anteriores. Finalmente, los animales presentan un **periodo de inmovilidad post-ictal**, durante un tiempo de duración variable, aunque generalmente suele durar entre 2 y 5 min. aproximadamente.

2.3.2. Sustrato anatómico de las crisis convulsivas audiogénicas

El sustrato anatómico y las vías implicadas en las CCAs comenzaron a estudiarse durante los años 70, determinándose el papel del sistema auditivo y otras estructuras en el origen y propagación de las crisis. Los circuitos implicados en los estados tónicos de las CCAs son exclusivos del tronco encefálico, incluidas las estructuras auditivas como el Núcleo Coclear (CN), el Complejo Olivar Superior (SOC), el Núcleo del Lemnisco Lateral (ll) y el papel crítico del Colículo Inferior (IC) (Faingold, 2004). La función del IC es la codificación de estímulos auditivos y actúa de centro integrador de la señal auditiva (Bajo y Moore, 2005; Brodal, 1981; Ramón y Cajal, 1904; Winer et al., 1998). En cuanto a su citoarquitectura, el IC está dividido en tres zonas: 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 acotado por el ECIC rostro – lateroventralmente y por el DCIC caudo – dorsalmente. Los subnúcleos del IC (núcleo central, corteza dorsal, núcleo intercolicular y corteza externa) desempeñan un mayor rol en las CCAs y la entrada de la señal auditiva es proyectada por la corteza externa hacia los núcleos efectores motores integrados en la red neuronal (Chakravarty y Faingold, 1997; Merrill et al., 2003; Ribak et al., 1994).

Las lesiones bilaterales producidas en el IC bloquean las CCAs de forma permanente (García-Cairasco y Sabbatini, 1991; Kesner, 1966; Wada et al., 1970; Willot y Lu, 1970), especialmente si la lesión se realiza en el CNIC. Además, las CCAs se inhiben parcialmente si se daña la ECIC (Willot y Lu, 1970). Sin embargo, las CCAs no se inhiben ni total ni parcialmente como consecuencia de las lesiones en otros núcleos de la vía auditiva, como por ejemplo en el núcleo geniculado medial (Willot y Lu, 1970).

Las neuronas de la capa profunda del Colículo Superior (SC) son las mayores receptoras de los impulsos enviados desde el IC y su activación está implicada en que se desencadene la fase de carrera salvaje de las CCAs (Faingold y Randall, 1999; Yang et al., 2001). La capa profunda del SC tiene proyecciones directas al cordón espinal o por la vía de la Formación Pontina Reticular (PRF) y proyecciones a la región Gris Periacueductal (PAG) (Raisinghani y Faingold 2003; Yang et al., 2001), que a su vez proyecta al cordón espinal directa o indirectamente (Bajic y Proudfit, 1999; Mouton y Holstege, 1994). La PAG está implicada en la generación de la fase clónica de las CCAs (Ishida et al., 2002; N'Gouemo y Faingold, 1998; Yang et al., 2003).

La implicación de la PRF está asociada al desencadenamiento de la fase tónica de las crisis (Faingold y Randall 1995; Faingold y Riaz, 1994) y es también dominante en el periodo de depresión post-ictal, siendo el único núcleo activo durante dicha fase (Faingold, 1999). También se considera que la Sustancia Negra Reticulada (SNR) puede formar parte del circuito que modula las CCAs. García-Cairasco y Sabbatini, (1991) describen que en ratas Wistar (inicialmente resistentes a presentar crisis) se incrementan las CCAs severas al causarles lesiones unilaterales en la SNR (Fig. 3).

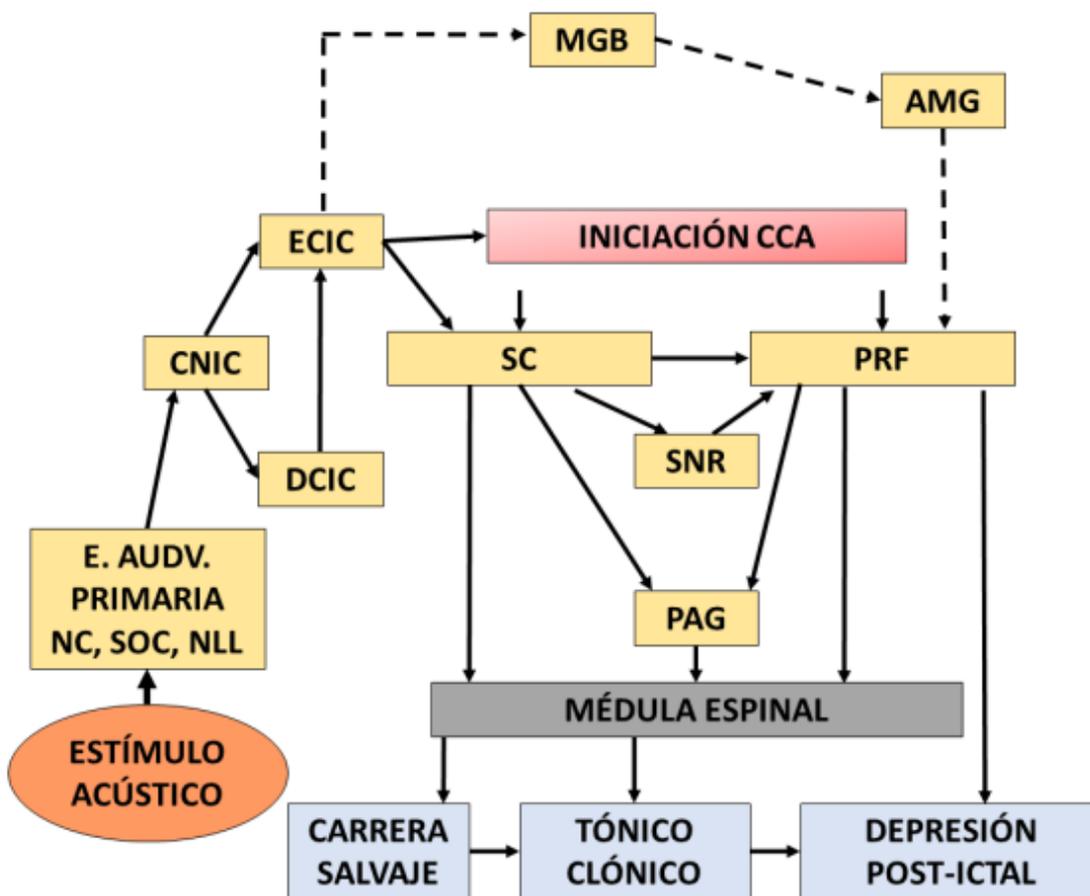


Figura 3. Diagrama esquemático de los núcleos críticos implicados en los estados convulsivos audiogénicos y los comportamientos que subyacen a la crisis.

El CNIC inicia las CCAs mientras que la ECIC proyecta la señal auditiva hacia los núcleos motores. El SC inicia la carrera salvaje mientras que la PAG y la PRF controlan el desencadenamiento de la fase tónico-clónica. La PRF está activa durante la depresión post-ictal. La amígdala y el MGB están relacionados con

las CCAs repetitivas (Kindling). *Abreviaturas*: CN: núcleo coclear; II/NLL: núcleos del lemnisco lateral; SOC: complejo olivar superior; CNIC: núcleo central del colículo inferior; DCIC: corteza dorsal del colículo inferior; ECIC: corteza externa del colículo inferior; SC: colículo superior; MGB: cuerpo geniculado medial; AMG: amígdala; PRF: formación reticular del puente; SNR: sustancia negra reticular; PAG: sustancia gris periacueductal. (Adaptado de Faingold, 2004).

Los estudios multidisciplinarios orientados a la caracterización de la cepa GASH:Sal supusieron su consolidación como nueva línea de investigación, describiéndose en detalle las fases de las crisis convulsivas, así como varias de sus características biológicas (Muñoz de la Pascua, 2004). Posteriormente, los estudios electroencefalográficos, histológicos y de caracterización del sistema auditivo (por ser el sistema sensorial responsable del origen de las crisis convulsivas) mostraron la existencia de numerosas alteraciones en el GASH:Sal respecto al hámster control, encontrándose diferencias en los umbrales auditivos (superiores en el GASH:Sal) (Sánchez-Benito et al., 2017), en el patrón de descargas (siendo en el GASH:Sal representativo de los episodios de crisis convulsivas) (Carballosa-González et al., 2013) y a nivel genómico (Carballosa González, 2008; López-López et al., 2017); además, el estudio de receptores opioides en este animal puso de manifiesto una elevada activación de dichos receptores, específicamente en el Colículo Inferior, tras el desencadenamiento de CCAs en comparación con el hámster control (Barrios Rodríguez, 2008). El estudio neuroquímico del SNC así como de diversos canales importantes en la epilepsia evidenció deficiencias en la cantidad del canal KCC2, alteraciones que se hacían más evidentes tras la estimulación acústica y el desarrollo de las crisis; además, las subunidades rGABA_A mostraban diferencias en sus niveles de expresión, siendo menores los de la subunidad β_3 en las áreas mesencefálicas analizadas. Por otra parte, la expresión de NOS en el GASH:Sal tras sufrir crisis repetidas, muestra afectación diferencial a lo largo del eje caudo-rostral (con menores niveles en regiones rostrales que van incrementándose hacia las caudales) (Prieto Martín et al., 2012). El estudio farmacológico llevado a cabo en el GASH:Sal evidencia el efecto anticonvulsivo tanto de fármacos clásicos como de fármacos de nueva generación, tanto en administraciones agudas como crónicas (Barrera-Bailón, 2013; Barrera-Bailón et al., 2017). La descripción del transcriptoma en el IC, el núcleo desencadenante de las crisis convulsivas, permitió detectar gran cantidad de genes expresados diferencialmente respecto al hámster control, de todos ellos al menos 58 presentan altas interacciones que indican una conexión biológica y funcional, están ampliamente representadas los que codifican proteínas transportadoras y receptores, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto; las cuales están directamente involucradas en el desencadenamiento de las crisis convulsivas en el GASH:Sal (López-López, 2016). Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado ligeras alteraciones en la distribución del receptor CB1 respecto a la línea WAR, que pudieran ser propias de la cepa GASH:Sal (Masa González, 2016).

Finalmente, en los animales GASH:Sal también se demuestran alteraciones en el sistema eferente olivococlear, tanto a nivel morfológico como funcional, lo que se relaciona directamente con su sensibilidad auditiva y por tanto, que ellos sean particularmente susceptibles al estímulo auditivo (Sánchez-Benito et al., 2017).

2.4. Concepto de kindling

Se denomina “*kindling*” a la exposición a un estímulo repetitivo que afecta a estructuras cerebrales específicas y tiene como resultado un desarrollo e intensificación progresiva de las crisis motoras provocadas por el estímulo (Goddard, 1967, 1969). Este concepto de trabajo se centra en la hipótesis de que las redes neuronales se transforman en hiperexcitables de forma permanente tras sufrir estimulaciones repetidas. El kindling origina un incremento de la duración de las convulsiones y de la emergencia en la actividad cortical epileptiforme observada en estructuras del cerebro anterior (Dutra Moraes et al., 2000; García-Cairasco, 2002; Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992). Este protocolo genera cambios en el comportamiento que se observan en las crisis como: estados clónicos de músculos de la cara y miembros anteriores al final de las crisis en ratas GEPR-3s (Naritoku et al., 1992).

2.5. Reclutamiento neuronal

La constante repetición de las CCAs recluta nuevas regiones de la red nerviosa que entran a dominar los estados finales de las crisis; las regiones involucradas son el Cuerpo Geniculado Medial (Feng et al., 2001), la Amígdala (Raisinghani y Faingold, 2005a) y la Corteza Perhinal (Raisinghani y Faingold, 2005b), que a su vez, pueden nuevamente reclutar a la PRF en los estados clónicos de los músculos de la cara y miembros anteriores (Raisinghani y Faingold, 2005c). La metodología de estudio de la activación de nuevos núcleos se realiza monitorizando la expresión de genes como *c-fos*. El gen *c-fos* pertenece a la familia de genes de expresión temprana, utilizados en investigación como potentes herramientas de identificación de la activación neuronal, así como de los circuitos involucrados en las distintas funciones cerebrales (Braga Calais et al., 2013). El gen *c-fos* codifica una proteína denominada Fos, la cual actúa como factor de transcripción controlando el paso del ADN a ARNm. De este modo, cuando una célula recibe un estímulo que la activa, los genes de expresión temprana se expresan, mediando de forma muy rápida y transitoria la regulación post-transcripcional de una cascada génica capaz de modular diferentes procesos del ciclo celular (Herdegen y Leah, 1998; Sng et al., 2004; Szyndler et al., 2009). Se ha descrito el papel importante de *c-fos* en la regulación de genes que a su vez se encuentran involucrados en procesos celulares tan variados como la proliferación, migración y diferenciación celular, supervivencia, muerte, plasticidad sináptica, respuesta a estrés y transformación oncogénica (Pla Ferrer, 2010).

Se clasifica a *c-fos* dentro de los proto-oncogenes, con regulación positiva del ciclo celular, favoreciendo en condiciones fisiológicas el crecimiento y división celular. El descubrimiento de este gen se produjo en 1982, al aislarse su forma viral (*v-fos*) en la biopsia de un osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jenkins (Curran and Teich, 1982); un año después se describió su variante celular, *c-fos* (Curran et al., 1983) y posteriormente su localización celular y función, determinándose como proteína nuclear con capacidad de unión al ADN y activación génica (Curran et al., 1984, Sambucetti and Curran, 1986). A lo

largo de los 90 y durante el 2000, se realizaron estudios de cinética de respuesta del gen, observándose que su activación ante un estímulo agudo es transitoria, apareciendo un pico máximo de ARN mensajero aproximadamente a los 30 minutos y un máximo de cantidad proteica sobre los 90 minutos, dependiendo del modelo animal estudiado (Kovacs, 2008).

2.6. Indicadores comportamentales y fisiológicos de estrés

Los individuos de la mayoría de especies animales están expuestos a un gran rango de potenciales estresores durante sus vidas, presentes en prácticamente todas las interacciones con el medio (exploraciones, búsqueda de alimento, respuesta a estímulos), con otros individuos de su misma especie (interacciones sociales, relaciones de dominancia, función reproductora), y con individuos de otras especies (depredadores y presas). En el modelo de estudio GASH:Sal, la principal fuente de estrés controlada por el investigador a la que los animales se ven sometidos es la estimulación acústica desencadenante de las crisis epilépticas, que en determinadas condiciones experimentales se produce de manera repetitiva durante 10 días consecutivos (protocolo de kindling audiogénico). Además, la crisis convulsiva en sí misma, supone un estresor para el animal; lo que implica alteraciones a través de cambios fisiológicos derivados de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis (eHHA).

Independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, la exposición a éste produce importantes cambios psicológicos y comportamentales en todas las especies, cuyos efectos pueden evaluarse de variadas formas, entre ellas, mediante la alteración de expresión génica en el SNC (Liu y Quian, 2014) o a través de las diferencias analizadas en pruebas comportamentales. Estos cambios están mediados por la activación del eHHA y la liberación consiguiente de glucocorticoides desde la corteza adrenal y catecolaminas de la médula adrenal.

En investigación, uno de los métodos de evaluación del estrés se lleva a cabo mediante la prueba comportamental del **campo abierto**, creada por Hall (Campos et al., 2013; Ennaceur, 2014; Hall), quien la utilizó para estudiar la emocionalidad de las ratas midiendo su actividad exploratoria y la defecación. La prueba evalúa las conductas del animal al colocarlo en un espacio abierto nuevo, de donde no puede salir debido a una barrera que lo rodea. Existe gran variedad de protocolos para detectar las posibles alteraciones del animal en el campo abierto, sin haberse logrado actualmente un consenso para la utilización de unos u otros. Pueden encontrarse diferencias tanto en el lugar de colocación del animal al comienzo de la prueba (puede colocarse por el investigador en el centro o cerca de las paredes del aparato), en el tamaño y forma del campo abierto (desde circulares de 30-120 centímetros de diámetro, hasta cuadrados de proporciones similares) y en el tiempo de estudio (entre 2 y 20 minutos), pero por lo general, si hay un acuerdo en los comportamientos observados en la prueba como indicadores de los niveles de estrés del sujeto (Prut y Belzung, 2003; Walsh y Cummins, 1976).

Por otro lado, existe una serie de **marcadores en sangre** que permiten inferir los niveles de estrés del animal respecto a un estado basal. Entre estos marcadores se encuentran los niveles de cortisol y corticosterona en sangre (evaluables tanto en suero como en plasma). El eHHA (Fig. 4) regula estos

niveles a través de la producción de la GHRH (hormona liberadora de hormona del crecimiento) y de la dopamina desde el núcleo arcuato. Este núcleo pertenece a la neurohipófisis y sus neuronas forman parte del sistema secretor, mandando sus axones a una estructura situada sobre el tallo hipofisario, denominada eminencia media, donde los terminales liberan las hormonas que continuarán su viaje a la adenohipófisis por vía sanguínea a través del sistema porta-hipofisario. La hormona GHRH estimula la liberación de GH (hormona del crecimiento, del inglés “Growth Hormone”).

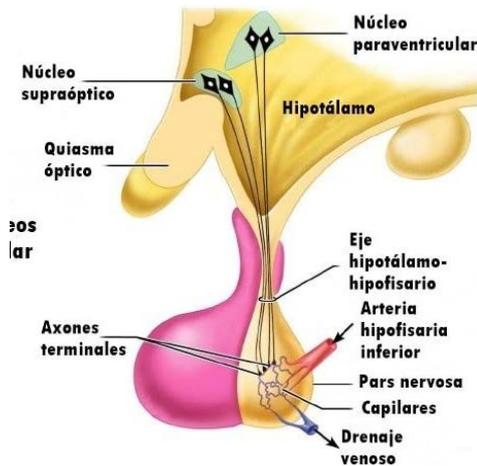
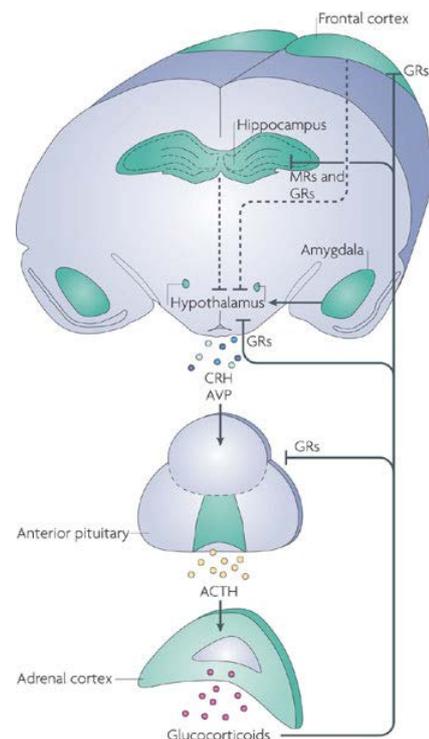


Figura 4. Esquema de corte transversal del eje hipotálamo – hipofisario. Muestra la localización de los núcleos implicados en la regulación de los niveles hormonales de cortisol y corticosterona en sangre (Fuente: web lifeder).

Además, el núcleo paraventricular libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotropa). Las neuronas del núcleo paraventricular implicadas en este proceso constituyen el 15% del total del núcleo y se denominan corticotropas. Al liberarse CRH, se desencadenan el mecanismo de liberación de cortisol de las glándulas suprarrenales. El cortisol se considera la hormona del estrés, debido a que su producción se incrementa ante situaciones de emergencia para mejorar la respuesta rápida del organismo ante un peligro. Su función principal es incrementar los niveles de glucosa en sangre para que los músculos dispongan de la cantidad necesaria para superar dicha situación de alarma (Fig. 5).

Figura 5. Esquema que ilustra la regulación de la vía de liberación de glucocorticoides tras el estímulo estresor percibido. Esta vía responde a los estímulos tanto internos como externos percibidos por el organismo, activando circuitos que confluyen en el hipotálamo con la liberación de la hormona CRH que produce la liberación de ACTH en la hipófisis. La ACTH viaja por el torrente sanguíneo y activa la corteza adrenal desde la que se liberan los glucocorticoides. Los glucocorticoides a su vez suponen una retroalimentación negativa tanto a nivel de la pituitaria (inhibiendo la liberación de más ACTH en sangre), como en el hipotálamo (bloqueando la liberación de CRH) y en corteza frontal e hipocampo (impidiendo que éstos activen el hipotálamo, e inhibiendo así la vía). (Fuente: Nature Reviews, Neuroscience).



Los estudios realizados por Ottenweller et al. (1985) en el estudio fisiológico del estrés en el Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) establece los valores de concentración de glucocorticoides ante situaciones de estrés agudo y de estrés crónico, definiendo como glucocorticoide más abundante e importante en la respuesta el cortisol.

Sin embargo, estos dos glucocorticoides no se liberan en sangre a lo largo del tiempo siguiendo la misma dinámica (Gebhardt-Henrich et al., 2007). En el hámster sirio, el cortisol presenta una liberación más rápida, presentando su pico de máxima concentración aproximadamente transcurridos 20 minutos del estímulo estresor (en el estudio propuesto, la inyección de ACTH); mientras que el pico máximo de corticosterona se observa a los 60 minutos del estímulo, alcanzando valores de concentración la mitad de altos que en el caso del cortisol (Fig. 6).

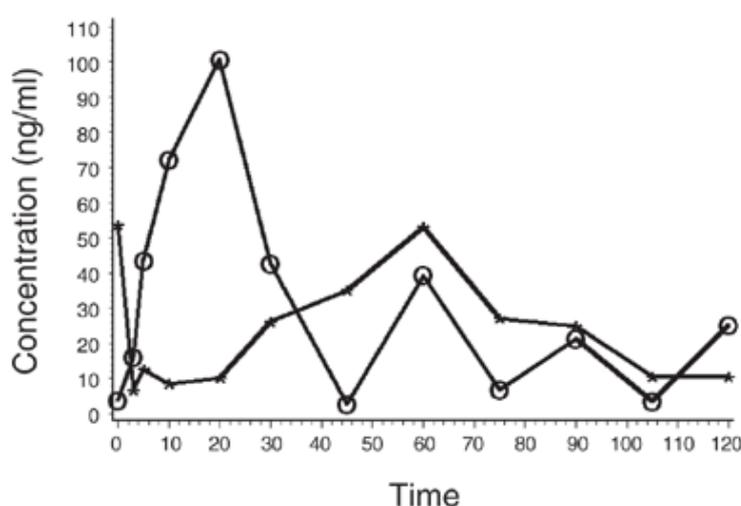


Figura 6. Concentración de cortisol (círculos) y corticosterona (estrellas) en machos de Hámster sirio en función del tiempo tras la inyección de ACTH (Fuente: Gebhardt-Henrich et al., 2007).

Tal como se ha apuntado anteriormente, muchas de las interacciones de un sujeto con su entorno pueden representar un estresor, y entre ellas, existe bibliografía que evalúa el estrés provocado por el manejo del animal durante un procedimiento experimental concreto (Gebhardt-Henrich et al., 2007). Así, se establece una correlación directa de incremento de los niveles de cortisol en sangre a mayor tiempo de manejo por parte del investigador.

2.7. Apoptosis y neurogénesis tras el kindling

El término **apoptosis** fue utilizado por primera vez en 1972 por los investigadores Kerr, Willie y Curie en la descripción de un tipo de muerte celular diferente a la muerte por necrosis, que no presentaba las alteraciones citológicas propias de ésta última, ni implicaba mecanismos de respuesta inflamatoria (Kerr et al., 1972; Perales Romero, 2005).

La maquinaria bioquímica apoptótica asociada a la epilepsia emergió como un campo importante de investigación durante los años 90 (Meldrum y Bruton, 1992), mostrando en diferentes modelos experimentales los procesos de muerte neuronal tras las crisis epilépticas. Investigaciones en un modelo murino con crisis convulsivas prologadas detectaron *in situ* fragmentación del ADN en unas muestras de tejido cerebral (Filipkowski et al., 1994). Con el estudio de los modelos experimentales y nuevos ensayos

clínicos se pudo confirmar que las crisis epilépticas producen muerte neuronal en el cerebro (Meldrum y Bruton, 1992). Resulta complicado distinguir entre las causas y las consecuencias de la epilepsia, así como entre las secuelas producidas por el tratamiento de la patología y las propias de las crisis. Gracias a los continuos avances en neuro-imagen de alta resolución se ha descrito una progresión del daño cerebral en aquellos pacientes con ataques epilépticos continuos (Henshall y Simon, 2005). Debido a estas evidencias, se considera que establecer de manera precisa los procesos de muerte neuronal inducidos por las crisis permitirá desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que ayuden al tratamiento de la epilepsia y a reducir los daños que provoca.

Generalmente, el inicio del proceso de muerte celular ocurre ante una activación prolongada del receptor de glutamato y/o como consecuencia de una liberación de ligandos de los receptores de muerte. El incremento del calcio intracelular puede también provocar la activación de la vía intrínseca del proceso de muerte celular. En ambas situaciones, a continuación se activa la caspasa-9 o iniciadora que provoca la activación de las caspasas efectoras.

En la muerte neuronal programada, o apoptosis, los componentes celulares participan de forma activa en el proceso; aunque actualmente se sabe que existe una amplia gama de muerte “activa” donde no en todas las circunstancias se observan el total de fases descritas en la apoptosis; los cambios celulares incluyen la pérdida de contacto con las células adyacentes por salida de fluidos, la dilatación del retículo endoplásmico y localización en el exterior de la membrana plasmática de fosfatidilserina (que es reconocida por los macrófagos y activa el proceso de fagocitosis de la célula), pérdida de microvellosidades, condensación de la cromatina y acumulación de ésta en la periferia y aparición de los cuerpos apoptóticos como consecuencia de las invaginaciones de la membrana. Finalmente, las células en apoptosis son fagocitadas por los macrófagos y degradadas dentro de éstos.

El proceso de muerte celular programada se ve activado a través de dos vías generales:

- La vía extrínseca: mediada por la activación de los receptores de muerte al unirse a sus ligandos extracelulares. Destaca el receptor Fas, que al unirse al ligando FasL provoca la trimerización del receptor, agrupándose así los dominios de muerte en el lado citoplasmático. Este proceso recluta una proteína adaptadora con un dominio de interacción para procaspasas inactivas. Al darse la interacción, la caspasa-8 se autoactiva y actúa sobre las caspasas efectoras. Esta es la vía descrita para la protección inmunitaria, capaz de regular y bloquear respuestas inmunes o eliminar linfocitos T autorreactivos.
- La vía intrínseca o mitocondrial: se inicia ante situaciones en la que la célula está sometida a estrés o como consecuencia de recibir estímulos nocivos. En esta circunstancia, la célula no recibe señales extracelulares de supervivencia celular y las mitocondrias liberan citocromo C que se une a la proteína Apaf-1. Esta interacción permite el reclutamiento y autoactivación de la

caspasa-9, formando un apoptosoma. Mediante este proceso, se activa la caspasa-3 desde su precursor inactivo procaspasa-3.

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

La caspasa-3 activa pertenece a la familia de las caspasas, proteínas claves en la señalización de la vía apoptótica. Su estado fisiológico dentro de la célula es como moléculas inactivas, en forma de precursores que deben ser cortados para activarse. Estos precursores se denominan Pro-caspasas, zimógenos inactivos (Elinos-Báez et al., 2003). Tienen actividad cisteín – proteasa con un sitio activo de corte muy conservado. Se clasifican en iniciadoras o efectoras dependiendo del momento de activación y la función que desarrollen. Destacan la caspasa-9 como iniciadora y la caspasa-3 como efectora (Fig. 7).

Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína caspasa-3 en su conformación activa. Se observan dominios α -hélicas separados por una zona de hoja plegada. Su nombre proviene de la familia proteica a la que pertenecen y la función que realizan: C-isteín ASP-artato prote-ASAS.



Al tratarse de un mecanismo cuya activación produce efectos muy importantes sobre la célula, existe un complejo sistema de regulación, impidiéndose que pequeñas alteraciones en la misma produzcan una muerte innecesaria y por otra parte, cuando las alteraciones celulares lo indiquen, llevando a cabo una amplificación de la señal para que el proceso de muerte celular se produzca de forma rápida (Fig. 8).

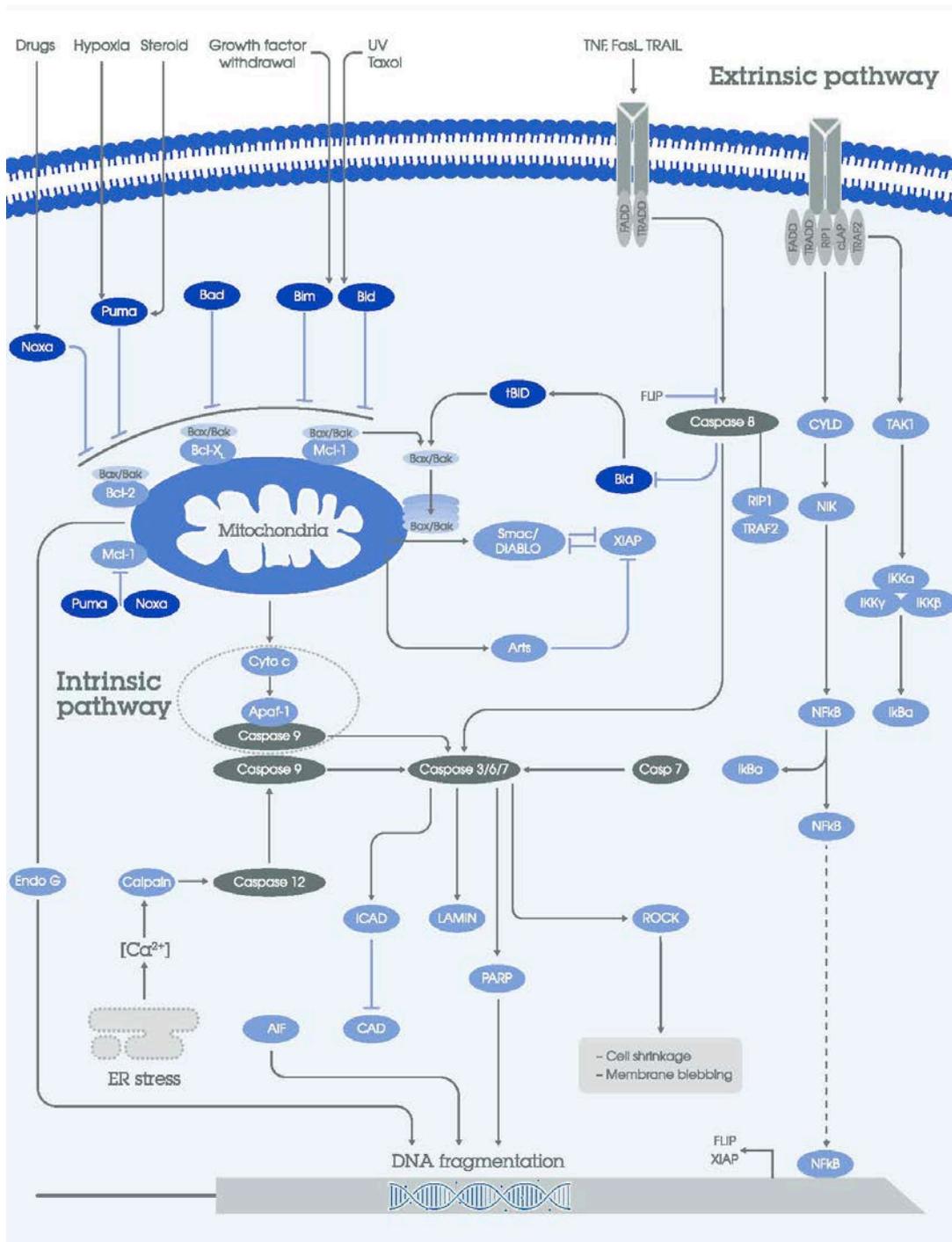


Figura 8. Esquema de las vías apoptóticas de mayor relevancia. Representación de las cascadas de señalización apoptótica extrínseca e intrínseca. Las vías de señalización conocidas incluyen la vía de las MAP kinasas, la transcripción del factor Kappa β , TLR4, la iNOS y la COX-2. (Fuente: www.abcam.com/apoptosis)

En cuanto a la **neurogénesis** (proceso de formación de nuevas neuronas), durante muchos años se mantuvo el dogma enunciado por Santiago Ramón y Cajal que determinaba el desarrollo fetal como único momento en el que se formaban neuronas en el cerebro, considerando que tras el nacimiento el total de las neuronas del organismo eran neuronas maduras, fuera del ciclo celular, lo que descartaba la formación de nuevas neuronas a partir de ese momento; “Todo puede morir, nada puede regenerarse” (Cajal, 1928).

En los años 60, el neurobiólogo norteamericano Joseph Altman descubrió en roedores la capacidad de creación de nuevas neuronas (Altman, 1963, 1969), descartando la teoría postulada por Cajal. Sin embargo, sus hallazgos no fueron bien aceptados por la comunidad científica; hasta que dicho proceso fue detectado de nuevo por el científico y biólogo español José Manuel García-Verdugo en estudios con lagartos (y posteriormente en cerebros de aves y mamíferos) a finales del siglo XX. Se descubrieron las áreas de formación de nuevas neuronas en el cerebro de vertebrados adultos y rutas de migración de las mismas a diferentes zonas del cerebro (Fig. 9).

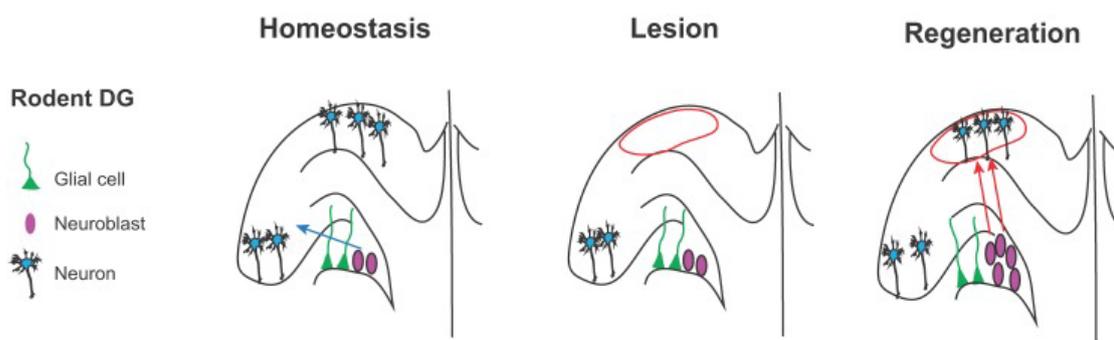


Figura 9. Esquema del Giro Dentado del Hipocampo de un roedor. En él se muestra la localización y migración de los distintos tipos celulares implicados en la neurogénesis. Además, refleja el proceso de regeneración neuronal tras una lesión en el hipocampo. (Fuente: Alunni y Bally-Cuif, 2016).

Las áreas más importantes de formación de nuevas neuronas son el hipocampo y el área subventricular, así como distintas áreas de la corteza cerebral, como la corteza prefrontal o la región temporal inferior y el bulbo olfatorio (Sato, 2015). Este hallazgo sugiere la existencia de células troncales neuronales durante toda la vida. El lugar de localización de estos precursores neuronales se ha denominado “nichos neurogénicos” y se ha descubierto que expresan marcadores propios de las células gliales antes de dar lugar a neuronas (Paredes et al., 2016; Tan et al., 2017; Yamaguchi et al., 2016), definiéndose por tanto a la glía radial como formadora de nuevas neuronas, además de ser precursora de diferentes tipos celulares gliales en el cerebro adulto (Florio y Huttner, 2014; Yamaguchi et al., 2016); este proceso está íntimamente relacionado con la plasticidad neuronal (Egawa et al., 2016) (Fig. 10) y presenta semejanzas entre los distintos grupos de vertebrados (Alunni y Barry-Cuif, 2016; Paredes et al., 2016).

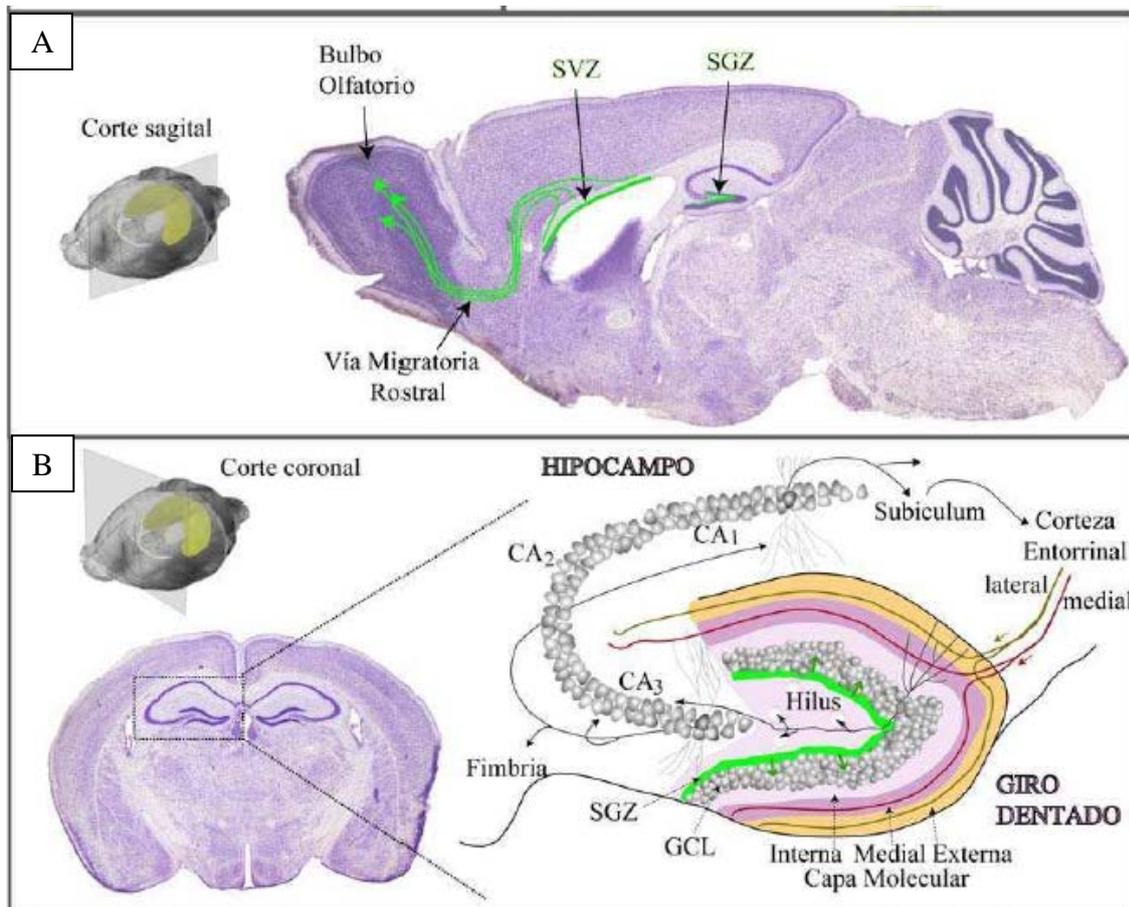


Figura 10. Identificación de áreas de formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. A. Corte sagital en el que se muestran las zonas de neurogénesis en el adulto y la vía de migración de las nuevas neuronas. B. Organización anatómica del hipocampo. A la derecha, representación del área de formación de neuronas dentro del hipocampo, así como las flechas que indican la integración de estas neuronas formadas. (Fuente: Piatti, 2009).

Aunque en la actualidad no se conocen en profundidad qué factores favorecen y cuáles inhiben la neurogénesis, se ha apuntado a la práctica de ejercicio voluntario, el contacto con ambientes estimulantes, paradigmas de aprendizaje, e incluso condiciones patológicas como la epilepsia (Respondek y Buszman, 2015) entre los potenciadores que incrementan el número de nuevas neuronas (Kokaia y Lindvall, 2003; Parent y Lowenstein, 2002; van Praag et al., 1999); y al estrés, depresión, vida sedentaria y privación de sueño como bloqueantes de este proceso (Czéh et al., 2007; Duman, 2004; Morgenstern et al., 2008).

Existen referencias bibliográficas sobre la visualización de proteínas de proliferación celular a través de la realización de doble tinción (Kim et al., 2012; Piatti, 2009; Nogueira et al., 2015). La proteína Ki67 es una proteína de localización nuclear cuya expresión celular está limitada temporalmente a la fase de G1 tardía a M del ciclo celular (Del Bigio, 1999) por lo que se considera un marcador de proliferación celular (Kotagiri, Chance, Szele y Esiri, 2013; Smith et al., 2013; Toledo et al., 2017). Estudios realizados por Kim et al. (2012) en el giro dentado de animales con crisis epilépticas muestran un incremento en los niveles de inmunotinción de Ki67 respecto al animal control (Kim et al., 2012). También, en el mismo área y en un modelo experimental con crisis epilépticas, Nogueira et al. (2015) han descrito un

incremento en los niveles de expresión de Ki67, lo que indica la incorporación de nuevas neuronas en esta zona (Nogueira et al., 2015).

El doble marcaje utiliza el factor de transcripción nuclear NeuN como proteína neuronal constitutiva (Mullen et al., 1992). Su nombre proviene de *Neuronal Nuclei*. En cuanto a la bibliografía consultada, estudios descritos por Kim et al., (2012), en los que se evalúan los niveles de NeuN tras el sometimiento a crisis epilépticas, muestran un descenso de la inmunotinción en las regiones del hipocampo CA1 y CA.

Resulta de especial importancia conocer la existencia de neurogénesis en el hipocampo, debido a sus implicaciones funcionales y al papel que juega dentro del modelo de epilepsia usado en este estudio. El hipocampo es responsable del procesamiento espacial, procesos relacionados con la ansiedad y control inhibitorio del comportamiento (Bannerman et al., 2004; Bast y Feldon, 2033), funciones que ha ido adquiriendo a lo largo de la escala evolutiva. Las distintas investigaciones llevadas a cabo en el hipocampo a través de técnicas quirúrgicas en pacientes (Scoville y Milner, 2000), han puesto de manifiesto la relevancia de su función en la codificación de la memoria, los episodios recientes vividos, así como la memoria episódica asociada al mapa físico mental (Heckers et al., 2004; Lehn et al., 2009). Estos datos permitieron postular la función del hipocampo como organizador de representaciones temporales que a continuación se almacenarían conformando la memoria a largo plazo (Alvarez y Squire, 1994).

Los estudios que evalúan la neurogénesis en adultos determinan en el área hipocampal, en condiciones basales, un porcentaje de formación de nuevas neuronas de entre el 3-6% de la población total. La cuantificación varía en función de determinados estímulos percibidos por el organismo, tal como se apunta anteriormente (Albright et al., 2017).

2.8. Estado glial tras el kindling

La neuroglia en el SNC está compuesta por astrocitos y oligodendrocitos; entre sus variadas características muestran generalmente un tamaño menor al de las células neuronales, y no producen potenciales de acción. La proporción de células gliales respecto a las neuronas va incrementándose a lo largo de la escala evolutiva, desde invertebrados donde la glía representa aproximadamente el 25% de las células del sistema nervioso central, pasando por pequeños mamíferos donde el porcentaje es del 65%, hasta alcanzar el ejemplo del cerebro humano, donde podría suponer hasta el 90% de las células. Este incremento y la correspondiente diversificación de funciones de la glía muestra la importancia de su papel en el correcto funcionamiento neuronal (Bak, 2017; Prinz et al., 2017).

Tras el descubrimiento de la glía por Rudolf Virchow en 1858, se consideraba que su papel principal era estructural, de sostén de los somas neuronales, de ello recibió su nombre derivado del griego “*glía*” que significa “unión o pegamento” (Reyes-Haro et al., 2014; Steward et al., 1992), pero a través de los distintos estudios científicos se fue profundizando en sus funciones y actualmente se sabe que

desempeñan importantes papeles tanto de sostén, como en la nutrición neuronal, la comunicación y en cuanto a la defensa del SNC, llevando a cabo funciones propias del sistema inmunitario. Estas funciones permiten que las neuronas se encuentren en condiciones óptimas, gracias a la modulación glial del medio externo en el que tiene lugar la sinapsis (Rodríguez-Contreras, 2011).

La diversidad de funciones de las células gliales es posible debido a su heterogeneidad. Atendiendo al criterio de la función que realizan, podemos clasificarlas en:

- Microglía: desempeña el papel de sistema inmunitario a nivel del tejido encefálico, debido a que las propias células inmunitarias del resto del torrente sanguíneo no pueden traspasar la barrera hematoencefálica. Por ello, la microglía se encarga de reaccionar ante cualquier daño o infección (Chen y Trapp, 2016; Kettenmann et al., 2013; Koellhoffer et al., 2017; Tronel et al., 2017).
- Oligodendroglía: encargada por una parte de la facilitación de la comunicación eléctrica neuronal, al envolver de mielina los axones de las neuronas. Por otra parte, contribuye al soporte metabólico (Lee et al., 2012).
- Glía Ng2: diferenciadas del resto de glía debido a que producen una proteína de membrana denominada NG2, conforman el grupo de menor porcentaje (5-8% del total de células del sistema nervioso) y es el menos conocido. Actualmente existe gran controversia acerca de su función. Se sabe que realiza contactos sinápticos neurona-glía. Además, se ha identificado como precursora de distintos tipos celulares, pero es necesario un estudio a mayor profundidad para dilucidar si los tipos celulares a los que da lugar son exclusivamente oligodendrocitos, o también puede ser precursora de astrocitos y glía de Bergmann (exclusiva del cerebelo) (Bergles et al., 2010; Chung et al., 2013; Djogo et al., 2016).
- Astroglía: dividida a su vez en astrocitos, células endimiales y glía radial. Todas ellas comparten un marcador específico denominado GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) que permite su identificación histológica. La proteína GFAP es una molécula de localización celular, encontrándose tanto en el soma como en las fibras y procesos gliales (Kotagiri et al., 2013). Esta proteína se considera actualmente, además, como un biomarcador de neurotoxicidad debido a que estudios tanto cuali- como cuantitativos han demostrado que se trata de una molécula sensible y específica ante daño en el sistema nervioso (O'Callaghan y Sriram, 2005). Su nombre significa "célula en forma de estrella", otorgado por Michael von Lenhossek en 1891 basándose en su morfología. Su función es la regulación de la homeostasis del cerebro, participan en la nutrición neuronal y en la fisiología de la sinapsis tripartita de forma activa. Se clasifican en astrocitos protoplasmáticos (si se encuentran en la sustancia gris, asociados al soma y las sinapsis) o astrocitos fibrosos (en la sustancia blanca, asociados a axones). Actualmente se sabe que los astrocitos participan en la formación de sinapsis así como en la modulación de la misma (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Perea et al., 2009).

2.8.1. ¿Cómo ocurre la gliosis reactiva?

Tras un trauma, por ejemplo, se produce la activación de la microglía mediante una cascada de señalización que comienza por un incremento de ATP, nucleósidos y nucleótidos, que producen a nivel celular un aumento en las concentraciones de calcio y consecuentemente la activación celular. Al mismo tiempo, estos cambios en la concentración de nucleóticos y nucleósidos además de otros factores implicados en el proceso, transforman a los astrocitos en *astrocitos reactivos* que liberan proteínas tróficas cuyo papel es la neuroprotección y minimización de la pérdida neuronal asociada al trauma. En el tejido, esto se traduce en la formación de nuevas neuritas y sinapsis que permitan reemplazar las pérdidas por el trauma. Otro efecto producido tras este proceso es la *astrogliosis*, o cicatriz formada por los astrocitos (Yamaguchi et al., 2016). Por ello, la reacción glial supone un doble papel en el proceso de recuperación de los tejidos tras un trauma: en primer lugar, facilita la regeneración mediante la liberación del conjunto de moléculas anteriormente descrito; y por otra parte, la astrogliosis reactiva posterior resulta un impedimento físico que limita la regeneración axonal.

La microglía en su forma activada tiene funciones protectoras de las neuronas, sin embargo, puede resultar extremadamente agresiva si está hiperactivada, potenciando, en esa situación, la muerte neuronal (Nácher Carda, 1995; Pekny et al., 2014). Resulta de gran importancia el estudio de esta gliosis reactiva que implica el crecimiento de los denominados nanofilamentos protéicos, formando la cicatriz glial al cabo de un tiempo de sometimiento a estrés, daño, trauma o lesión. Estos procesos determinan tanto los efectos positivos que se observan a corto plazo (neuroprotección), como los negativos observados a largo plazo (impedimento de la neuroplasticidad), en distintas enfermedades: traumas, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas entre otras (Inoue, 2017; Lima et al., 2016; Pekny et al., 2014) (Fig. 11).

En las crisis convulsivas se ha descrito la inducción de la expresión de la proteína GFAP en astrocitos, demostrándose que tras un protocolo de estimulación repetitiva se incrementan los niveles de ARNm de la proteína GFAP; lo cual podría suponer un primer paso en el proceso mediante el cual las crisis inducen la hipertrofia astrocitaria, favoreciendo con ello situaciones de estatus epiléptico (Khaspekov y Frumkina, 2017; Plaza-Zabala et al., 2017; Steward et al., 1992). Los estudios realizados por Nomaru et al., (2014) muestran que los genes pertenecientes a la familia de *c-fos*, regulan la activación de las células microgliales a través de la producción de intermediarios que contribuyen a un incremento en la excitotoxicidad ante la que reacciona la microglía, específicamente en la población hipocampal (Nomaru et al., 2014).

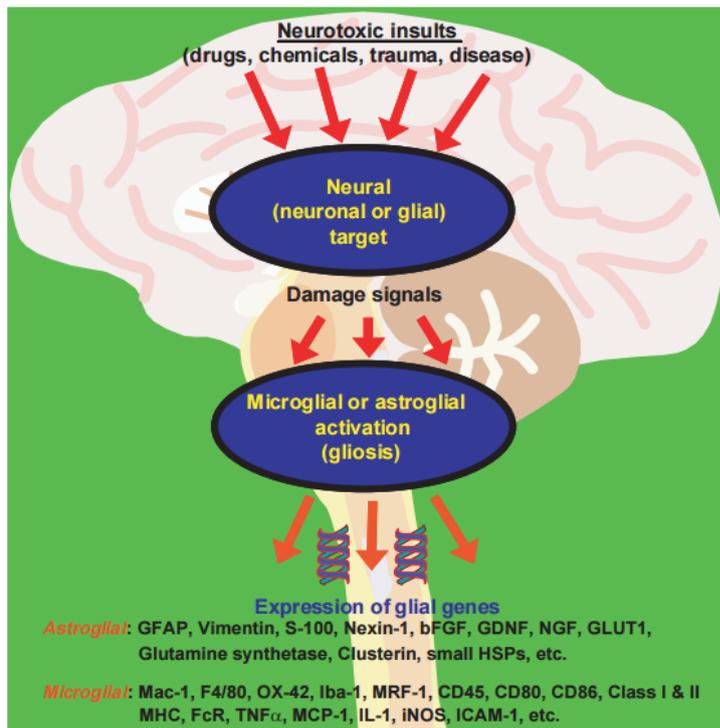
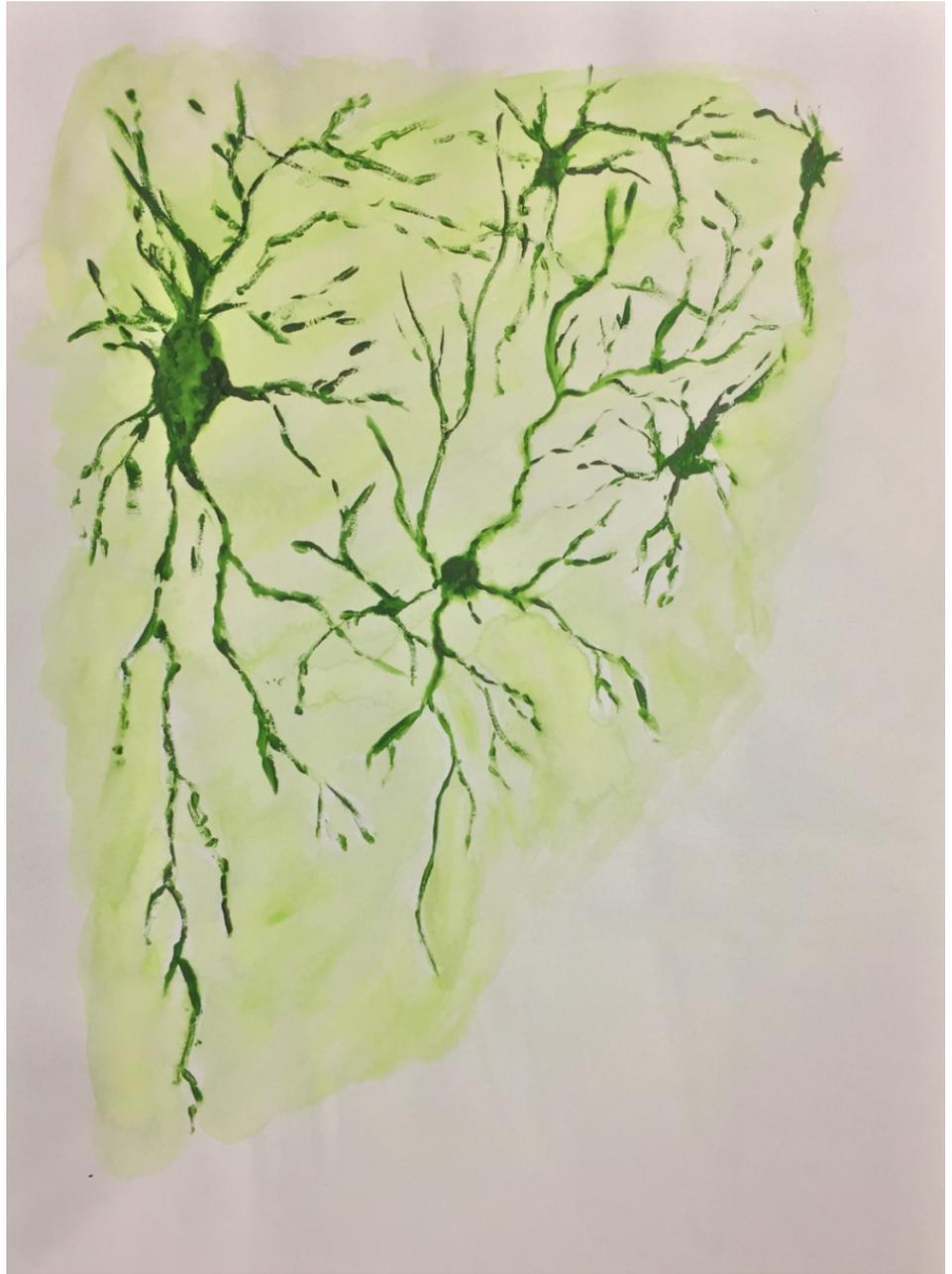


Figura 11. Esquema de los eventos celulares asociados a daño, enfermedad, lesión o tóxicos que inducen la gliosis en el sistema nervioso central. (Fuente: O'Callaghan y Sriram, 2005).

De todo lo anterior se extrae que nuestro modelo de trabajo podría resultar útil para caracterizar las áreas del SNC que se ven afectadas, tanto primaria como secundariamente (reclutadas) por las crisis repetitivas. Por otra parte, la activación selectiva de determinados circuitos neuronales como consecuencia de las crisis epilépticas, puede generar secuencias de comportamientos mantenidos, que son fundamentales para la comprensión de los aspectos crónicos de las epilepsias. Además, el sometimiento al estrés relacionado con las crisis repetidas puede originar cambios tanto agudos como crónicos a nivel fisiológico, comportamental e histológico que repercutan en el sujeto.

Entender la naturaleza de estas alteraciones fisiológicas, comportamentales e histológicas, y de sus implicaciones en la susceptibilidad a posibles nuevos episodios convulsivos resulta de interés para desarrollar nuevas herramientas y pautas de prevención, atenuación o bloqueo de factores de riesgo para el desarrollo de las crisis, aplicables de manera más personalizada a la situación de cada paciente.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La exposición del GASH:Sal a estimulaciones acústicas repetitivas y las consecuentes crisis convulsivas deben inducir procesos de reclutamiento neuronal, acompañados de degeneración y regeneración celular, así como otras alteraciones de diferentes parámetros comportamentales, neuromorfológicos y fisiológicos, de forma más o menos similar a como ocurre en otros modelos experimentales.

3.2. Objetivos

➤ General

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental caracterizar fenómenos relacionados con el desarrollo de crisis convulsivas repetidas y sus consecuencias neuroetológicas, fisiológicas y neuromorfológicas en el hámster GASH:Sal.

➤ Específicos

1. Caracterizar desde el punto de vista neuroetológico las crisis convulsivas originadas por la estimulación acústica repetitiva, o kindling audiógeno, en el GASH:Sal.
2. Estudiar la existencia de procesos de reclutamiento neuronal en áreas cerebrales tras el desencadenamiento de las crisis convulsivas repetitivas.
3. Determinar si existe relación directa entre el kindling y el estrés.
4. Detectar posibles alteraciones fisiológicas, comportamentales y del sistema inmune como consecuencia del protocolo de kindling audiógeno.
5. Analizar el efecto del kindling sobre la muerte neuronal y la neurogénesis en el cerebro del GASH:Sal.
6. Evaluar el estado de la población glial (específicamente la astrocitaria) tras el kindling audiógeno.



4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos, desarrollamos el siguiente esquema de trabajo (Fig. 12):

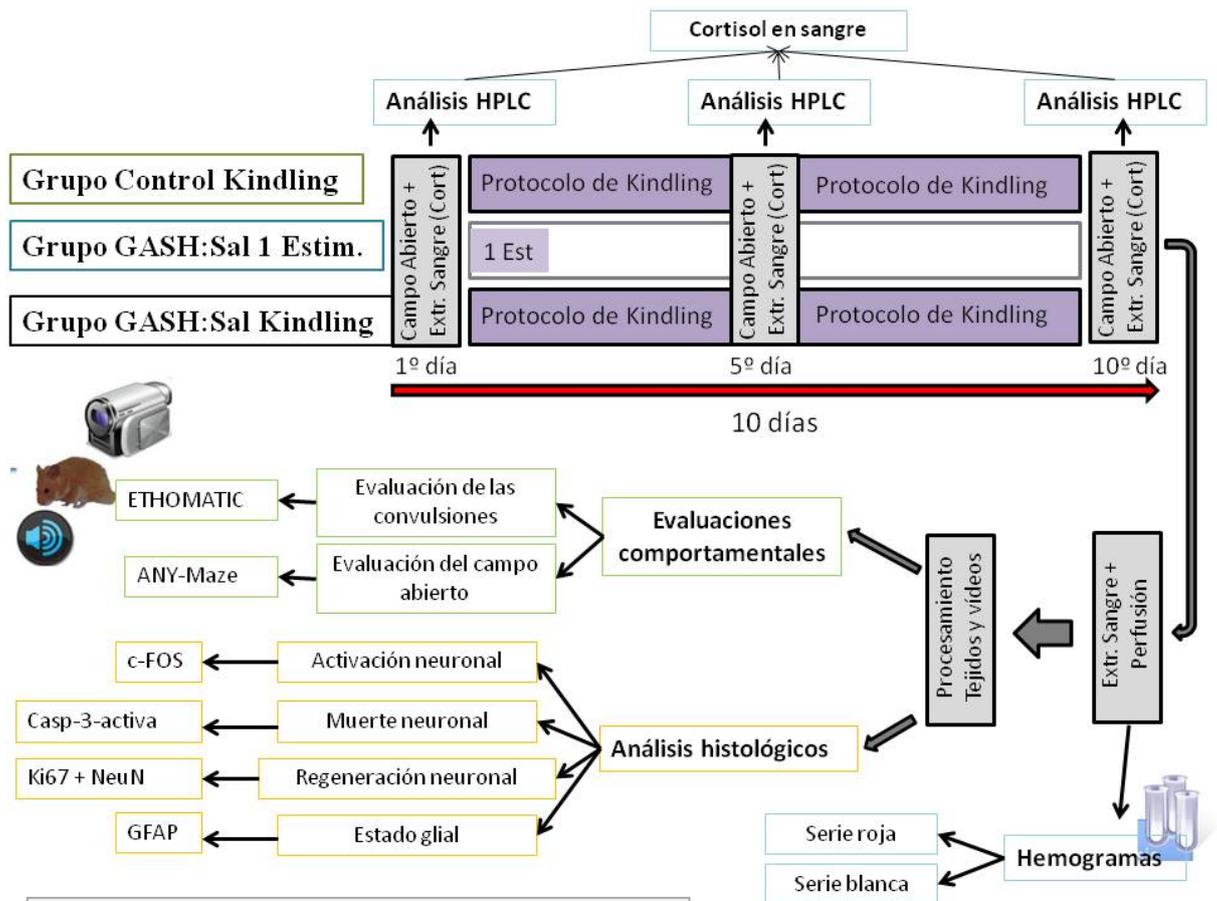


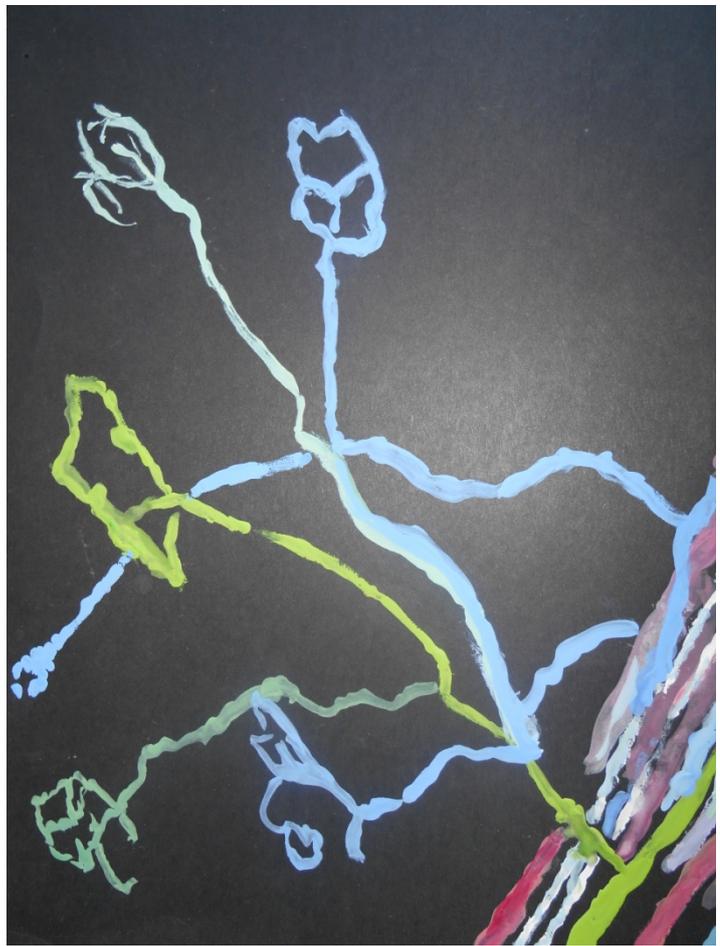
Figura 12. Esquema del diseño experimental llevado a cabo.

1. Para la caracterización neuroetológica en el GASH:Sal y la valoración conductual posterior a las crisis, realizamos dos tipos de análisis.
 - a. Evaluación neuroetológica. Mediante el Software *Ethomatic*. Permite valorar los cambios comportamentales ocurridos en el animal a lo largo de los distintos días de estimulación.
 - b. Evaluación del comportamiento en campo abierto. Mediante el software *ANY-Maze*. Permite evaluar los niveles de estrés y ansiedad del animal a través del análisis de su actividad exploratoria tras su exposición a un ambiente novedoso.
2. Para estudiar la población neuronal implicada en la crisis convulsiva así como el reclutamiento de nuevas áreas tras los procesos de kindling, analizaremos la activación neuronal diferencial de varios núcleos de interés mediante la demostración inmunocitoquímica de *c-fos*.
3. Para medir los niveles de estrés y sus efectos fisiológicos se llevarán a cabo valoraciones de distintos marcadores en sangre: cortisol, corticosterona y parámetros hematológicos.

4. Para evaluar los procesos de apoptosis neuronal se llevarán a cabo los siguientes estudios:
 - a. Mediante la técnica de Nissl se detectarán núcleos picnóticos.
 - b. Demostración inmunohistoquímica de Caspasa-3 activa, que indica que la célula está en la fase de compromiso de la apoptosis.

5. Para analizar la neurogénesis se realizará una doble inmunotinción de los tejidos con Ki67 (proliferación celular) y NeuN (marcador de neuronas maduras), evaluando las diferencias en cuanto a los porcentajes entre uno y otro marcador.

6. Para estudiar la población glial y su posible activación se llevará a cabo una inmunotinción frente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP).



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

En el presente estudio se han utilizado animales de dos líneas de hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*): por una parte, se emplearon animales GASH:Sal machos de dos a cuatro meses de edad, pertenecientes a la colonia establecida en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (USAL); por otro lado, como controles, se emplearon hámsteres sirios Aura, procedentes de Janvier Labs. (Le Genest-Saint-Isle, Francia). En adelante, se referirá a los grupos experimentales como indica la siguiente tabla:

Grupo experimental	Protocolo sometido	N
Hámster control	Kindling audiogénico	11
GASH:Sal una estimulación	Una estimulación acústica	12
Subgrupo A de GASH:Sal kindling	Kindling audiogénico	19
Subgrupo B de GASH:Sal kindling	Kindling audiogénico	18

Tabla 1. Resumen de la nomenclatura de los grupos experimentales utilizados en este trabajo, protocolo de estimulación al que se someten y número de muestra de hámsteres usados en cada grupo.

Durante todos los experimentos, los animales se mantuvieron en el animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL) con libre acceso al agua y alimento y con ciclos de luz y oscuridad establecidos de 12 horas cada uno, siguiendo la legislación vigente (RD 1201/05). Todos los experimentos fueron llevados a cabo según las directrices establecidas para el uso y cuidado de los animales del laboratorio en el Real Decreto 53/2013 y por la Directiva Europea 2010/63/EU, bajo la supervisión del Comité de Bioética de la USAL. Se tomaron las medidas necesarias para la reducción del número de animales utilizados en el estudio, así como para evitar cualquier tipo de maltrato animal. Las condiciones de temperatura se fijaron a 21 ± 2 °C, lo que corresponde al rango de temperatura termoneutral para estas especies (Heldmaier y Steinlechner, 1981).

Del total de 60 animales usados en el trabajo, se sometieron en primer lugar al estudio etológico de las crisis (n=37 GASH:Sal kindling, n=12 GASH:Sal una estimulación y n=7 hámsteres control), de los cuales, 30 se usaron en los estudios comportamentales de campo abierto (n=26 GASH:Sal) y para la caracterización de los niveles de estrés durante el kindling, ampliándose el grupo de hámster control con 4 animales más.

Tras el estudio comportamental, se obtuvieron muestras sanguíneas para la evaluación del hemograma después del kindling audiógeno. Por último, una vez perfundido el animal y procesado el tejido encefálico (n=60), las muestras fueron utilizadas para distintos objetivos, entre los que destacan el análisis de activación neuronal (n=22), estudios de neurodegeneración (n=22) y neurogénesis en colículo inferior e hipocampo (n=4) y estudios del estado glial (n=12).

5.2. Estímulo sonoro y kindling audiogénico

Para la estimulación acústica, se coloca el hámster en un cilindro de metacrilato transparente (altura: 50 cm; diámetro: 37 cm), aplicando un sonido estandarizado de 120 dB SPL de intensidad, y frecuencia de 0-18 kHz, que se reproduce por medio de un ordenador al que se acopla un amplificador (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) y un altavoz de altas frecuencias (Beyma T2010, Valencia, Spain) colocado en la parte superior del cilindro (Fig. 13).

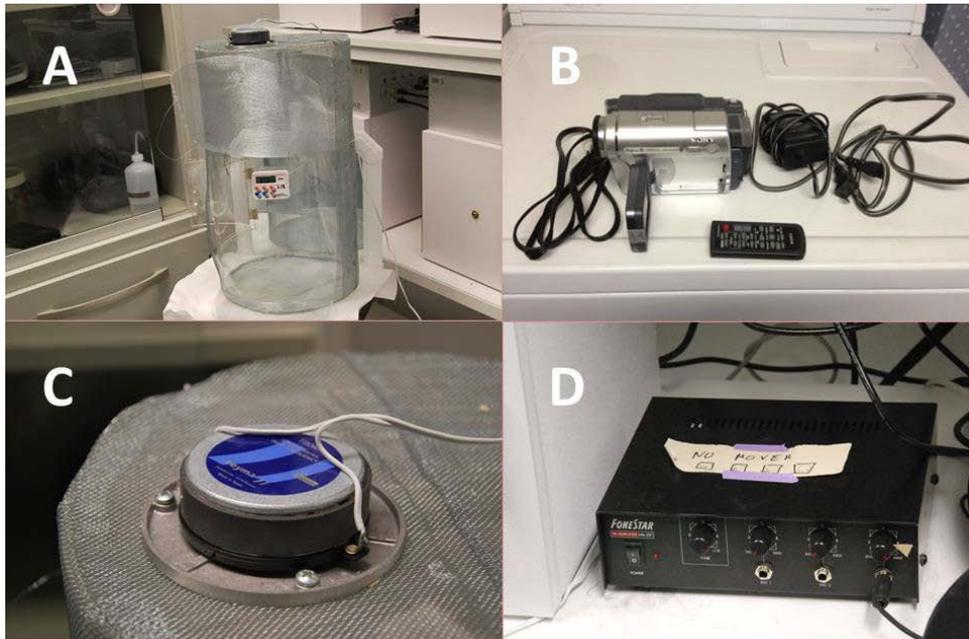


Figura 13. Material utilizado para la estimulación y grabaciones de las crisis. A- Aparataje cilíndrico de metacrilato transparente. B- Cámara de vídeo para la grabación. C- Detalle del altavoz acoplado a la parte superior de la jaula cilíndrica. D- Detalle del amplificador utilizado.

Para la caracterización neuroetológica de las crisis que se originan tras la estimulación, se realiza la grabación en vídeo de todo el proceso. De la grabación, se analizan tres espacios temporales predefinidos: un primer minuto de grabación denominado “periodo de aclimatación”; un segundo tiempo mientras el animal es sometido a estimulación sonora que dura hasta el inicio de la crisis audiogénica (o un minuto en caso de que no desarrolle la crisis); por último, un tercer minuto de grabación del periodo post-ictal.

La crisis se graba en el plano horizontal, utilizando una cámara digital (SONY Modelo N° HDR-CX220E digital HD Video Camera Recorder) a 0,5 m de distancia del cilindro. Se elige el ángulo de grabación frontal por su adecuación para captar íntegramente los diferentes ítems comportamentales que exhiben los animales en todo el período peri-ictal (García-Cairasco et al., 1996; 2004).

El kindling audiogénico se consigue mediante la aplicación de 20 estimulaciones realizadas dos veces al día durante diez días consecutivos, una a las 9:00 h y la segunda a las 19:00h. A este protocolo se someten tanto el grupo de GASH:Sal como el grupo de hámsteres control, tal como se muestra en la tabla 1. Finalmente, se realiza una “estimulación de rebote” a los 15 días.

5.3. Estudio neuroetológico

5.3.1. Adquisición de imágenes y evaluación comportamental

Los vídeos grabados durante las estimulaciones audiógenas se editan con el programa Vegas Movie Maker (Vegas Movie Studio HD Platinum Versión 10.0 SONY), analizándose a continuación la secuencia de comportamientos en cada una de las tres ventanas de observación descritas anteriormente. Las secuencias comportamentales se evalúan anotando segundo a segundo el comportamiento observado en el hámster durante cada una de las etapas, siguiendo los criterios descritos en el diccionario de ítems existente (García-Cairasco et al., 1996), en el que se describen los 110 comportamientos más comunes (anexo 1).

Tras la anotación de los ítems comportamentales, los datos se introducen en el software ETHOMATIC, desarrollado por García-Cairasco (García-Cairasco et al., 1996; García-Cairasco et al., 2004). Este software analiza la información y realiza un análisis estadístico con los datos ingresados, proporcionando valores acerca de la frecuencia y duración de los ítems en cada ventana temporal. Además, indica la existencia o no de correlación entre ítems y de su fuerza mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2). Los datos son transferidos a diagramas de flujo de comportamiento elaborados con Microsoft Power Point 2011, reflejando las secuencias temporo-comportamentales (Fig. 14).



Figura 14. Esquema representativo de los aspectos gráficos y estadísticos que permite evaluar el software ETHOMATIC como resultado de los comportamientos observados. La frecuencia y duración de cada comportamiento es proporcional a la altura y anchura del rectángulo, respectivamente. El grosor de la flecha y la dirección indica la preferencia de asociación entre dos ítems comportamentales y la fuerza con la que se lleva a cabo.

A través del análisis de los resultados arrojados por el Software ETHOMATIC se realiza la evaluación comportamental del efecto de las estimulaciones auditivas en el hámster GASH:Sal y hámster control, mediante los correspondientes diagramas de flujo.

5.3.2. Evaluación de los índices de severidad

Además del estudio etológico, en las crisis convulsivas se valoran dos índices de severidad: un **Índice Mesencefálico (ISc)** y un **Índice Límbico (IL)**, que determinan la participación de distintas áreas cerebrales en los comportamientos observados. El ISc cuantifica parámetros de comportamiento relacionados con áreas troncoencefálicas, mientras el IL describe comportamientos atribuidos a las áreas límbicas.

Los índices de severidad se calculan correlacionando los comportamientos observados durante la crisis con un valor numérico. Cada animal obtendrá el valor asociado al cuadro de comportamientos que haya realizado en su totalidad durante el desarrollo de la crisis convulsiva (tablas 2 y 3). Los valores obtenidos permiten inferir qué conjunto de áreas (troncoencefálicas o límbicas) se encuentra más involucradas en la crisis.

SI	Comportamiento.	ISc
0,0	Sin carrera (giro).	0
0,11	Una carrera y giro.	1
0,23	Una carrera y giros, seguidos de saltos y caídas atónicas (WR 1).	2
0,38	Dos carreras y giros, seguidos de saltos y caídas atónicas (WR 2).	3
0,61	Todos comportamientos anteriores más convulsión tónica con arqueamiento del dorso (CT, opistotonus).	4
0,85	Todos los comportamientos anteriores, seguidos por convulsiones clónicas parciales y generalizadas	5
0,90	Todos los comportamientos anteriores, seguidos por ventroflexión de la cabeza.	6
0,95	Todos los comportamientos anteriores, seguidos por hiperextensión de las patas anteriores (HP1); (Emprototonus) *	7
1,00	Todos los comportamientos anteriores, seguidos por hiperextensión de las patas posteriores (HP2)*	8
	* categorías que se siguen de convulsiones clónicas de la pata posterior (CCPp)	

Comportamiento	IL
<i>Ningún comportamiento típico</i>	0
Automatismos Faciales	1
Mioclónicas de la cabeza	2
Mioclónicas de las patas anteriores y/o posteriores	3
Elevación	4
Caídas	5
Más de tres caídas	6
Carreras, saltos y caídas atónicas	7
Crisis tónico-clónicas	8
* categorías que se siguen de convulsiones clónicas de las convulsiones clónicas de la pata posterior (CCPp)	

Tablas 2 y 3. Índices de Severidad Mesencefálica categorizado (ISc) y de Severidad Límbica (IL), con la correspondencia comportamental tras la estimulación sonora (Fuente: García-Cairasco et al., 1996).

El análisis estadístico de los valores de los índices anteriormente mencionados se realiza en una primera fase a través del análisis no paramétricos de Dunn sobre el test de Fiedman para varias muestras relacionadas, estadísticos que evalúan las diferencias dentro del conjunto de valores dados, entre cada uno de los datos y el resto de ellos. Mediante su aplicación, pueden observarse modificaciones como la tendencia de los valores del índice mesencefálico y del índice límbico. En una segunda fase, se seleccionan tres puntos de la gráficas (inicial, medio y final) en función de la tendencia de los índices, sobre los que se aplica un análisis de contrastes multivariados (Traza de Pillai, Lambda de Wilks, Traza de Hotelling y Raíz mayor de Roy) y pruebas de efectos intra-sujetos (esfericidad asumida, Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt y Límite inferior), que permiten detectar si existen diferencias estadísticas que podrían estar enmascaradas por los test utilizados en la primera fase del estudio.

Durante el protocolo de kindling audiógeno, dentro del análisis etológico de las crisis, también se evalúan las latencias de la carrera salvaje, de la convulsión tónica y de la hiperextensión de la pata anterior (emprototonus); todos los valores se expresan en segundos (s).

5.4. Indicadores comportamentales y fisiológicos de estrés

5.4.1. Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se lleva a cabo mediante la colocación del hámster en una base circular de 1,20 m de diámetro y 50 cm de altura, dividida en tres círculos concéntricos. De éstos, el más grande está segmentado en 12 fracciones de las cuales, la primera (donde se aprecia un semicírculo) constituye la zona de inicio o el lugar en el que se coloca al animal para el comienzo de la prueba. El segundo de los círculos está dividido en 6 zonas. El círculo central no se encuentra segmentado (Fig. 15).



Figura 15. Fotografía del aparato usado para la realización de la prueba de Campo Abierto. Se muestra la disposición de los círculos concéntricos y su numeración. El área semicircular de la zona 1 corresponde al área de inicio de la prueba. La imagen ha sido tomada desde la parte superior, en el lugar en que se encuentra colocada la cámara durante la grabación de la prueba.

La prueba de campo abierto se realiza en una de las salas del animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, libre de interferencias odoríficas de otros modelos animales y con iluminación del círculo central. La cámara de vídeo (SONY Modelo N° HDR-CX220E digital HD Video Camera Recorder) se sitúa a 197 cm en la perpendicular al centro del campo abierto de tal modo que pueda grabar la circunferencia completa, evitando ángulos muertos de grabación.

Los grupos de estudio durante el primer día de estimulación son:

- Hámsteres GASH:Sal sin estimular
- Hámsteres GASH:Sal con una estimulación
- Hámsteres control sin estimular
- Hámsteres control con una estimulación

Mientras que para los días 5° y 10° de estimulación, los animales se presentan organizados en los siguientes grupos de estudio:

- Hámsteres control sometidos a kindling
- Hámsteres GASH:Sal con una única estimulación
- Hámsteres GASH:Sal subgrupo A de kindling
- Hámsteres GASH:Sal subgrupo B de kindling

La prueba de campo abierto se inicia transcurridos 10 minutos tras la estimulación sonora del animal. En el momento en que el animal es introducido en la zona semicircular externa del campo abierto, se inicia la grabación. El comportamiento del animal se graba durante 7 minutos, usando la misma cámara de vídeo empleada para el estudio etológico. Posteriormente, el vídeo es analizado con el software ANY-Maze (ANY-Maze Video Tracking System Versión 4.99m) que permite evaluar numerosos parámetros. Para el estudio, seleccionamos un total de 21 parámetros: “Distancia total recorrida”, “Velocidad media”, “Tiempo total móvil”, “Tiempo total inmóvil”, “Máxima velocidad”, “Latencia de la primera entrada al área de inicio”, “Latencia de la primera salida del área de inicio”, “Entradas en la periferia”, “Tiempo en la periferia”, “Distancia en la periferia”, “Tiempo móvil en la periferia”, “Tiempo inmóvil en la periferia”, “Distancia en el centro”, “Latencia de primera entrada en el centro”, “Tiempo total en el centro”, “Tiempo inmóvil en el centro”, “Número de entradas en el centro”, “Tiempo móvil en el centro”, “Acicalamiento”, “Elevaciones” y “Escudriñar”.

Los datos se someten al análisis estadístico, empleando la prueba de ANOVA, test de Bonferroni (en las situaciones de varianzas homogéneas) y test de Games-Howell (en los casos de varianzas no homogéneas) mediante el programa SPSS (IBM SPSS Statistics 21).

Posteriormente, se agrupan los parámetros comportamentales para facilitar la evaluación de las diferencias entre los grupos de estudio. Así, se valoran por un lado los parámetros relativos al movimiento (o actividad locomotora) y actividad exploratoria; por otra, los comportamientos relativos al estrés, que son fundamentalmente los comportamientos de acicalamiento y la ausencia de actividad motora.

5.4.2. Determinación de los niveles de glucocorticoides en sangre

La determinación de los niveles de cortisol y corticosterona en sangre se lleva a cabo mediante la extracción de aproximadamente 200 µl de sangre de los animales de estudio. La extracción se realiza los mismos días en los que se lleva a cabo la prueba del campo abierto, a los 20 minutos de la estimulación acústica y a los 3 minutos de la finalización del campo abierto.

Para la extracción de las muestras de sangre, los animales se anestesian usando Isoflurano inhalado, con unas condiciones de inducción de 4% isoflurano y 1 l/min O₂ y unas condiciones de mantenimiento de 3% de isoflurano y 0,4 l/min O₂, pudiendo estas últimas variar en función del animal. Una vez anestesiado, se inmovilizan las extremidades superiores y la cabeza del animal, se localiza el punto de incisión de la aguja mediante la ubicación del modiollo y la clavícula del hámster y se procede a

la extracción de la sangre. Finalmente, se realiza una inyección subcutánea de suero fisiológico al 0,9% del mismo volumen de sangre extraída para rehidratar al animal, se coloca en una atmósfera con niveles ricos de oxígeno y sobre una manta térmica, a fin de facilitar la recuperación.

Las muestras sanguíneas se mantienen una hora de reposo a 37°C y treinta minutos a 4°C, centrifugando a continuación a 4°C y 1500 rpm durante 15 minutos, para obtener aproximadamente 100 µl de suero. Las muestras de suero se analizan mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), empleando como herramienta de detección un espectrómetro de masas con ionización por electrospray en modo positivo. En las condiciones del análisis, el límite de detección es de 0,1 µg/dL. El tiempo transcurrido entre la extracción del suero y su análisis por HPLC varía entre las 2 y las 24 horas tras la extracción, manteniéndose a una temperatura de 4°C en el primer caso y a una temperatura menor (-20°C) en la segunda situación (Muñoz de la Pascua, 2004).

5.5. Reclutamiento neuronal

5.5.1. Extracción y procesamiento de las muestras cerebrales

Tras la finalización de las pruebas conductuales, los animales a estudiar (n=60) reciben una sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico 60 mg/kg i.p.), y, una vez comprobada su arreflexia total, son perfundidos transcardialmente. Para ello, se coloca en posición supina al animal y se descubre la caja torácica procediéndose a la separación de la piel del tejido subyacente. Una vez alcanzado el diafragma, se secciona junto con las costillas. Posteriormente, se inyecta una dosis de 0,08 ml de heparina directamente en el corazón y se realiza una incisión en el miocardio por donde se inserta la cánula de perfusión que debe asomar por la aorta. Tras fijar la cánula para que no se mueva durante el procedimiento, se procede a la perfusión con 100 ml de suero Ringer (NaCl al 0,9% en tampón fosfato (PB), 0,1M pH 7,5) seguido de 200 ml de paraformaldehído (PF) al 4% en PB 0,1M. Tras la perfusión, se extrae el cerebro de la cavidad ósea manteniéndolo en post-fijación en la misma solución de PF entre 2 y 6 horas. Finalmente, se marca la lateralidad mediante una aguja situada caudo-rostralmente en el hemisferio izquierdo y se crioprotege por inmersión en una solución de sacarosa al 30% en PB durante 48-72 horas a 4° C.

Al inicio del proceso de perfusión, se extraen aproximadamente 0,8 ml de sangre por punción cardiaca, que será utilizada para la determinación del hemograma. Esta sangre se mantiene a 4°C en un recipiente con EDTA hasta su análisis en el Hemocitómetro Advia 120, Bayer, transcurridas entre 2 y 4 horas tras su extracción.

Posteriormente, el cerebro se corta empleando un micrótopo de congelación (HM 400 de Microtom, Heidelberg, Alemania) obteniéndose secciones histológicas coronales de 40 µm de grosor, que se alojan secuencialmente en 6 pocillos conteniendo PB 0,1M pH 7,5. Cada uno de los pocillos se destina a la visualización de distintos marcadores, de acuerdo al objetivo de estudio. Una vez procesadas las muestras, las secciones son situadas en orden caudo-rostral sobre un portaobjetos, utilizando una solución

de gelatina al 0,2% en tampón Tris HCl 0,05 M pH 7,6. Por último, en las preparaciones que se estudian con el microscopio de luz visible (*c-fos*, GFAP y caspasa-3-activa), las secciones se someten a un proceso de deshidratación empleando una serie de alcoholes de concentración ascendente, se aclaran y finalmente se protegen con un cubreobjetos, sellándolos con Entellán (Merck, Darmstadt, Alemania). En las preparaciones que se estudian con el microscopio empleando luz fluorescente (NeuN y Ki67) no se realiza la deshidratación de los cortes, sino que las secciones se cubren con un medio de montaje acuoso (VectaShield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H-1200, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010 o glicerol-PBS al 50% / VectaShield).

5.5.2. Protocolo de inmunotinción

Las secciones histológicas son pre-tratadas durante 5 minutos con una solución de H₂O₂ al 10% en agua destilada, seguido de 30 minutos de incubación en solución de bloqueo (suero bobino fetal (SBF) al 3% en TBS conteniendo Tritón X100 al 0,3%), con el objetivo de reducir la actividad antigénica inespecífica. Posteriormente, los pocillos se incuban durante 48 horas a 4°C con el anticuerpo primario específico (Ver tabla III) diluido a una concentración determinada en TBS-0,3% Tritón X-100 y 10% SBF. Tras tres lavados en solución de TBS, las secciones se incuban con un anticuerpo secundario biotinado IgG correspondiente, en dilución 1:200 en TBS-Tx 0,05M pH 7,6 durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incuban durante 90 minutos a temperatura ambiente en el complejo ABC, Avidina-Biotina-Peroxidasa (Standard-kit #PK 4000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, EEUU), siguiendo el procedimiento descrito por Hsu et al. (1981). Para visualizar el sitio de unión del anticuerpo primario con el antígeno, se realiza el proceso de revelado utilizando un kit comercial que contiene DAB (Peroxidase Substrate Kit, #SK-4100, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, EEUU). El tiempo de incubación de las secciones histológicas en la solución de revelado es de 30 minutos aproximadamente, y se realiza bajo control visual. El protocolo detallado se puede consultar en el anexo 2.

5.5.3. Análisis cualitativo de expresión de *c-fos*

Las imágenes a estudiar se digitalizan mediante una cámara digital acoplada a un microscopio Leica (Leica Leitz DMRB, CX9000 MBF Bioscience), el proceso se lleva a cabo empleando el software Neurolúcida (versión 10) (MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA) mediante la realización de mosaicos a 20 aumentos. Para la identificación de las áreas cerebrales y la orientación de las secciones a estudiar se utiliza el Atlas estereotáxico del cerebro de hámster dorado (Lawrence et al., 2001).

El mapeo cualitativo permite evaluar el reclutamiento neuronal mediante la elaboración de un gradiente de color. Las imágenes del mapeo fueron maquetadas con su imagen correspondiente del atlas estereotáxico con ayuda del programa PowerPoint (Microsoft Office PowerPoint Versión 2013).

El gradiente de color establece los tonos rojo y verde correspondientes a las áreas de mayor activación neuronal y los tonos azules, rosas y amarillos como las áreas de menor activación (Fig. 16).

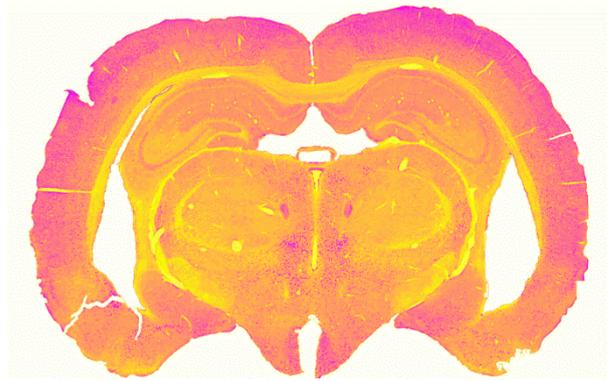


Figura 16. Ejemplo de la sección Bregma - 2.9 mm, correspondiente a un hámster GASH:Sal sometido a una estimulación; tras el tratamiento de imagen en el ImageJ para el gradiente de color.

Para realizar este gradiente de color se utiliza el Pluggin Normalization Intensity Vs Gradiend del software ImageJ 1.48v [Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_20 (32-bit)] seguido del análisis denominado “6 Shades”.

Debido a su importancia tanto en el sistema auditivo como en el circuito límbico y por sus implicaciones en las crisis epilépticas descritas en la bibliografía, se seleccionan una serie de núcleos tras la observación del mapa caudo-rostral: Colículo Inferior, Locus Coeruleus, Sustancia Gris Periacueductal, Hipocampo, Núcleo Hipotalámico Paraventricular y Complejo Amigdalino (Núcleo Basolateral Amigdalino y Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal), en los que se lleva a cabo un análisis cuantitativo de expresión de *c-fos* en las distintas situaciones experimentales propuestas (ver tabla de los grupos experimentales).

5.5.4. Análisis cuantitativo de la expresión de *c-fos*

Las secciones de los núcleos seleccionados se digitalizan con un microscopio Olympus BX5 acoplado al programa dotSlide versión 2.1 (Olympus Soft Imaging Solutions), software avanzado de captura de imágenes a gran resolución. La visualización de las imágenes se realiza a través del programa específico OlyVIA 2.6 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, LEAD Technologies).

Posteriormente, mediante el programa GIMP 2.8.14 (Programa de manipulación de imágenes de GNU) se superpone el núcleo de interés con su correspondiente plantilla obtenida del Atlas estereotáxico del cerebro de hámster dorado (Lawrence et al., 2001) para facilitar un recorte preciso de los bordes del núcleo.

Finalmente, las imágenes se analizan con el propósito de conocer la densidad neuronal, para ello mediante el programa ImageJ 1.48v, se realiza un conteo automático de núcleos neuronales inmunorreactivos a *c-fos* y se calcula la densidad de cada sección tras la medición de la superficie total

del área seleccionada previamente de forma manual. Los datos obtenidos se someten al análisis estadístico mediante el programa SPSS (IBM SPSS Statistics 21).

Como núcleo neuronal inmunopositivo a *c-fos* se toma todo aquel que presenta un diámetro que oscila entre los 7 y los 10 μm .

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa SPSS extrayéndose las siguientes informaciones en forma de representaciones gráficas: una gráfica comparativa de los cuatro grupos de estudio para la densidad del núcleo medida en Cél/s / mm^2 , una gráfica del porcentaje de variación de los grupos GASH:Sal en las diferentes condiciones experimentales frente al control kindling y finalmente, un estudio caudo-rostral de las variaciones observadas entre los distintos grupos para cada una de las secciones analizadas.

5.6. Estudio de neurodegeneración

La extracción y procesamiento de los encéfalos se lleva a cabo de acuerdo a la rutina establecida en el apartado de técnicas para el estudio del reclutamiento neuronal y se emplean las secciones histológicas de los pocillos número 4.

Para determinar la presencia de signos neurodegenerativos a nivel celular, el estudio se orienta a detectar indicios de apoptosis en dos momentos del proceso, mediante las siguientes técnicas:

5.6.1. Técnica de NISSL

Facilita el reconocimiento arquitectónico de los encéfalos analizados y la identificación de las áreas y regiones de estudio. También permite la visualización de núcleos picnóticos en neuronas en proceso de degeneración, lo cual puede ayudar a identificar células que podrían estar sufriendo el proceso de apoptosis. El protocolo de tinción empleado puede consultarse detallado en los anexos (anexo 3).

5.6.2. Demostración inmunocitoquímica de caspasa-3 activa

La caspasa-3 activa marca el comienzo de la apoptosis, al revelar la fase de compromiso celular. Las secciones histológicas son procesadas siguiendo el protocolo de inmunohistoquímica descrito (Tabla 4).

Para el estudio se seleccionan tres núcleos, el Colículo Inferior, Sustancia Gris Periacueductal e Hipocampo. Las imágenes se analizan a 40 aumentos, utilizando un microscopio Leica SP2 Laser Confocal (Leica TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope) acoplado al programa Leica Confocal Software (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH).

Cuantificación densitométrica

La cuantificación de la caspasa-3 activa se realiza mediante análisis densitométricos de imágenes convertidas a 8 bits con el software ImageJ 1.48v. Las imágenes se normalizaron empleando una escala de grises (#32599, Edmund industrial Optics), de la cual se tomaron fotografías de los distintos niveles de gris en las mismas condiciones de luz que las fotografías realizadas previamente de las secciones elegidas.

Análisis estadístico

Los datos de la inmunotinción frente a caspasa-3 activase analizaron mediante el programa SPSS, evaluándose los valores de la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos se compararon mediante un ANOVA acompañado de comparaciones múltiples post-hoc. El nivel de significación estadística aceptado fue $p < 0,05$.

5.7. Evaluación de la neurogénesis

La bibliografía consultada permite la selección de una serie de áreas relevantes, seleccionándose en este caso para su evaluación el Colículo Inferior (niveles de bregma -6 mm, -5,7 mm y -5,4 mm) y el Hipocampo (tanto en el Giro dentado como CA1, CA2 y CA3), la zona subventricular, así como el hipotálamo, la amígdala y la corteza piriforme, por su importancia en el circuito límbico y sus implicaciones en el supuesto experimental descrito.

Las secciones son procesadas acorde al protocolo de inmunohistoquímica descrito (Tabla 4). Se realizó una evaluación de las imágenes que permitiera demostrar la existencia de nuevas neuronas en dichas áreas.

5.8. Estudio de la población glial

Tras llevarse a cabo el protocolo de inmunotinción correspondiente (Tabla 4), las imágenes se digitalizan a 5 aumentos empleando un microscopio Leica DMRD y el sistema Neurolúcida acoplado al software NeuroExplorer. Se realizan las imágenes del núcleo completo a tres niveles rostrocaudales diferentes: en el caso del Colículo Inferior, -6,0 mm, -5.7 mm y -5.4 mm respecto a Bregma; en el Hipocampo, a -1,8 mm, -1.2 mm y -0,9 mm (Lawrence et al., 2001).

La evaluación de las imágenes se lleva a cabo atendiendo al protocolo descrito por Blanco et al., (2015). El estudio cuantitativo para detectar diferencias entre los grupos (Ver tabla 4) se realiza mediante la determinación del porcentaje del área ocupada por células GFAP inmunoreactivas en una región concreta, en comparación con el área total de dicha región. Para ello se utiliza el software ImageJ, las imágenes se transforman a blanco y negro, se selecciona manualmente el área total del núcleo y se determina su área; a continuación se calcula el área que ocupan las partículas inmunoteñidas y se halla el porcentaje ocupado respecto al área total del núcleo (Blanco et al., 2015).

Antígeno	Ig Primario	Dilución	Referencia	Ig Secundario	Dilución	Referencia
<i>c-fos</i>	Rabbit anti- <i>c-fos</i>	1:2000	# pc-38 Calbiochem EMD Chemicals	Goat Anti-Rabbit	1:200	#673371 MP Biomedicals
Caspasa	Rabbit anti-Caspasa	1:1000 1:500	#9661 Cell Signaling Technology	Goat Anti-Rabbit	1:200	#673371 MP Biomedicals
GFAP	Mouse anti-GFAP	1:500	G6171 Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania	Horse Anti-Mouse	1:200	BA- 2000 Vector Laboratories
Ki67	Rabbit anti-Ki67	1:1000	AB- 15580Abcam, Cambridge, UK	Goat Anti-Rabbit	1:200	#673371 MP Biomedicals
NeuN	Mouse anti-NeuN	1:5000	MAB377 Chemicon S.A. Sao Paulo	Horse Anti-Mouse	1:200	BA- 2000 Vector Laboratories

Tabla 4. Relación de anticuerpos usados en las reacciones inmunohistoquímicas.



6. RESULTADOS

6.1. Estudio neuroetológico de las crisis convulsivas repetitivas en los grupos de estudio

6.1.1. Estudio de la primera crisis convulsiva en el GASH:Sal

El diagrama de flujo representativo de la primera crisis convulsiva en el grupo de animales GASH:Sal sometidos a una única estimulación presenta la siguiente estructura: en la ventana pre-estímulo (PRE), se observan comportamientos aislados, exploratorios y de acicalamiento (cuadros azules). La segunda fase, o ventana de estimulación (SONIDO) comienza con un sobresalto, tras el cual, el animal inicia la fase de carrera salvaje (cuadros amarillos), con una latencia de aproximadamente dos segundos. A continuación, comienza la ventana post-estímulo (POST) con la aparición de las convulsiones tónico-clónicas (cuadros rojos). El desarrollo de la fase convulsiva presenta los siguientes elementos: convulsión tónica (CVT), Flexión de la cabeza (FLC), hiperextensión de la cabeza y miembros superiores e inferiores (HP1 Y HP2), seguido de sacudidas clónicas de los miembros superiores (CCSA) e inferiores (CCSP) y finalmente un periodo de inmovilidad post-ictal del animal (IPI) (Fig. 17).

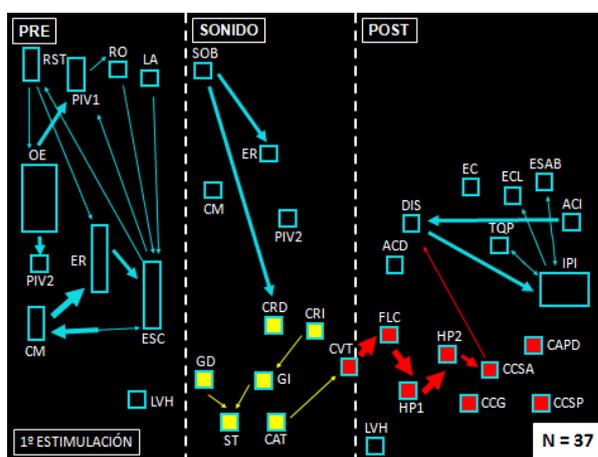


Figura 17. Etograma donde se muestran los resultados de la primera crisis audiogénica del GASH:Sal. Los datos reflejan la secuencia de ítems comportamentales y la relación que presentan entre ellos en diferentes momentos de la crisis. Se representan las tres ventanas de estudio durante la fase de pre-estimulación (PRE), la fase de estimulación sonora (SONIDO) y la fase post-estimulación (POST) (n=37). La descripción de los ítems comportamentales correspondientes a las abreviaturas que aparecen en la figura se encuentran en el anexo 1.

6.1.2. Estudio neuroetológico tras la primera estimulación sonora en controles

El mismo procedimiento de evaluación comportamental se realiza en los hámsteres del Grupo control. En este grupo de animales, el análisis del etograma muestra un comportamiento diferente a lo observado en el grupo GASH:Sal, pues no desarrollan crisis convulsivas tras la estimulación acústica.

El hámster dorado control presenta en la ventana de pre-estímulo comportamientos exploratorios similares a los observados en la ventana análoga del GASH:Sal. Se aprecia menor frecuencia en los comportamientos exploratorios [olfatear (OE), caminar (CM), erecto (ER) y escudriñar (ESC)] y de autolimpieza [limpiar las garras (LGF), roer (RO) y lamer (LA)].

Al comienzo de la ventana de SONIDO, el grupo de hámsteres control presenta un sobresalto (SOB) y algunos de los ítems relativos a la carrera salvaje, como carrera hacia derecha (CRD) e izquierda (CRI), saltos (ST) y caídas (CAT). Sin embargo, estos comportamientos no desembocan en una convulsión tónico-clónica y en su lugar, tras la etapa de carrera, aparecen nuevos ítems exploratorios. En

carrera salvaje con giro hacia la derecha; por último, en la 8ª estimulación tras el sobresalto se sucede el comportamiento caminar.

En esta ventana de SONIDO, el animal presenta comportamientos de carrera salvaje, sin apenas interacción con otros ítems durante las primeras estimulaciones que, a medida que va desarrollándose el proceso de kindling audiógeno, comienzan a interactuar de manera clara: correr (CR) interactúa con los giros a derecha e izquierda (GD y GI), saltos, caídas atónicas, y aparecen comportamientos aislados (caminar, erecto, escudriñar).

Los animales presentan convulsiones tónico-clónicas después de la carrera salvaje, en la mayoría o la totalidad de las 20 estimulaciones acústicas. La ventana refleja pocos ítems comportamentales diferentes debido a la rapidez con que los animales alcanzan las convulsiones tónico-clónicas. Sin embargo, a lo largo del kindling se observa la separación de los hámsteres en dos grupos de respuesta. Los animales que tienen convulsiones tónico-clónicas (subgrupo A) no recuperan su actividad exploratoria basal durante el minuto de duración de la ventana post-estímulo. El periodo post-estímulo se inicia con las convulsiones tónicas (CVT) y va seguido de una secuencia lineal de comportamientos: flexión de cabeza hacia abajo e hiperextensión de las patas anteriores y posteriores. Los comportamientos de disnea (DIS) e inmovilidad post-ictal, cuyo tiempo se incrementa proporcionalmente a lo largo del protocolo del kindling, se presentan durante el final de la fase post-estímulo. Esta secuencia se mantiene constante durante las 20 estimulaciones. Los comportamientos exploratorios y de congelación aparecen en el subgrupo con crisis no constantes (subgrupo B) (Ver tabla 1) a lo largo del kindling (Fig. 19).

Un análisis de los etogramas en función del día de estimulación revela que:

- En el 2º estímulo, durante la ventana de Pre-estímulo, disminuyen tanto los ítems comportamentales como las interacciones entre ellos, dando lugar a una red lineal de comportamientos más consolidada. En la ventana de presentación del sonido, tras el sobresalto, el animal se coloca erguido y suceden los comportamientos de carrera salvaje, sin apenas interacción entre ellos. Posteriormente, durante la fase de Post-estimulación, se inician las convulsiones tónico-clónicas, con flexión de cabeza e hiperextensiones de patas anteriores y posteriores.
- En los estímulos 5º y 6º se observa un incremento de interacciones entre los distintos ítems comportamentales en todas las ventanas del estudio. Este incremento se mantiene en todas las estimulaciones siguientes.
- En la 5ª estimulación durante el periodo Post-estímulo aparece un nuevo ítem, masticación (MT), que se clasifica como de origen límbico y aparece en la mayoría de las estimulaciones posteriores (de la 6ª a la 20ª y en la estimulación de rebote). Además, en las estimulaciones 8ª, 11ª y 19ª el ítem masticación se relaciona con el de inmovilidad postictal.
- En la estimulación 7ª, encontramos una altísima interconexión en los ítems comportamentales de exploración tanto en el periodo pre-estímulo como en el post-estímulo. Además, a partir de esta

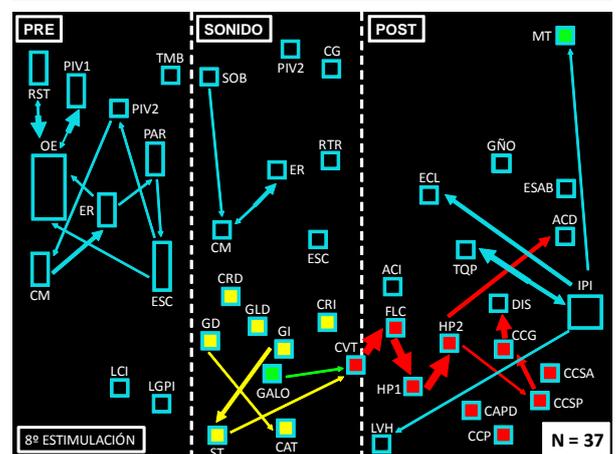
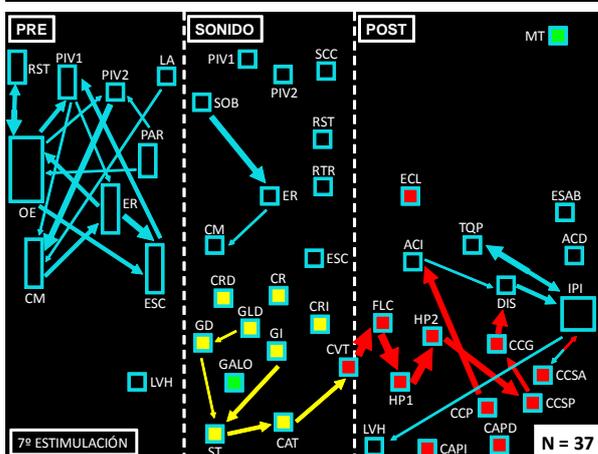
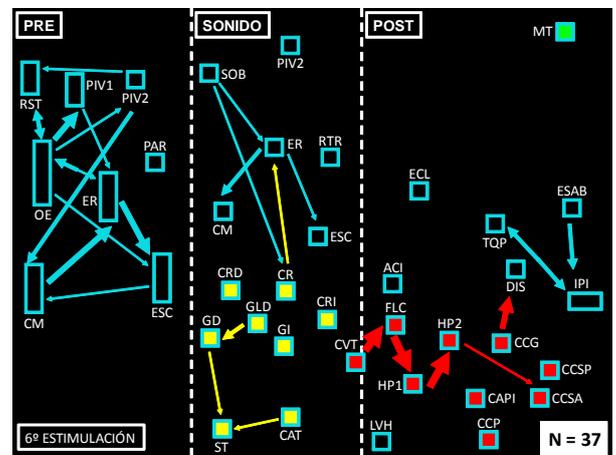
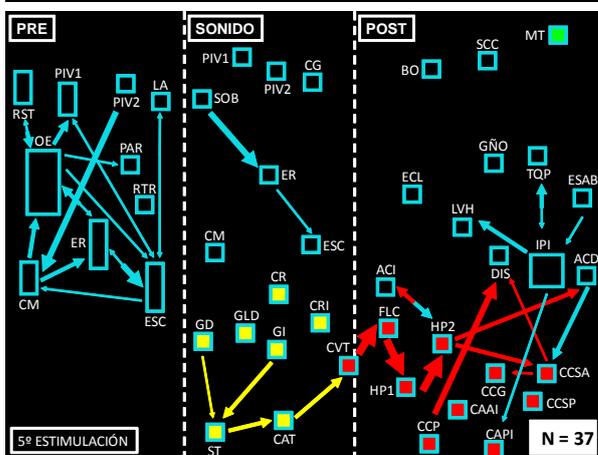
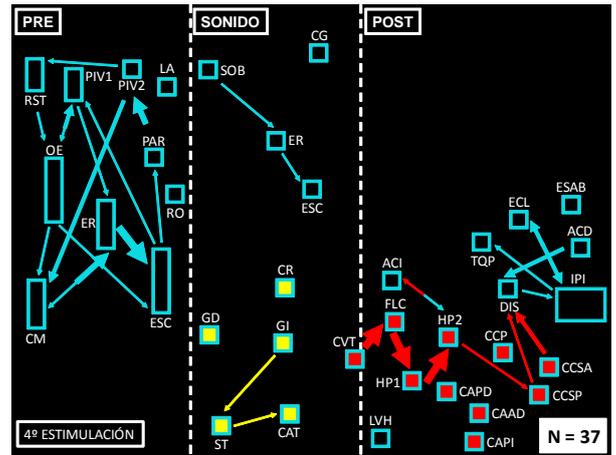
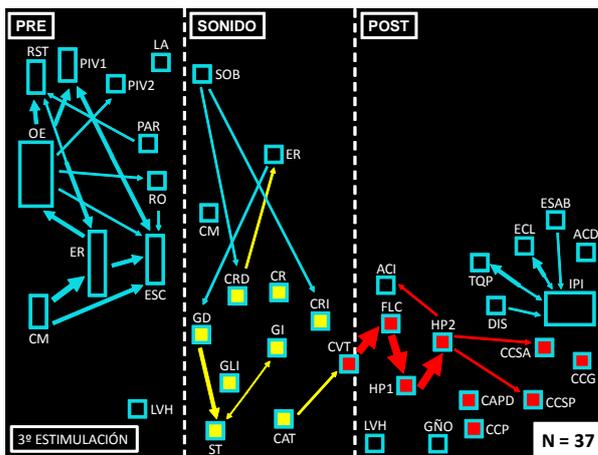
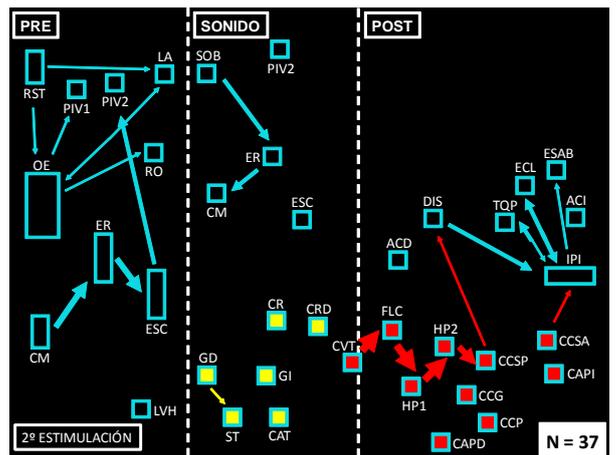
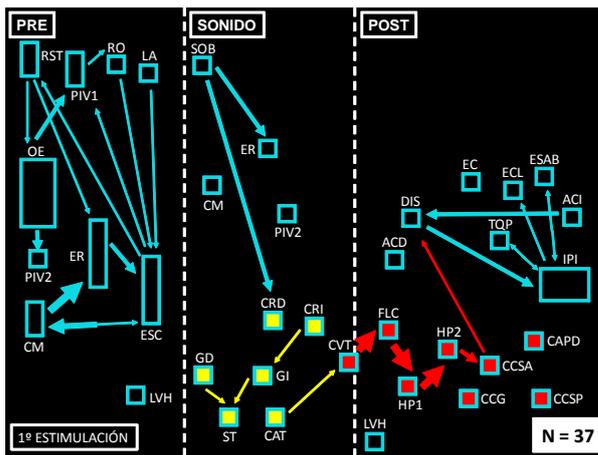
estimulación, aparece un nuevo ítem comportamental, galope (GALO), también de origen límbico; primero de forma aislada, para interaccionar posteriormente de forma débil con las caídas, los giros a la derecha y los saltos (esta última interacción incrementa su fuerza a partir de la estimulación 17^a hasta la 20^a).

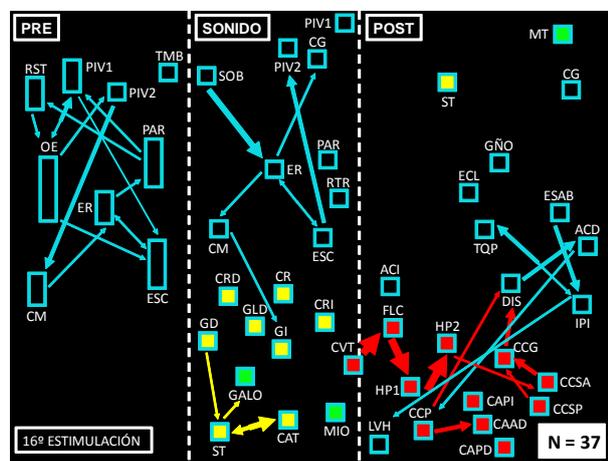
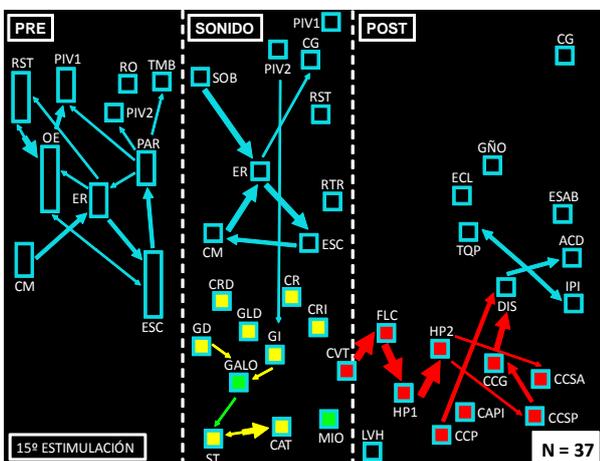
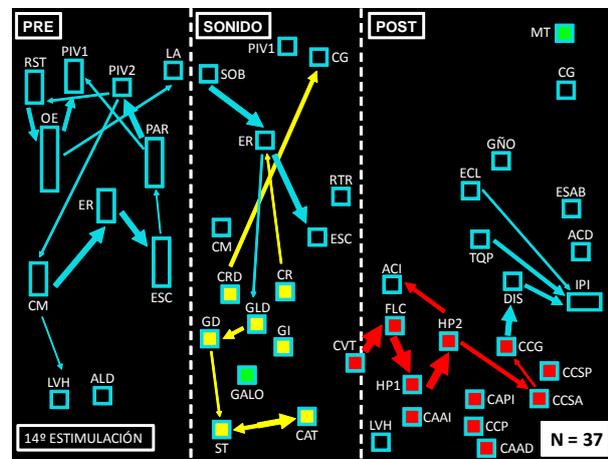
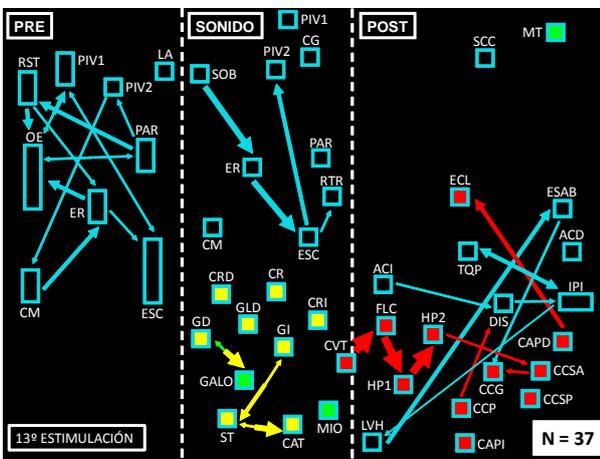
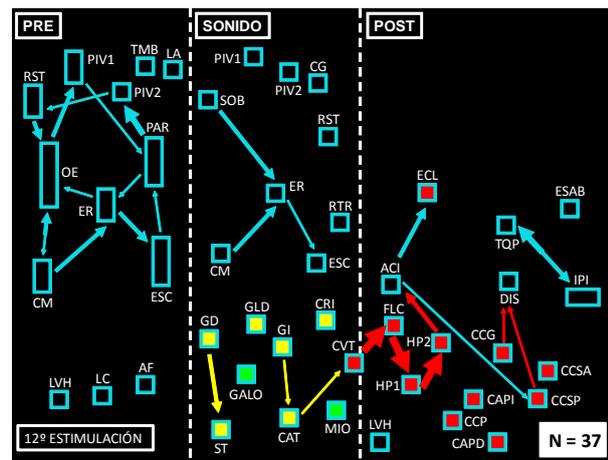
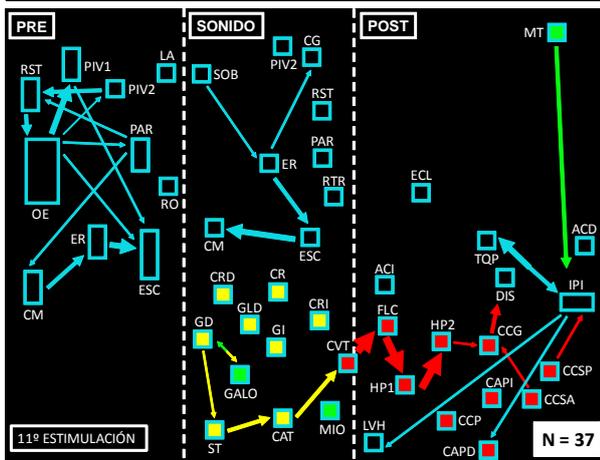
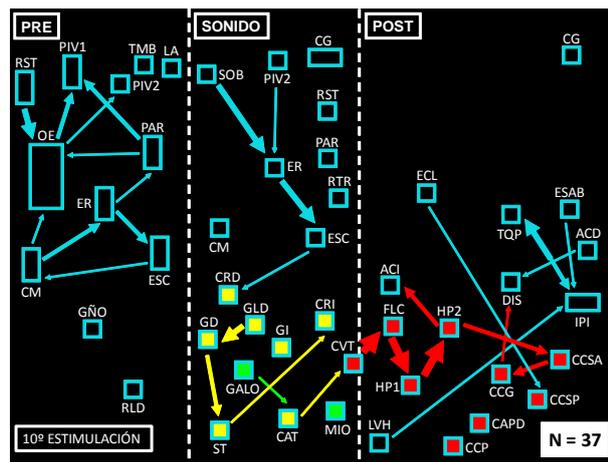
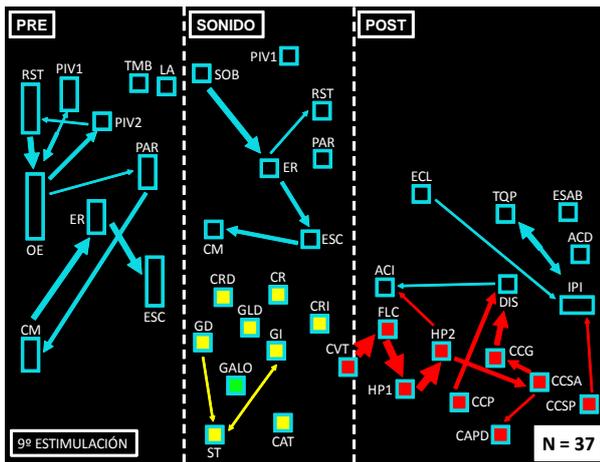
- En la 10^a estimulación aparecen las mioclonías (MIO) durante la fase de presentación del sonido. Este nuevo ítem, de origen límbico, se mantiene más o menos constante a lo largo de las siguientes estimulaciones.

En la **estimulación de rebote**, se observa que en la ventana pre-estímulo se mantiene la misma riqueza en comportamientos exploratorios y de autolimpieza que presenta el animal durante las últimas estimulaciones del kindling. Destacan por su importancia en cuanto a la frecuencia con la que aparecen los ítems de oler exploratorio, erguido, escudriñar y, en menor medida, rastrear (RST), mover la cabeza de lado a lado (PIV1), mover el cuerpo (PIV2) y caminar. Además, oler exploratorio también se observa durante esta estimulación con una duración superior a la media. Presenta los comportamientos de roer y lamer, que se encuentran presentes de forma intermitente y en ocasiones por separado desde el primer estímulo.

En la ventana del estímulo, se mantiene el sobresalto como respuesta al inicio del sonido, seguido de la posición erguido; ambos ítems están interrelacionados, aunque con menor fuerza de interacción que en las estimulaciones anteriores. Existe, además, menor variedad de comportamientos así como una menor interrelación entre ellos, a diferencia de lo obtenido en las últimas estimulaciones del kindling. Sin embargo, tras el comienzo de la carrera salvaje, se mantienen interacciones similares a las observadas en las últimas fases del kindling. Además, aparece galope dentro de las manifestaciones de carrera salvaje.

Al realizar el protocolo del kindling, se confirma la existencia de un subgrupo de animales de la cepa GASH:Sal que no presenta convulsiones tónico-clónicas de forma permanente tras el estímulo sonoro, el subgrupo B.





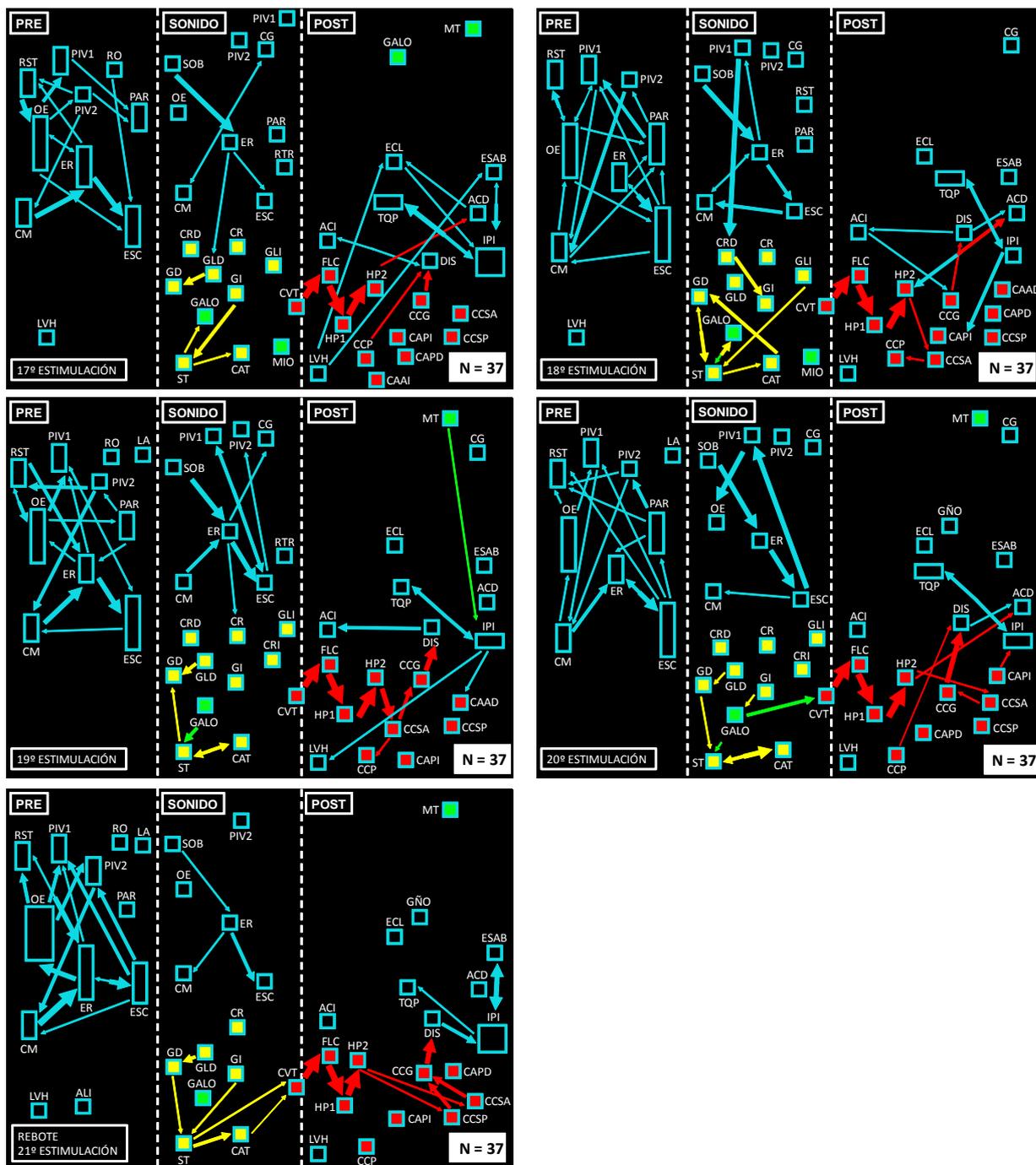


Figura 19. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal durante las 20 estimulaciones más la estimulación rebote del protocolo de kindling.

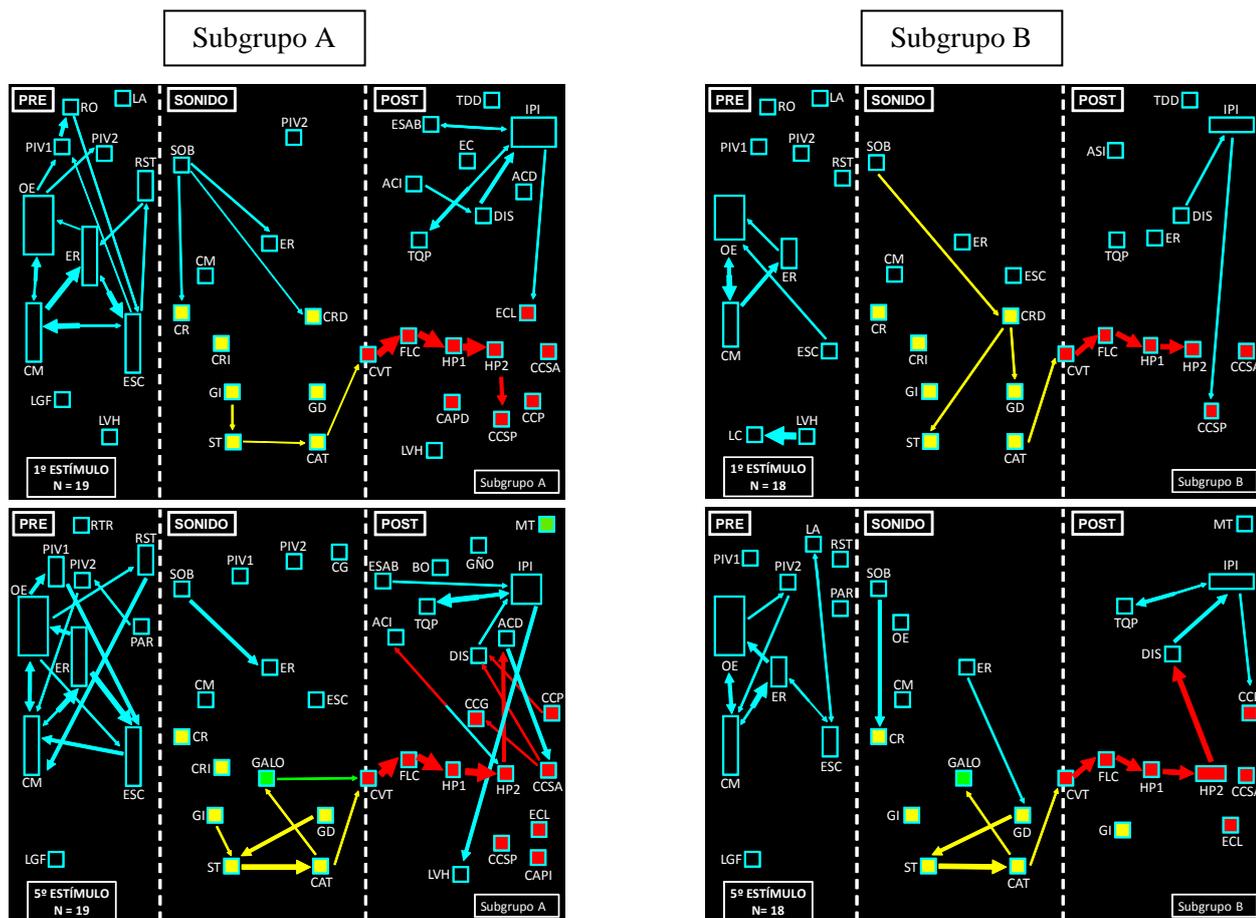
6.1.4. Diferenciación de dos grupos de hámsteres GASH:Sal según su comportamiento durante el kindling

La observación de las grabaciones y el análisis del comportamiento de los animales durante las crisis permitió la clasificación de los GASH:Sal en dos subgrupos bien diferenciados, el **subgrupo A**: animales que desarrollan crisis de forma permanente a lo largo de todo el protocolo de kindling, y el **subgrupo B**: animales que a partir de la 9ª estimulación acústica no experimentan crisis convulsivas

típicas, pudiendo apreciarse comportamientos de congelamiento o de carrera salvaje, pero sin exhibir convulsiones. Los animales de este subgrupo presentan una respuesta variable entre animales, también responden de forma diferente. Del total de animales GASH:Sal analizados durante el kindling audiogénico por su respuesta frente al estímulo sonoro, 19 animales pertenecen al subgrupo A (51,35%) y 18 animales pertenecen al subgrupo B (48,65%).

Los análisis etológicos de ambos grupos por separado permitieron observar las diferencias de respuesta, tanto en el número como en las características de las crisis. Así, en los del subgrupo A las crisis comienzan a incluir elementos límbicos a partir de la 5ª estimulación acústica, y en las siguientes estimulaciones se observan más ítems de origen límbico durante las fases de carrera salvaje y de convulsiones tónico-clónicas. En este subgrupo, los animales presentan un patrón bastante estable de las crisis, que van incrementando la gravedad, interacciones y comportamientos a lo largo de la aplicación del protocolo de kindling audiogénico.

En el subgrupo B aparecen menos ítems diferentes y con interacciones sólo durante la fase de carrera salvaje. En la ventana post-estímulo hay un incremento del comportamiento exploratorio en el número de ítems y de las interacciones a lo largo del protocolo, ya que tras la estimulación acústica, los animales se mantienen en movimiento realizando actividades exploratorias pero sin padecer crisis convulsivas (Fig 20).



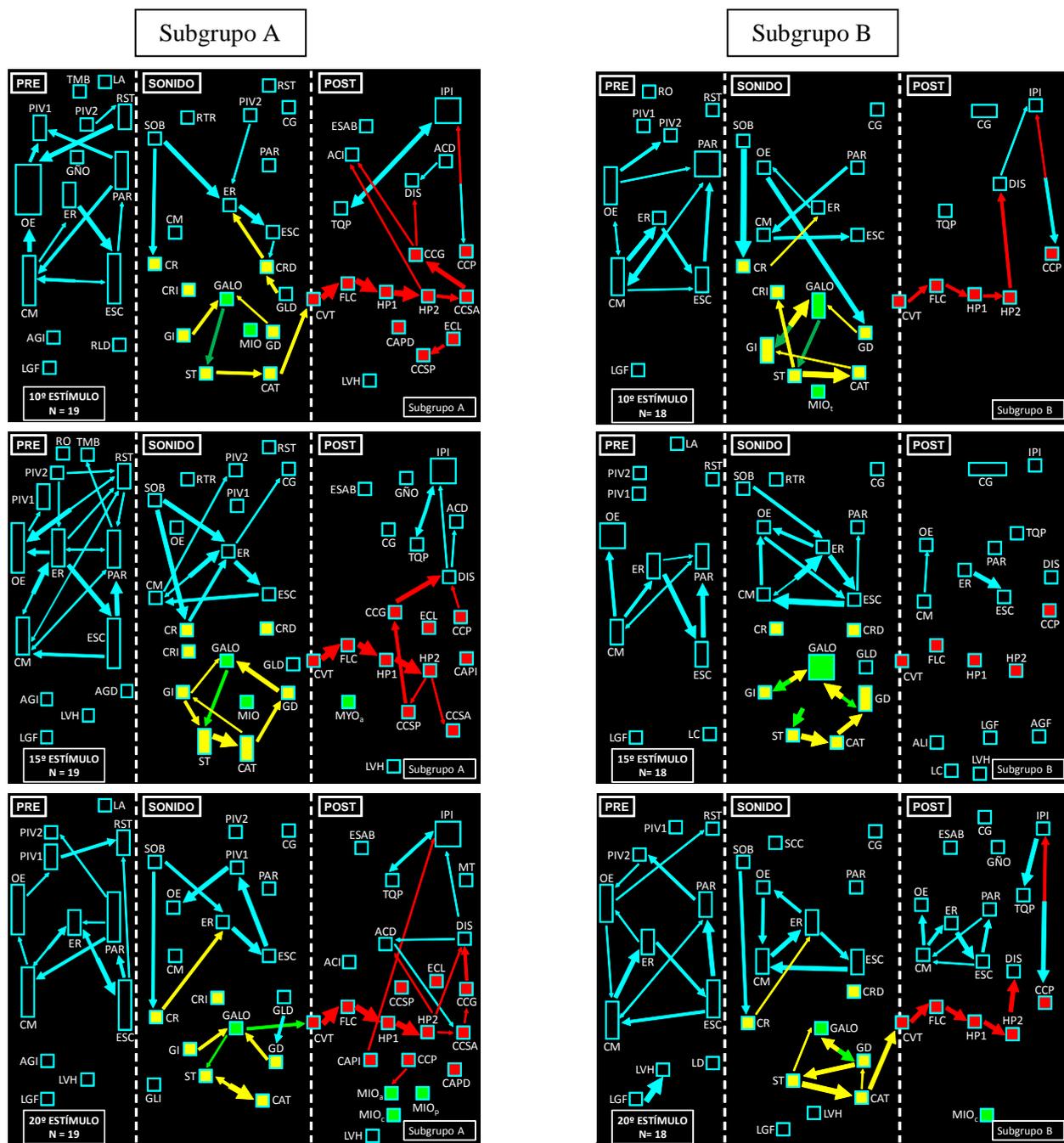


Figura 20. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los hámsteres GASH:Sal, en las estimulaciones 1ª, 5ª, 10ª, 15ª y 20ª, agrupados según la presencia [Subgrupo A (izquierda)] o no [Subgrupo B (derecha)] de crisis durante el protocolo de kindling.

6.1.5. Estudio neuroetológico del hámster control durante el kindling

La evaluación de las estimulaciones 1ª, 5ª, 10ª, 15ª y 20ª en el grupo control evidencia clústeres bien definidos de exploración y autolimpieza (Fig. 21). En la fase pre-estímulo los controles presentan comportamientos de exploración con alta frecuencia y duración, y pocas interacciones, similares a los observados en los hámsteres GASH:Sal. El comportamiento de estar parado interacciona con escudriñar en las estimulaciones 10ª y 15ª, lo que demuestra una actividad exploratoria alta. El clúster de

autolimpieza presente en todos los flujos, muestra un circuito reverberante en la 5ª estimulación [autolimpieza del lado izquierdo (ALI), limpiar las garras, limpiar el hocico (LVH)] así como en la 10ª estimulación [limpiar las garras, limpiar el hocico, limpiar la cabeza (LC), autolimpieza del lado derecho (ALD)], debido a la intensidad de sus interacciones.

Tras iniciar la estimulación acústica, se produce el sobresalto seguido de un movimiento de retroceso (RTR), desarrollándose a continuación un conjunto de comportamientos exploratorios con altas frecuencias e interacciones, muy semejante al descrito en el periodo pre-estímulo. Aunque el grupo de animales controles exhibe movimientos de giro, saltos y caídas en la 1ª estimulación, estos comportamientos desaparecen en los siguientes diagramas de flujo (excepto en la 15ª estimulación donde presentan saltos de manera aislada). Sin embargo, los hámsteres control no presentan en este periodo de sonido un clúster de autolimpieza, se observan comportamientos aislados limpieza de garras en la estimulación 15ª y autolimpieza del lado derecho en la 20ª. El comportamiento de congelar (CG) aparece en la estimulación 15ª con una mayor duración respecto a la 1ª estimulación. El comportamiento lamer aparece en los últimos cuatro flujos e interacciona con el comportamiento exploratorio en la 5ª estimulación; masticación aparece en el 5ª y en el 15ª estimulación con interacción con parado. Congelar se observa en la 1ª y 15ª estimulación y sacudir el cuerpo (SCC) se describe en la estimulación 20ª con interacción con erguido. El comportamiento roer aparece con interacción en la estimulación 5ª y 10ª.

En la ventana post-estimulación, el clúster exploratorio aumenta la frecuencia, tiempo e interacción de los flujos en relación a la 1ª estimulación. El clúster de autolimpieza, ausente en la 1ª estimulación al estar sustituido por la carrera salvaje, surge fraccionado en la estimulación 5ª e interacciona en la 10ª (limpiar las garras y limpiar el hocico), formando una secuencia en la estimulación 15ª (limpiar las garras, limpiar el hocico, limpiar la cabeza, autolimpieza del lado derecho) que también aparece en la estimulación 20ª. El análisis de los comportamientos que aparecen de forma aislada, lamer presenta interacción en las estimulaciones 5ª, 15ª y 20ª; masticación, en la 10ª estimulación, congelar en las 1ª, 10ª y 15ª estimulaciones y sacudir el cuerpo en la 5ª y 20ª estimulaciones. El comportamiento roer aparece interaccionando con otros ítems comportamentales en las estimulaciones 5ª y 15ª.

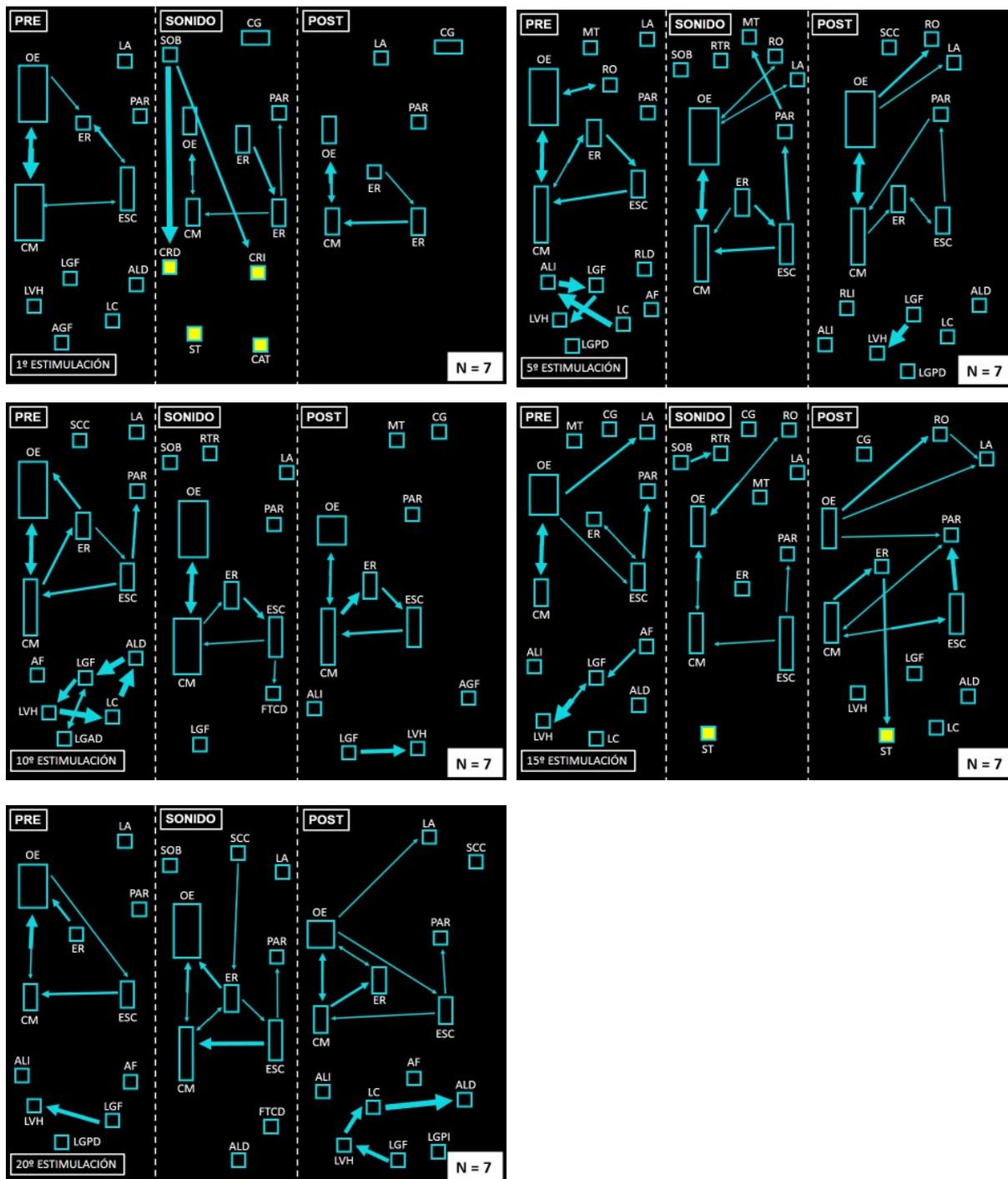


Figura 21. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los hámsteres del Grupo control durante la 1ª, 5ª, 10ª, 15ª y 20ª estimulación (N=7).

6.1.6. Análisis de los índices de severidad durante el kindling

El grupo de hámsteres GASH:Sal sometido a kindling presenta, en conjunto, una uniformidad en las crisis mesencefálicas en cuanto al índice de severidad (ISc), que se mantiene en valores en torno a 7-8 (alta severidad de la crisis mesencefálica y un fuerte componente troncoencefálico en la crisis epiléptica).

Tras la estimulación 15ª, disminuye ligeramente el valor del ISc para regresar a continuación a valores de 8. En la estimulación rebote, el valor del ISc se mantiene en 8.

En la evolución de los comportamientos límbicos durante las crisis, a través del índice límbico (IL) se aprecia una tendencia clara al incremento a lo largo del kindling. Durante las 4 primeras estimulaciones presenta valores muy bajos (de 0-1), se incrementa ligeramente en la 5ª estimulación alcanzando valores en torno a 1, manteniéndose sus valores entre 1 y 5 a lo largo de las estimulaciones siguientes, con una tendencia clara al incremento a lo largo del kindling. Se observa que la estimulación rebote presenta un valor de IL de 1, similar a las primeras estimulaciones.

Estudiando conjuntamente todos los animales GASH:Sal sometidos a kindling audiógeno, a medida que se incrementan los valores del IL, el ISc tiende a disminuir, estableciéndose una tendencia a lo largo del protocolo de estimulación (Fig. 22).

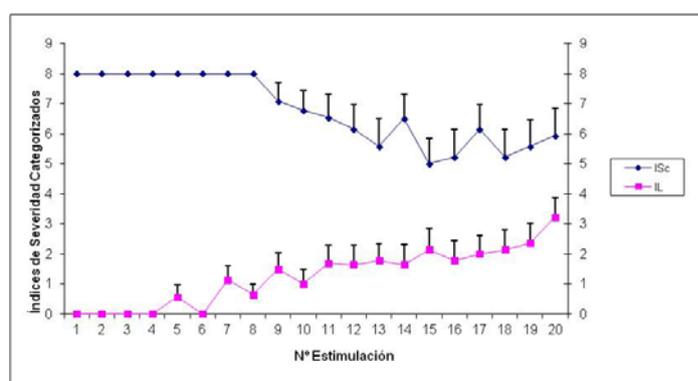


Figura 22. Gráfica donde se muestra la evolución de los índices mesencefálico y límbico en las crisis de los animales GASH:Sal durante el kindling. Se puede observar cómo a medida que aumenta el número de estimulaciones, la severidad de las crisis mesencefálicas (ISc, rombos) disminuye, mientras que los comportamientos límbicos (IL, cuadrados) aumentan casi en la misma proporción. Datos obtenidos del análisis de las grabaciones durante el kindling audiógeno para el conjunto de animales GASH:Sal kindling ($n=37$).

La evaluación de las crisis convulsivas mediante los índices de severidad mesencefálico y límbico permite diferenciar a lo largo del protocolo de kindling los dos subgrupos de hámsteres antes mencionados en cuanto a la respuesta frente al estímulo sonoro: el **subgrupo A**, cuyos animales tienen un ISc por encima de 6 (presentan convulsiones tónicas) y el **subgrupo B**: animales que tienen sus ISc por debajo de este valor de 6 en más de tres estímulos (Fig. 23 y 24).

Los datos de los índices de severidad mesencefálico y límbico para cada subgrupo de animales GASH:Sal son completamente diferentes. La evolución de las crisis en los animales del **subgrupo A** muestra una media de ISc que permanece con valores altos (en torno a 8) en comparación con los observados en los del subgrupo B y sin diferencias estadísticas entre una estimulación y otra durante el kindling, mientras los IL que inicialmente tienen un índice cero, comienzan a elevarse a partir de la 7ª estimulación presentando marcadas diferencias ($p<0,05$) entre el conjunto de estimulaciones de la 1ª a la 8ª en relación a las estimulaciones 12ª y siguientes (Fig. 23 y 24). La estimulación rebote presenta un índice mesencefálico estable y un índice límbico similar a los observados en las primeras estimulaciones.

En los animales del **subgrupo B** se observa que las crisis mesencefálicas evolucionan presentando diferencias significativas entre el conjunto de estimulaciones de la 1ª a la 10ª en relación a las estimulaciones 11ª, 14ª, 15ª, 16ª, 18ª, 19ª y 20ª. En cuanto a las crisis límbicas, se observan diferencias significativas tanto a lo largo del proceso de kindling como al comparar sus niveles de IL con los del subgrupo A. De nuevo, la estimulación rebote presenta valores similares a los obtenidos en las primeras estimulaciones (Fig. 23 y 24).

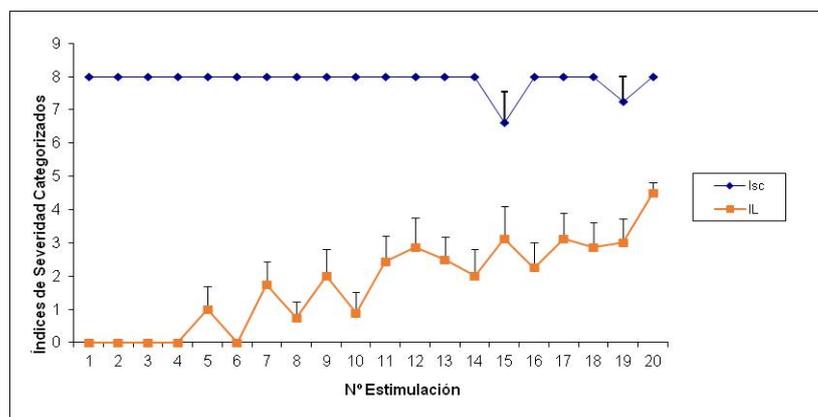


Figura 23. Valores de los índices de severidad mesencefálico y límbico de los animales del subgrupo A. Los datos se obtienen del análisis de las grabaciones durante el kindling audiógeno (20 estimulaciones). Se observa un ISc casi constante a lo largo del protocolo de kindling, mientras que los valores del IL van incrementando de forma paulatina y permanente lo largo de las estimulaciones, comenzando a partir de la 4ª estimulación, índices mesencefálico (rombos) y límbico (cuadrados).

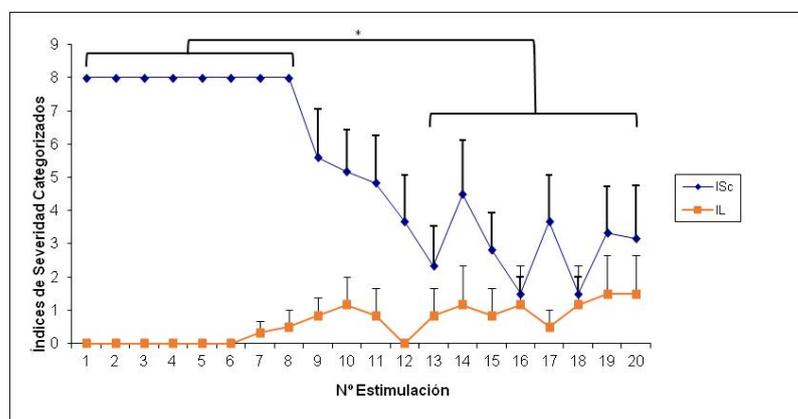


Figura 24. Valores de los índices de severidad mesencefálico y límbico del subgrupo B. Los datos se obtienen del análisis de las grabaciones durante el kindling audiógeno (20 estimulaciones). Se observa un ISc en descenso a lo largo del protocolo de kindling, mientras que los valores del IL van incrementando de forma paulatina y permanente lo largo de las estimulaciones, comenzando a partir de la 6ª estimulación, índices mesencefálico (rombos) y límbico (cuadrados). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se señalan con *.

Reevaluación de los índices mesencefálicos y límbicos para el análisis estadístico

Los resultados estadísticamente significativos para los datos y las tendencias observadas en el apartado anterior pusieron de manifiesto la existencia de dos fases distintas en el comportamiento de los animales durante el kindling, tanto en el índice mesencefálico como en el límbico.

En los animales del **subgrupo A** se observó que el ISc se mantenía siempre constante, mientras que el IL mostraba dos fases: una primera etapa donde el IL no cambiaba, y era igual a 0 (entre el 1^{er} y 4^o estímulo) y una segunda etapa en la que presentaba un incremento de los valores. Mientras que en los animales del **subgrupo B** encontramos un ISc constante entre la 1^a y 8^a estimulación tras la cual, presenta una fase de descenso de la severidad. En cuanto al IL, empieza a incrementarse a partir de la 4^a estimulación, siguiendo una tendencia de aumento, siendo los valores al terminar el protocolo significativamente mayores que al inicio (Fig. 23 y 24).

6.1.7. Análisis de las latencias durante el kindling.

Los datos de las latencias de la primera carrera salvaje, de la convulsión tónica y de la hiperextensión de la pata anterior (Emprototonus) muestran un aumento en los tres valores, como se muestra en la tabla 5, a lo largo del protocolo de estimulaciones repetitivas (Fig. 25).

INICIO KINDLING	Carrera Salvaje	Convulsión tónica	Emprototonus
Conjunto GASH:Sal	2,03 ± 0,73 seg.	5,94 ± 0,99 seg.	10,12 ± 2,03 seg.
Subgrupo A	2,10 ± 0,74 seg.	5,90 ± 0,88 seg.	10,70 ± 1,89 seg.
Subgrupo B	1,83 ± 0,75 seg.	6,00 ± 1,26 seg.	9,17 ± 2,04 seg.

FINAL KINDLING	Carrera Salvaje	Convulsión tónica	Emprototonus
Conjunto GASH:Sal	6,83 ± 4,02 seg.	14,27 ± 3,10 seg.	18,55 ± 3,01 seg.
Subgrupo A	5,22 ± 2,05 seg.	13,11 ± 1,54 seg.	17,67 ± 2,24 seg.
Subgrupo B	11,67 ± 5,03 seg.	19,50 ± 3,54 seg.	22,50 ± 3,54 seg.

Tabla 5. Valores de latencias de carrera salvaje, convulsión tónica e hiperextensión de la pata anterior durante la 1^a y la 20^a estimulación de kindling. Todos los valores vienen indicados como tiempo medio ± error estándar de la media y medidos en segundos.

El promedio de duración de la crisis completa desde el inicio con el sobresalto hasta finalizar el periodo post-estímulo es de **25,68 ± 1,39 seg.** Las latencias evaluadas para la carrera salvaje, latencia del comienzo de las convulsiones tónicas y latencia de emprototonus tienen, respectivamente, las siguientes medidas: **2,03 ± 0,73 seg.**, **5,94 ± 0,99 seg.** y **10,12 ± 2,03 seg** (Tabla 5) al comienzo del protocolo de estimulación, mientras que los valores se incrementan hasta alcanzar, respectivamente, las siguientes medidas durante el 20^o estímulo: **6,83 ± 4,02 seg.**, **14,27 ± 3,10 seg.** y **18,55 ± 3,01 seg.** (Fig. 25).

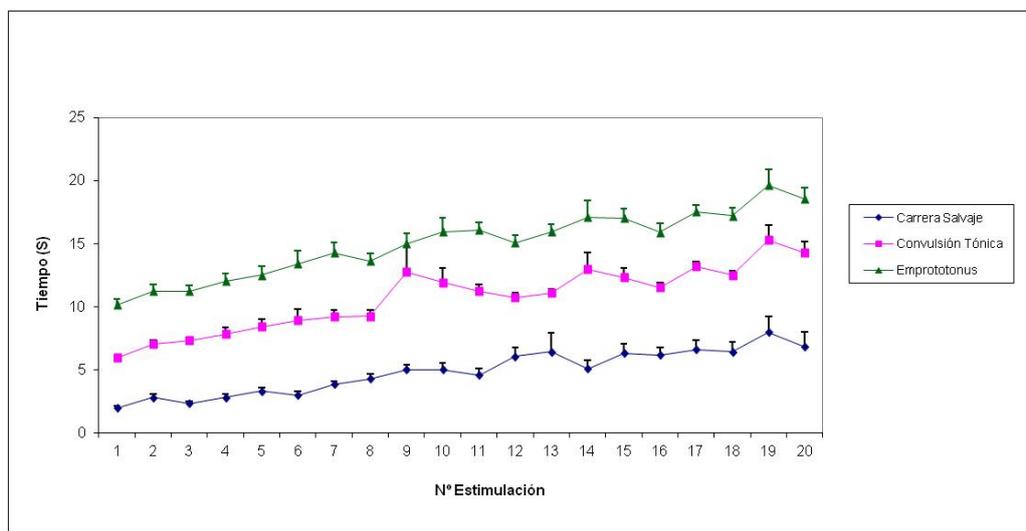
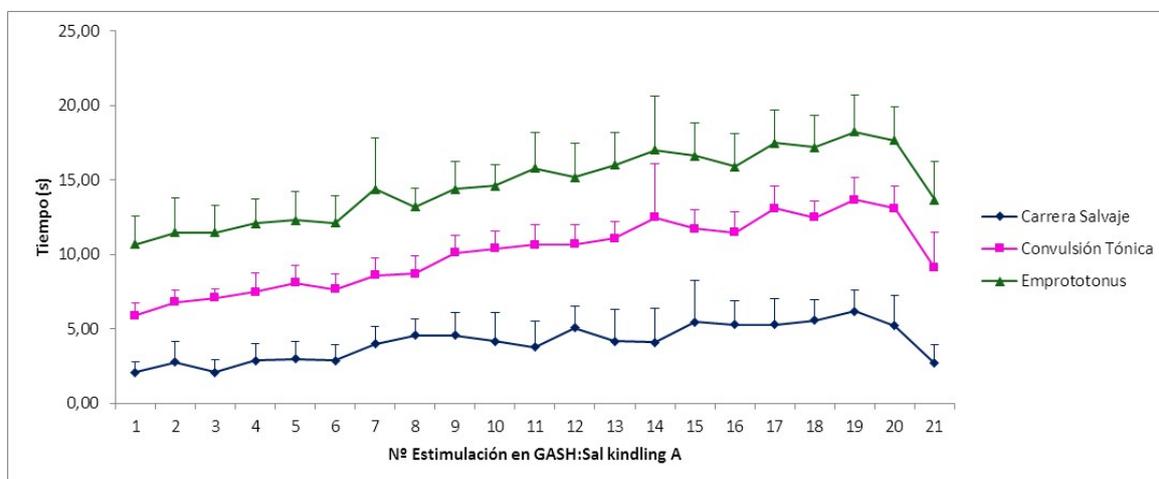


Figura 25. Latencias observadas en el GASH:Sal kindling ante los comportamientos de Carrera salvaje, Convulsión tónica y Emprostotonus. La gráfica muestra los valores medios de latencia y el error estándar de la media. Se aprecia que a medida que se suceden las estimulaciones auditivas, aumenta el período de latencia de todos los comportamientos evaluados. Carrera salvaje (rombos), Convulsión tónica (cuadrados) y Emprostotonus (triángulos) (n=37). La comparación entre la primera y la última estimulación muestra que los valores observados durante la primera estimulación para las latencias, duplican e incluso triplican su duración al finalizar el protocolo de kindling.

Al igual que ocurre con los valores del Índice Límbico, en el caso de las latencias también se observa que la estimulación rebote presenta valores similares a los de las primeras estimulaciones, disminuyendo considerablemente desde los valores finales del kindling.

El análisis realizado de los subgrupos A y B también muestra diferencias en cuanto a las latencias de respuesta de las conductas estudiadas. Mientras que en el **subgrupo A** se observa un incremento constante en los valores a lo largo de las estimulaciones, en los animales del **subgrupo B** destaca el incremento de variabilidad en las latencias a lo largo del protocolo de kindling, llegando a no encontrarse durante las estimulaciones finales del protocolo de kindling alguno de los comportamientos reflejados en los resultados, debido a que el animal no siempre desarrolla las crisis hasta las convulsiones tónico-clónicas y el emprostotonus, lo cual dificulta las comparaciones (Fig. 26).



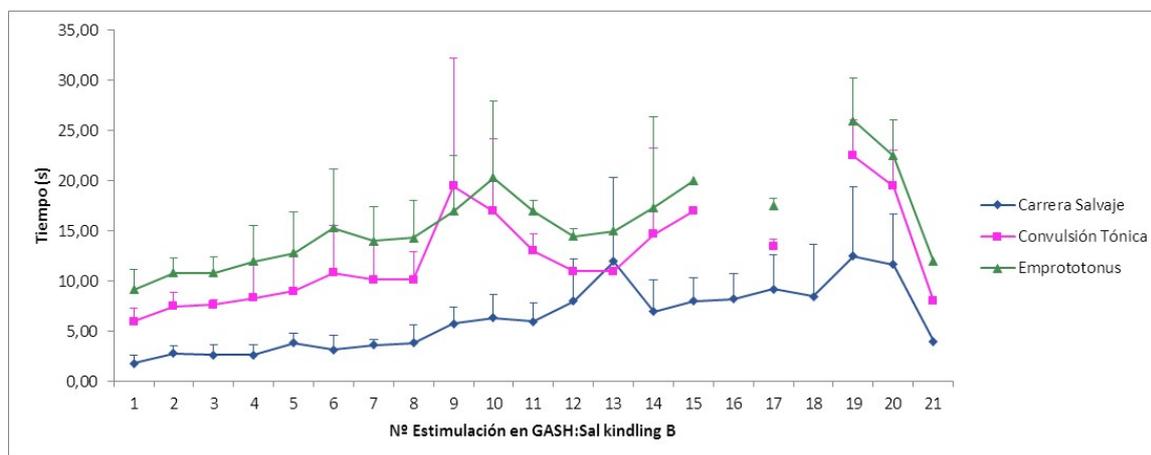


Figura 26. Latencias de la Carrera salvaje, Convulsión tónica y Emprostotonus durante el kindling audiogéno en los subgrupos A y B del hámster GASH:Sal.

En el Grupo A, (n=19) se aprecia que a medida que se suceden las estimulaciones acústicas, aumenta el período de latencia de todos los comportamientos evaluados. La comparación entre la primera y la última estimulación muestra que los valores observados durante la primera estimulación para las latencias, duplican su duración al finalizar el protocolo de kindling.

En el Grupo B, (n=18), se aprecia que a medida que se suceden las estimulaciones acústicas, aumenta el período de latencia de todos los comportamientos evaluados. Carrera salvaje (rombos), Convulsión tónica (cuadrados) y Emprostotonus (triángulos). La comparación entre la primera y la última estimulación muestra que los valores observados durante la primera estimulación para las latencias, triplican su duración al finalizar el protocolo de kindling.

6.2. Prueba de Campo abierto

Tal y como se describe en metodología, realizamos la prueba del campo abierto a los grupos experimentales antes del kindling, después de la primera estimulación y en tras la estimulación sonora de los días 5º y 10º. Los parámetros comportamentales evaluados que presentan diferencias durante el 1º día de kindling audiogéno se visualizan en la tabla A (Anexo 5), agrupándose para su estudio en parámetros relacionadas con la actividad del animal (comportamientos exploratorios, tiempo móvil en la prueba, distancias recorrida...etc) con el grado de estrés o ansiedad (grooming o acicalamiento, escudriñar el ambiente, etc.).

La prueba de campo abierto muestra que los datos obtenidos durante el 1º día de protocolo en el grupo de animales GASH:Sal sin estimular y tras una estimulación, en comparación con los hámsteres control en las mismas condiciones experimentales, presentan una tendencia similar entre los grupos comparados en los parámetros estudiados. Se observan comportamientos exploratorios superiores antes de la estimulación acústica tanto en el GASH:Sal como en el control, en comparación con los valores obtenidos después de la estimulación.

Por otra parte, los comportamientos de “grooming” o “acicalamiento” son superiores en la cepa GASH:Sal no estimulada respecto a lo observados en los hámsteres control, mostrando valores elevados en comparación con los medidos en el grupo control, sin embargo tras la estimulación, los valores en el GASH:Sal descienden drásticamente mientras que en el control se mantienen estables (Anexo 5, tabla A).

Los parámetros relativos al “acicalamiento” del animal y los comportamientos de “escudriñar” el ambiente, presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, de especial interés en la evaluación del estrés.

En cuanto al “acicalamiento”, los valores más elevados se observan en los hámsteres GASH:Sal no estimulado (5,00), difiriendo tanto del grupo GASH:Sal sometido a una estimulación (1,26) como de los dos grupos de hámsteres control (2,25 y 2,26 el no estimulado y el estimulado respectivamente). Los animales del grupo control no presentan valores de acicalamiento significativamente diferentes antes y después de la estimulación auditiva (Fig. 27).

En el comportamiento de “escudriñar”, los valores descienden en los dos grupos (GASH:Sal y controles) tras la estimulación (con valores de 32,25 y 15,91 GASH:Sal no estimulado y estimulado respectivamente, y valores de 28,50 el control no estimulado y de 23,50 el control estimulado) (Fig. 28).

Durante el 5º día de estimulación, ya se distinguen en el grupo de animales GASH:Sal sometidos a kindling los dos subgrupos que muestran respuestas diferentes a la estimulación (subgrupo A o de crisis constantes y subgrupo B o de crisis variables).

Tras la evaluación realizada durante el 5º día, se observan modificaciones en varios parámetros (distancia total recorrida, velocidad media, tiempo móvil, tiempo inmóvil, velocidad máxima, latencia de la primera salida de inicio, distancia en la periferia, tiempo móvil en la periferia), además de los descritos para la primera estimulación (tiempo en el centro, tiempo móvil en el centro, acicalamiento, elevaciones y escudriñar). Se observa una disminución del movimiento y del tiempo invertido en comportamientos exploratorios en el GASH:Sal estimulado (en ambos subgrupos, A y B) respecto a los otros dos grupos (GASH:Sal con una estimulación y hámsteres control), que presentan niveles similares entre ellos. En cuanto a los comportamientos de acicalamiento, destaca que los animales pertenecientes al subgrupo B de GASH:Sal kindling tienen niveles superiores al resto de grupos (Anexo 5, tabla B).

Durante este 5º día de protocolo se analizaron los siguientes parámetros por su interés para la evaluación del estrés:

La distancia total recorrida en el campo abierto muestra un notable descenso de los datos pertenecientes al grupo GASH:Sal kindling A (4,70 m), que se diferencia estadísticamente del grupo control kindling (30,73 m) y del GASH:Sal con una estimulación (47,25 m), pero no se encontraron diferencias significativas respecto al subgrupo B (Fig. 29).

Los valores de velocidad media de desplazamiento del animal registrados en los integrantes del subgrupo A (0,011 m/s) son muy inferiores respecto al resto, encontrándose diferencias estadísticas con todos los grupos ($p < 0,05$; $F_{3, 26} = 11,082$) excepto con el subgrupo B (Fig. 30).

El parámetro de tiempo móvil en la prueba de campo abierto muestra unos valores inferiores en los integrantes del subgrupo A (182 s), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas respecto a

los grupos Control Kindling (417 s) y GASH:Sal con una estimulación (404 s) ($p < 0,05$; $F_{3,25} = 5,505$) (Fig. 31).

Los valores de latencia de salida del punto de inicio son mucho mayores en los animales del subgrupo A (290 s) que en los demás grupos de estudio, observándose diferencias significativas entre los componentes del grupo Control kindling (4 s) y los del grupo GASH:Sal con una estimulación (9 s) ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 10,434$) (Fig. 32).

Los niveles del comportamiento “acicalamiento” observados describen una situación de valores inferiores para el subgrupo A (0,92) y para el grupo Control Kindling (1,50) respecto a los valores obtenidos en los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación (5,25) y los del subgrupo B (4,17), ambos con diferencias estadísticamente significativas respecto al subgrupo A ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 7,008$) (Fig. 33).

Los valores del comportamiento “escudriñar” durante el 5° día del protocolo de kindling audiógeno muestran un pronunciado descenso en todos los grupos de hámsteres (Figura 34), siendo el descenso más importante el observado en el subgrupo A, en el que se establecen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Control Kindling y al grupo GASH:Sal con una estimulación. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control Kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 16,722$).

Tras el 10° día de kindling se observa una tendencia similar a la descrita en el 5° día, con una especial disminución de los movimientos exploratorios y del acicalamiento. Por otro lado, los datos relativos al acicalamiento en el subgrupo B (3,10) se asemejan a los que muestra el subgrupo A (1,00). Todas las variaciones registradas durante el 10° día se encuentran recogidas en la tabla C (ver Anexo 5).

Durante el 10° día, la distancia total recorrida por el animal puso de manifiesto una disminución significativa de los valores obtenidos en el subgrupo A (5,11 m) respecto al resto de grupos de estudio ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 11,082$) (Fig. 35).

La velocidad media de desplazamiento del animal durante el 10° día marca un claro descenso de los valores observados en el subgrupo A (0,01 m/s) respecto al resto de los grupos (Fig. 36).

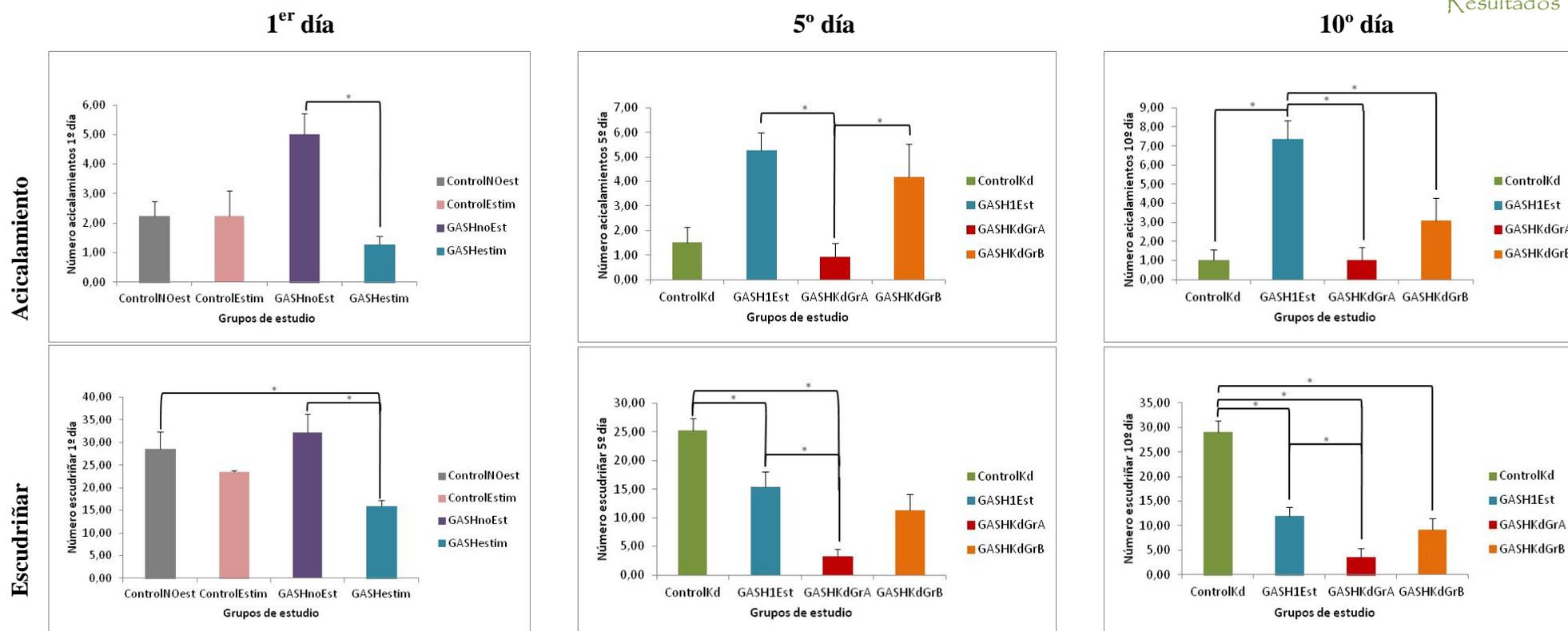
El valor del tiempo móvil del animal durante la aplicación del protocolo de kindling también se encuentra disminuido en el subgrupo A (125 s) respecto al resto de grupos (416 s en el grupo control kindling; 415 s en el grupo GASH:Sal una estimulación y 367 s en el subgrupo B) (Fig. 37).

Los valores de latencia de la primera salida del inicio, son superiores en el subgrupo A (221 s) respecto a los valores observados en los animales del resto de grupos (Fig. 38).

Los valores de “acicalamiento” detectados durante el 10° día son mayores en los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación (1,00) y muestran diferencias estadísticamente significativas con los valores observados en el resto de grupos ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 8,154$) (Fig.39).

El comportamiento de “escudriñar” muestra valores considerablemente inferiores en todos los grupos conformados por animales GASH:Sal respecto a lo observado en el grupo Control Kindling (29,00), además, se diferencian estadísticamente de los valores hallados en los animales del subgrupo A respecto a lo que se observó en los integrantes del grupo GASH:Sal con una estimulación (12,00) ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 16,630$), pero no respecto a lo observado en los integrantes del subgrupo B (Fig. 40).

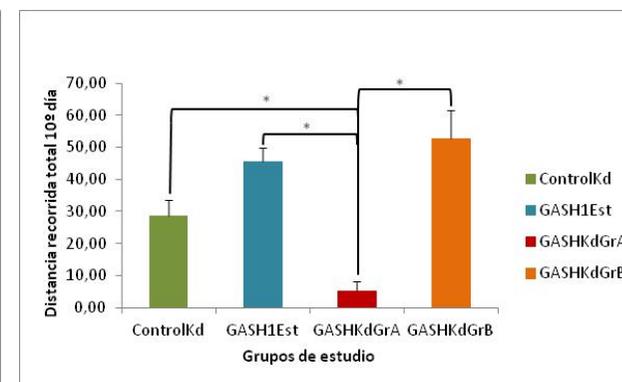
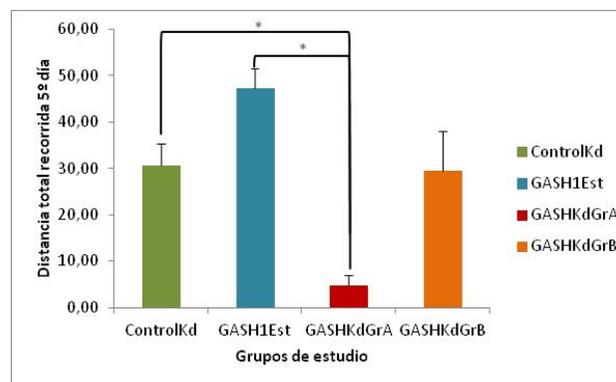
Los datos reflejan un descenso en cuanto a la actividad locomotora (distancia, velocidad, tiempo móvil) del subgrupo A y un incremento en la latencia a la primera salida de inicio en la prueba de campo abierto, a medida que progresa el kindling audiógeno.



Parámetros comportamentales del campo abierto. Acicalamiento: Figura 27. Valores del comportamiento acicalamiento durante el 1^{er} día de estimulación. Los datos están expresados como el valor medio del número de acicalamientos \pm error estándar de la media ($p < 0,05$; $F_{3,31} = 8,143$) y medidos en nº de veces/tiempo total de la prueba. Figura 33. Valores de número de acicalamientos durante el 5^o día de estimulación, muestran diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A con respecto tanto al subgrupo B como al grupo GASH:Sal con una estimulación ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 7,008$). Figura 39. Valores de acicalamiento mostrado por los integrantes de cada grupo experiencial durante el 10^o día de estimulación acústica, se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo GASH:Sal una estimulación con el resto de grupos de estudio ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 8,154$). **Escudriñar:** Figura 28. Valores del comportamiento escudriñar durante el 1^{er} día de estimulación. Los datos están expresados como el valor medio del número de escudriñar \pm error estándar de la media ($p < 0,05$; $F_{3,31} = 11,573$) y medidos en nº de veces/tiempo total de la prueba. Figura 34. Número de comportamientos “escudriñar” durante el 5^o día de estimulación, se puede observar que las diferencias estadísticas se encuentran entre el subgrupo A respecto tanto al grupo control como al grupo GASH:Sal con una estimulación, como entre el grupo control kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 16,722$). Figura 40. Valores de escudriñar en los diferentes grupos de estudio durante el 10^o día de estimulación. Se destaca la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control kindling con el resto de grupos, así como entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo A. ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 16,630$).

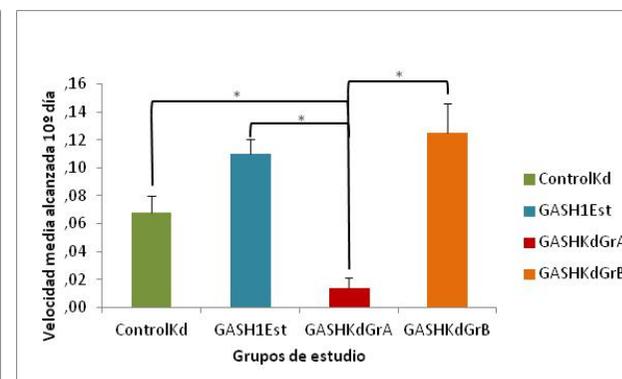
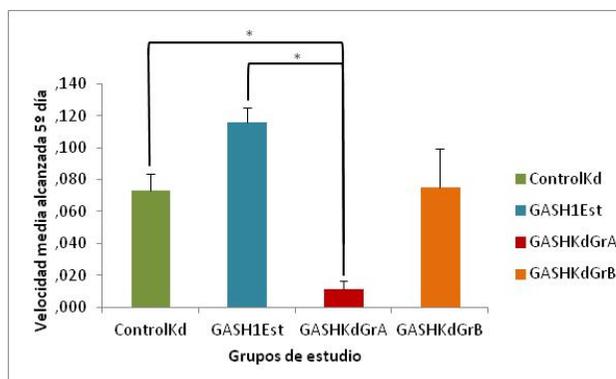
1^{er} día5^o día10^o día

Distancia Total



Sin diferencias entre los grupos de estudio

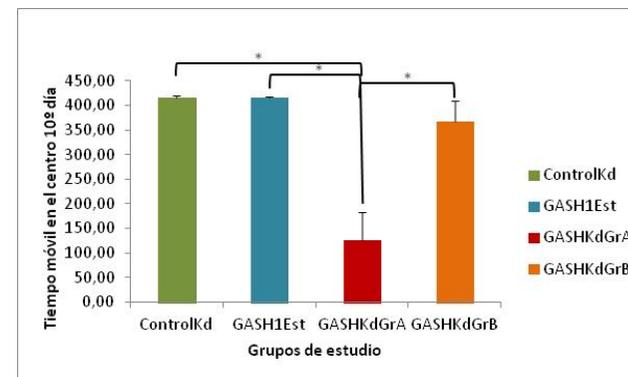
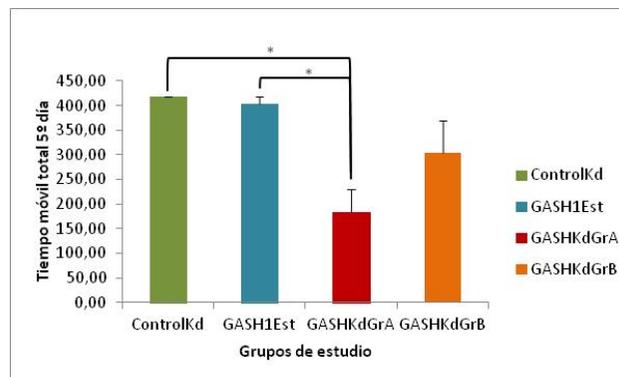
Velocidad Media



Parámetros comportamentales del campo abierto. Distancia Total: Figura 29. Valores de distancia total recorrida durante el 5^o día de estimulación en los distintos grupos de estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y el grupo control kindling, así como con el grupo GASH:Sal con una estimulación. Los datos están expresados como el valor medio la distancia total recorrida \pm error estándar de la media ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 19,020$), medidos en metros. **Figura 35. Valores de distancia total recorrida durante el 10^o día de estimulación.** Se observan diferencias estadísticamente significativas de subgrupo A respecto a los otros tres grupos de estudio ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 11,082$). **Velocidad Media:** Figura 30. Valores de velocidad media de desplazamiento de los diferentes grupos de animales durante el 5^o día de estimulación. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo GASH:Sal A con el grupo control kindling así como con el grupo GASH:Sal con una estimulación. Los datos están expresados como el valor medio de la velocidad media \pm error estándar de la media ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 17,788$), medidos en m/s. **Figura 36. Valores de velocidad media observados en los diferentes grupos de estudio durante el 10^o día de estimulación acústica.** Se muestra diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A con el resto de grupos del estudio.

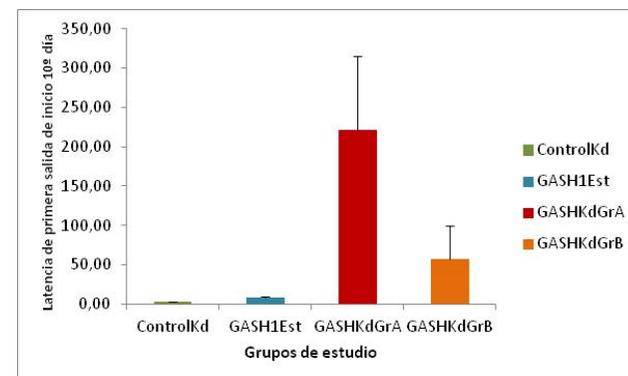
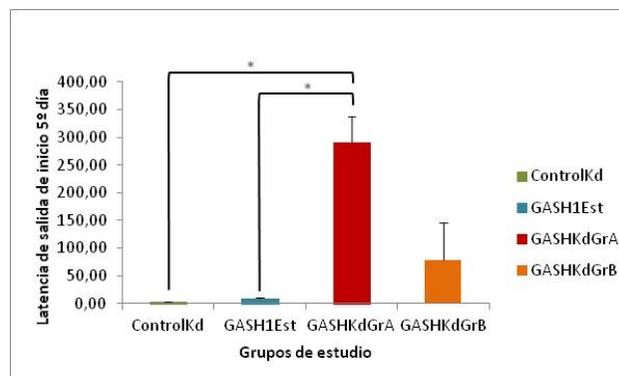
1^{er} día5^o día10^o día

Tiempo Móvil



Sin diferencias entre los grupos de estudio

Latencia primera salida de inicio



Parámetros comportamentales del campo abierto. Tiempo Móvil: Figura 31. Valores de tiempo móvil durante el 5^o día de estimulación. Los datos están expresados como el valor medio del tiempo móvil \pm error estándar de la media ($p < 0,05$; $F_{3,25} = 5,505$), medidos en segundos. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y el grupo control kindling así como con el grupo GASH:Sal con una estimulación. **Figura 37. Valores de tiempo móvil de los animales de los diferentes grupos de estudio durante el 10^o día de estimulación.** Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y el resto de grupos propuestos ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 10,798$). **Figura 32. Valores de latencia de salida del inicio durante el 5^o día de estimulación.** Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y los grupos de control kindling y GASH:Sal con una estimulación ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 10,434$). **Figura 38. Valores de latencia de la primera salida del inicio el 10^o día de estimulación.** Se puede observar un incremento en la latencia del subgrupo A respecto al resto de grupos, sin hallarse diferencias estadísticas entre ningún par de comparaciones ($p < 0,05$; $F_{3,26} = 3,831$).

6.3. Marcadores bioquímicos de estrés

El estudio de los niveles de cortisol y corticosterona en sangre, usados en nuestro trabajo como marcadores del estrés, demuestran que durante el 1^{er} día de estimulación no existen diferencias en los niveles de dichos parámetros entre los dos grandes grupos de estudio (GASH:Sal y hámteres control), ni tampoco entre las dos situaciones experimentales evaluadas (sin estimulación y con una estimulación acústica).

En el 5^o día de estimulación, se observan en el hámster control estimulado niveles superiores (1,33 ug/dL \pm 0,03 ug/dL) a los obtenidos tanto en los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación (0,23 ug/dL \pm 0,03 ug/dL) como en los animales del subgrupo B (0,27 ug/dL \pm 0,08 ug/dL). Por otro lado, los integrantes del subgrupo A tienen niveles de 3,04 ug/dL \pm 0,80 ug/dL, superiores a los valores de cortisol detectados en los animales del grupo control kindling (Fig. 41).

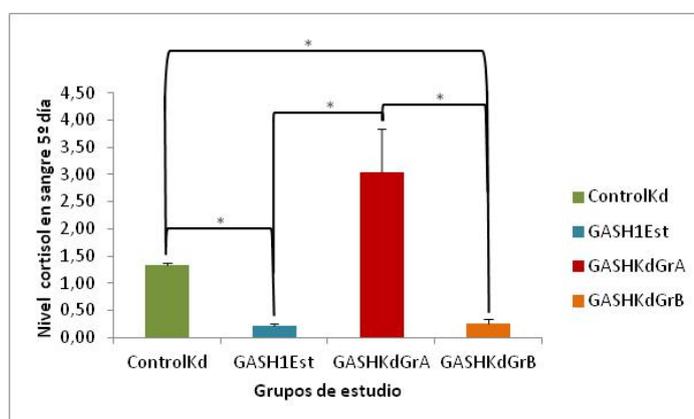


Figura 41. Niveles de cortisol en sangre observados en los diferentes grupos de estudio durante el 5^o día de aplicación del protocolo de kindling audiogeno. Se puede observar las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control kindling con el grupo GASH:Sal una estimulación y con el subgrupo B; diferencias entre el grupo GASH:Sal una estimulación con el subgrupo A y diferencias entre los subgrupos A y B ($p < 0,05$; $F_{3,25} = 4,973$). Los datos están expresados como el valor medio de los niveles de cortisol en sangre \pm error estándar de la media y medidos en ug/dL.

En el 10^o día de estimulación, los niveles de cortisol observados en cada grupo muestran valores similares a los obtenidos en el 5^o día, excepto la situación de los animales del subgrupo B (1,49 ug/dL \pm 0,53 ug/dL). Los valores encontrados en el grupo GASH:Sal con una estimulación (0,25 ug/dL \pm 0,07 ug/dL), el subgrupo A (2,86 ug/dL \pm 0,72 ug/dL) y el grupo control kindling presentan valores similares (0,75 ug/dL \pm 0,20 ug/dL) a los obtenidos durante el 5^o día de estimulación (Fig. 42).

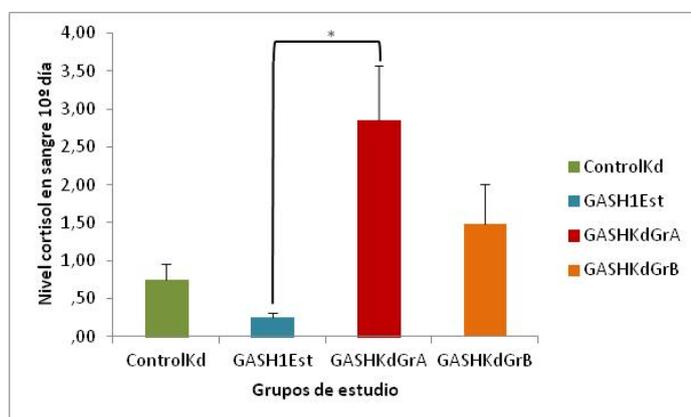


Figura 42. Niveles de cortisol en sangre detectado en los grupos de estudio al 10^o día de kindling audiogeno. Se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo A ($p < 0,05$; $F_{3,25} = 4,772$). Los datos están expresados como el valor medio de los niveles de cortisol en sangre \pm error estándar de la media y medidos en ug/dL.

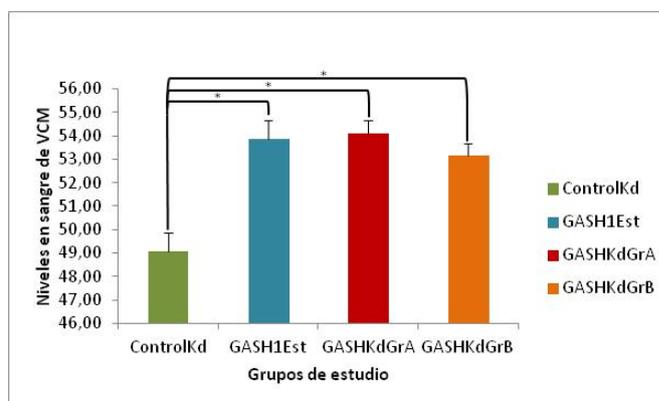
A diferencia de lo descrito anteriormente sobre los resultados de detección de valores de cortisol, los niveles de corticosterona detectados en las muestras son muy bajos en todos los grupos de animales analizados, del orden de 10 veces menos que los valores de cortisol obtenidos en los mismos animales, por lo cual, no resulta posible utilizar los resultados de niveles de corticosterona en nuestro estudio.

6.4. Marcadores hematológicos

El análisis estadístico de veinte parámetros hematológicos (Anexo 6) obtenido de muestras sanguíneas procedentes de animales experimentales muestra diferencias entre los grupos de estudio en algunos de estos parámetros tras finalizar el protocolo de kindling audiogénico, detallados a continuación.

- 1- Volumen corpuscular medio (VCM). El valor de este parámetro difiere en los dos grandes grupos de estudio, GASH:Sal con una estimulación (53,85 ug/dL \pm 0,80 ug/dL), GASH:Sal subgrupo A (54,10 ug/dL \pm 0,58 ug/dL), GASH:Sal subgrupo B (53,17 ug/dL \pm 0,48 ug/dL) y hámsteres control kindling (49,05 ug/dL \pm 0,84 ug/dL) (independientemente del protocolo, de realización o no de kindling, que se haya seguido). Estos datos reflejan una macrocitosis en los animales de la línea GASH:Sal. Además, el estudio hematológico revela que los animales GASH:Sal presentan hipocromía (los glóbulos rojos contienen menos hemoglobina, medido a través del parámetro CHCM) respecto al grupo control kindling, lo que está relacionado con la macrocitosis (incremento del volumen corpuscular medio) antes referida (Fig. 43).

Figura 43. Niveles de volumen corpuscular medio en los diferentes grupos de estudio. Se observan diferencias estadísticas entre el grupo control kindling respecto a los otros tres grupos de estudio, presentando éstos últimos niveles superiores a los hallados en el grupo control kindling ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 8,115$). Los datos están expresados como el valor medio del nivel de volumen corpuscular medio en sangre \pm error estándar de la media y medidos en ug/dL.



- 2- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Los valores detectados en los hámsteres del grupo control kindling presentan niveles más altos de CHCM (41,58 ug/dL \pm 1,94 ug/dL) en relación con los obtenidos para los animales del grupo GASH:Sal (independientemente del protocolo usado). Así se encuentran en animales del grupo GASH:Sal con una estimulación: 42,56 ug/dL \pm 3,73 ug/dL; animales del subgrupo A: 39,48 ug/dL \pm 2,55 ug/dL y animales del subgrupo B: 37,71 ug/dL \pm 0,39 ug/dL (Fig. 44).

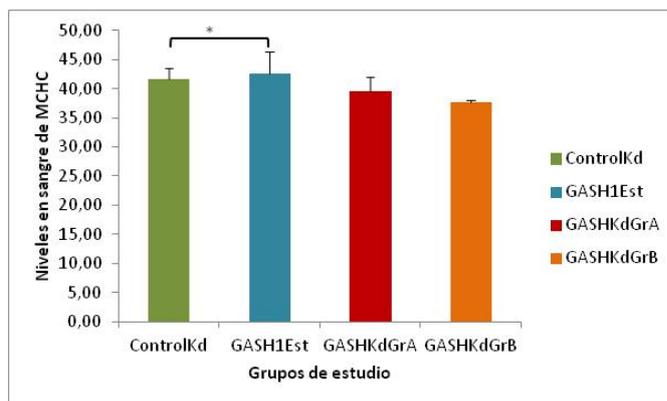


Figura 44. Concentración de hemoglobina corpuscular media en los diferentes grupos de estudio. Se puede observar diferencias estadísticas entre el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 3,505$). Los datos están expresados como el valor medio del nivel de CHCM en sangre \pm error estándar de la media y medidos en ug/dL.

- 3- Amplitud de distribución del tamaño plaquetario (PDW). El valor de este parámetro es mayor en los animales del grupo GASH:Sal en cualquiera de las situaciones y subgrupos, encontrándose valores de $63,09 \text{ ug/dL} \pm 1,04 \text{ ug/dL}$ en los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación, de $64,88 \text{ ug/dL} \pm 1,28 \text{ ug/dL}$ en los del subgrupo A y de $62,88 \text{ ug/dL} \pm 0,80 \text{ ug/dL}$ en los del grupo B, respecto a lo observado en el grupo control ($57,05 \text{ ug/dL} \pm 2,89 \text{ ug/dL}$) (Fig. 45).

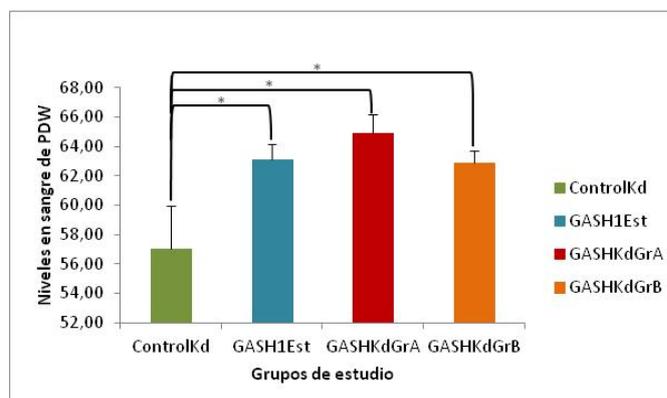
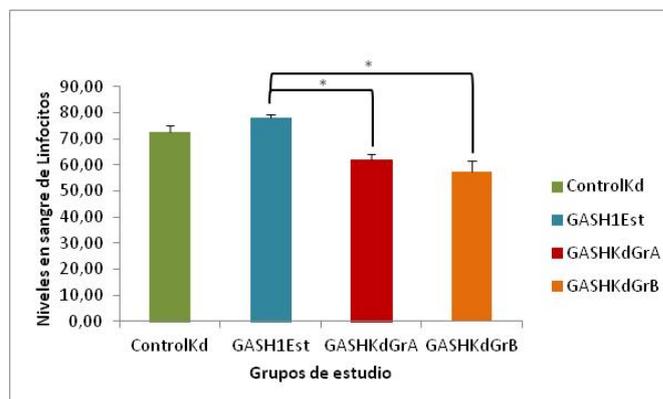


Figura 45. Valores de amplitud de distribución del tamaño plaquetario obtenido en los animales de los diferentes grupos de estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control kindling respecto a los otros tres grupos GASH:Sal (una estimulación, subgrupo A y subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 4,701$). Los datos están expresados como el valor medio del nivel de PDW en sangre \pm error estándar de la media y medidos en ug/dL.

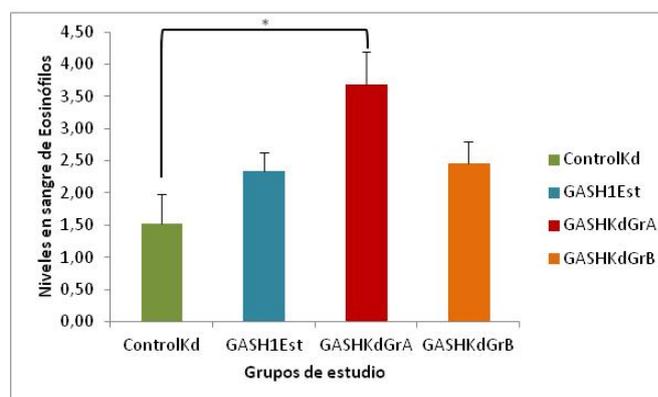
- 4- Número total de linfocitos. Se aprecian valores inferiores entre los animales del grupo GASH:Sal kindling (independientemente de si pertenecen al subgrupo A o B, con valores respectivamente de $61,88 \% \pm 2,24 \%$ y $57,54 \% \pm 4,30 \%$), en relación con los valores observados en los hámsteres del grupo control kindling ($72,63 \% \pm 2,66 \%$) y los pertenecientes al grupo GASH:Sal con una estimulación ($78,16 \% \pm 1,17 \%$). Los valores obtenidos en este estudio reflejan dos situaciones independientes del grupo de estudio: por una parte, se observan altos niveles linfocitarios en los hámsteres del grupo control kindling y en los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación. Por otro lado, todos los animales GASH:Sal tras someterse a estimulaciones repetitivas presentan unos valores inferiores estadísticamente a los observados en el grupo GASH:Sal con una estimulación ($p < 0,05$; $F_{3,24} = 8,771$) (Fig. 46).

Figura 46. Número total de linfocitos en sangre en los animales de los diferentes grupos de estudio. Se puede apreciar diferencias significativas en el número total de linfocitos en sangre del grupo de animales GASH:Sal con una estimulación respecto tanto al subgrupo A como al B ($p < 0,05$; $F_{3, 24} = 8,771$). Los datos están expresados como el valor medio del nivel de linfocitos en sangre \pm error estándar de la media y medidos en $\mu\text{g/dL}$.



- 5- Niveles de eosinófilos. El estudio demuestra un aumento en el nº de eosinófilos en los animales sometidos a kindling del subgrupo A (3,68 % \pm 0,50%), que es significativamente diferente a los valores de los hámsteres control kindling (1,53 % \pm 0,45 %) ($p < 0,05$; $F_{3, 24} = 3,909$). Por su parte, tanto los animales GASH:Sal con una estimulación como los del subgrupo B presentan valores similares (2,34 % \pm 0,29 % y 2,45 % \pm 0,34 % respectivamente) (Fig. 47).

Figura 47. Valores de eosinófilos encontrados en los grupos de experimentales. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de eosinófilos en sangre entre el grupo control kindling y el subgrupo A ($p < 0,05$; $F_{3, 24} = 3,909$). Los datos están expresados como el valor medio del nivel de eosinófilos en sangre \pm error estándar de la media y medidos en $\mu\text{g/dL}$.



6.5. Activación neuronal

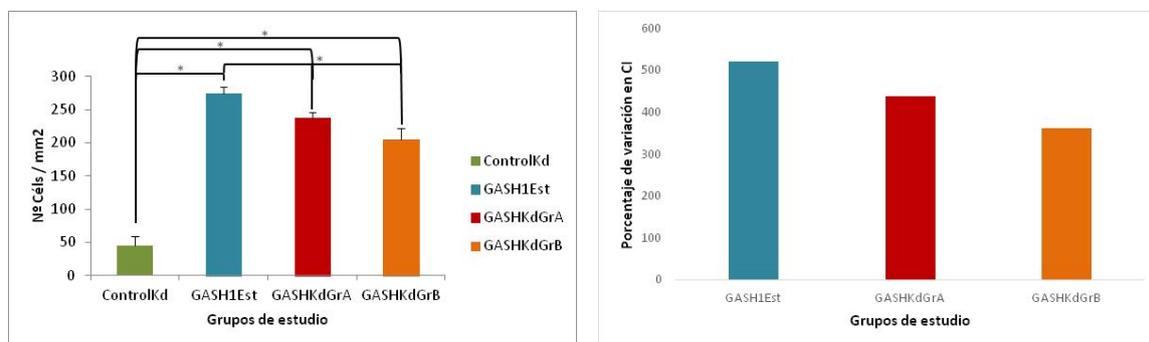
La evaluación cualitativa mediante el mapeo de gradiente de color permitió seleccionar los núcleos que a continuación se han estudiado. Estos núcleos son tanto troncoencefálicos (Colículo Inferior, IC y Locus Coeruleus, LC), como de localizaciones más rostrales, como son el Núcleo Hipotalámico Periventricular (Pe), el Hipocampo (Hyp), y dos núcleos del Complejo Amigdalino: el Núcleo Basolateral Amigdalino (en su parte posterior y anterior, BLP/BLA respectivamente) y Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal (MePD). Además, se estudió la Sustancia Gris Periacueductal (PAG), núcleo con una extensa localización rostrocaudal desde el tronco del encéfalo hasta áreas más rostrales. En cada uno de ellos se realizó un conteo del número de neuronas en la sección completa del núcleo en diferentes niveles caudo-rostrales.

Los datos cuantitativos obtenidos para cada núcleo de estudio fueron los siguientes:

6.5.1. Colículo Inferior

El grupo de animales GASH:Sal con una única estimulación audiógena muestra el mayor valor de densidad de neuronas *c-fos* inmunoreactivas detectadas en el Colículo Inferior ($273,83 \text{ cels/mm}^2 \pm 10,23 \text{ cels/mm}^2$) y presenta diferencias significativas con lo observado en los animales del grupo control kindling ($44,13 \text{ cels/mm}^2 \pm 15,35 \text{ cels/mm}^2$) y aquellos del subgrupo B ($204,12 \text{ cels/mm}^2 \pm 17,73 \text{ cels/mm}^2$) ($p < 0,05$; $F_{3,44} = 54,467$). Por otro lado, también se encontraron diferencias estadísticas en la densidad de neuronas *c-fos* inmunoreactivas encontradas en el Colículo Inferior de los animales del grupo control kindling con los subgrupos A y B ($p < 0,05$; $F_{3,44} = 54,467$) (Fig. 48).

Aunque los dos subgrupos (A y B) de GASH:Sal no se diferencian significativamente en cuanto a la densidad de neuronas inmunopositivas para *c-fos*, el porcentaje la inmunotinción respecto al grupo control kindling es de 438% y 362% para el subgrupo A y B respectivamente, tomando como referencia el grupo control kindling (Fig. 49).



Figuras 48 (izda) y 49 (dcha). (48) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas correspondientes al núcleo Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas entre el grupo control kindling y el resto de grupos, que muestran valores de densidad superiores (n=3 en grupo control kindling, n=3 en grupo GASH:Sal una estimulación, n=4 en subgrupo A y n=2 en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,44} = 54,467$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas \pm error estándar de la media y medidos en céls /mm². (49) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas en el Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio. Se observa un incremento del 520% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 438% en el subgrupo A y del 362% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

No se encuentran diferencias de lateralidad en ninguno de los niveles rostrocaudales estudiados; obteniéndose valores similares de densidad de neuronas *c-fos* inmunoreactivas entre el lado derecho y el izquierdo (datos no mostrados).

Por otra parte, la comparación de la densidad de neuronas *c-fos* inmunoreactivas realizada entre los distintos niveles rostrocaudales a lo largo del núcleo puso de manifiesto que la expresión de *c-fos* no es homogénea. Así, el nivel de Bregma -6 mm, que corresponde con la sección más caudal estudiada para el Colículo Inferior, se caracterizó como el que presentaba las diferencias estadísticas más importantes entre los grupos de estudio, observándose una mayor inmunotinción en el subgrupo B respecto al resto de grupos estudiados. Sin embargo en el resto de niveles caudo-rostrales estudiados, destaca una mayor

densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el grupo GASH:Sal con una estimulación (Fig. 50, tabla 6).

Figura 50. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en el Colículo Inferior de los grupos estudiados. Los datos se expresan en número de células / mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas constantes en los grupos GASH:Sal con una estimulación, que mantiene los valores mas elevados en la mayor parte de las secciones estudiadas, en el subgrupo A y en el grupo control kindling, que muestra los valores más bajos de los cuatro grupos estudiados. El subgrupo B presenta altos valores en la sección más caudal, pero sin embargo disminuye su densidad en las secciones más rostrales estudiadas.

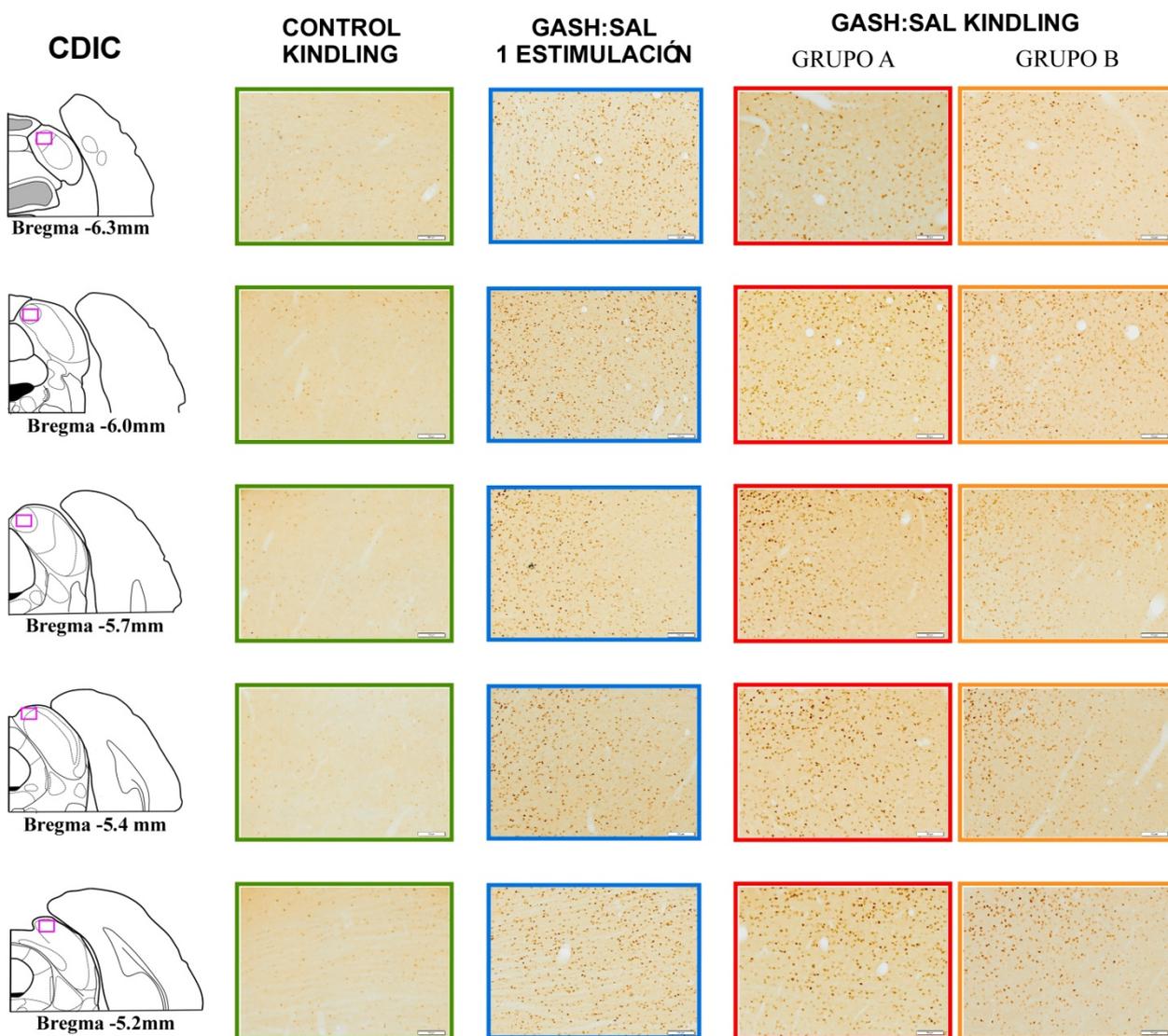
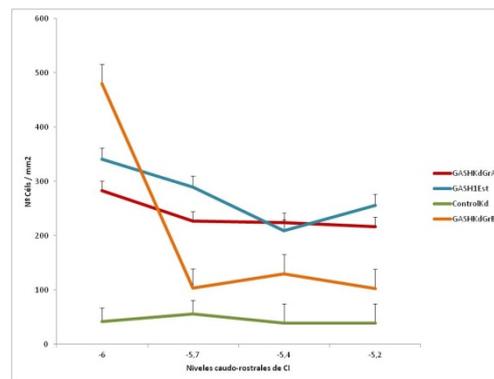


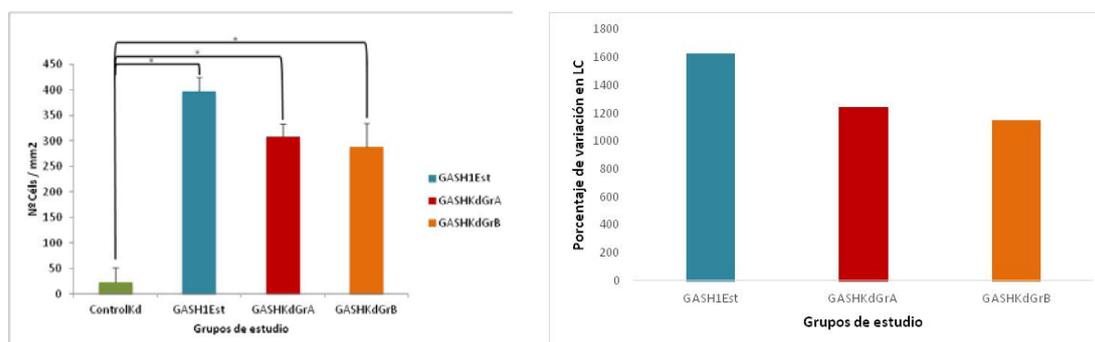
Tabla 6. Inmuntinción de *c-fos* en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo inferior. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se pueden observar las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El subgrupo A presenta valores muy similares a los del grupo GASH:Sal con una

estimulación. Por su parte, se observa una menor densidad en el subgrupo B y finalmente, los menores niveles se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μm .

6.5.2. Locus Coeruleus

El patrón de inmunotinción de *c-fos* observado en LC es muy parecido al descrito en el CI, siendo de nuevo el grupo de GASH:Sal con una estimulación audiogénica el que presenta una mayor densidad de neuronas *c-fos* inmunopositivas ($396,07 \text{ cels/mm}^2 \pm 38,946 \text{ cels/mm}^2$) (Fig. 51) y diferenciándose estadísticamente ($p < 0,05$; $F_{3,27} = 31,597$) el grupo de animales GASH:Sal con una estimulación de los otros tres grupos de estudio (control kindling, subgrupo A y subgrupo B), los cuales presentan valores menores ($22,95 \text{ cels/mm}^2 \pm 38,956 \text{ cels/mm}^2$; $308,80 \text{ cels/mm}^2 \pm 33,728 \text{ cels/mm}^2$ y $287,32 \text{ cels/mm}^2 \pm 67,457 \text{ cels/mm}^2$ respectivamente).

El grupo de animales control kindling presenta valores de densidad de inmunotinción de *c-fos* muy inferiores a los hallados para el resto de grupos (GASH:Sal una estimulación, subgrupo A y subgrupo B), hallándose en todas las comparaciones un porcentaje de variación de la densidad de neuronas *c-fos* inmunorreactivas con respecto a este grupo control kindling más de mil veces mayor en los demás grupos (Fig. 52) ($p < 0,05$; $F_{3,27} = 31,597$).



Figuras 51 (izda) y 52 (dcha). (51) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al núcleo Locus Coeruleus en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el resto de grupos, que muestran valores de densidad superiores ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,27} = 31,597$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en cels /mm². **(52) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el Locus Coeruleus en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 1625% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 1245% en el subgrupo A y del 1152% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

Por otra parte, el análisis caudo-rostral del núcleo no muestra grandes variabilidades de expresión de *c-fos*, exceptuando el subgrupo A, que presenta una mayor densidad de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en la parte más caudal ($353,72 \text{ cels/mm}^2 \pm 33,728 \text{ cels/mm}^2$), respecto a los datos obtenidos para la parte rostral ($263,87 \text{ cels/mm}^2 \pm 33,728 \text{ cels/mm}^2$) del Locus Coeruleus (Fig. 53, tabla 7).

Figura 53. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas en sentido caudo-rostral en el Locus Coeruleus de los grupos estudiados. Los datos se expresan en número de células / mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunoreactivas constantes en los grupos GASH:Sal con una estimulación, que mantiene los valores mas elevados en las secciones estudiadas, en el subgrupo A y en el subgrupo B se observan valores ligeramente inferiores respecto al grupo GASH:Sal con una estimulación. El grupo control kindling presenta los menores valores en las secciones de estudio.

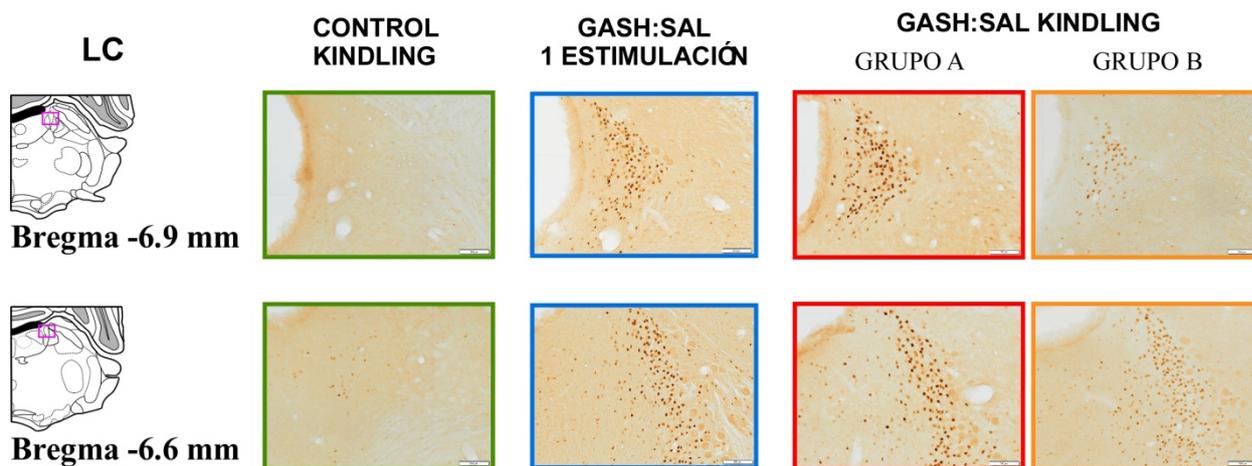
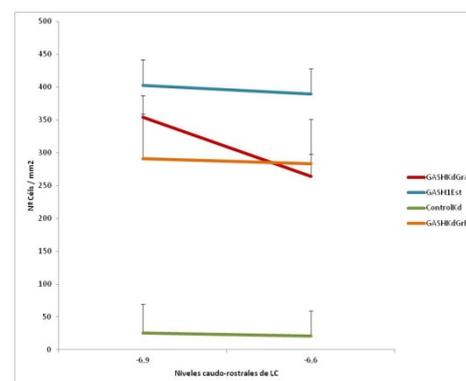


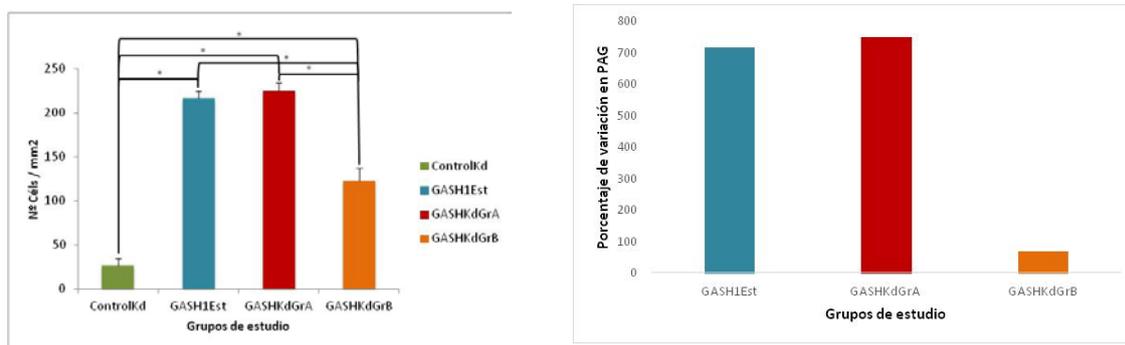
Tabla 7. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales del troncoencéfalo conteniendo el Locus coeruleus. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías del Locus coeruleus en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se pueden observar las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunoreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El subgrupo A presenta valores muy similares a los del grupo GASH:Sal con una estimulación. Por su parte, se observa una menor densidad en el subgrupo B y finalmente, los menores niveles se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 µm.

6.5.3. Sustancia Gris Periacueductal

Los animales del subgrupo A presenta una mayor densidad de expresión de *c-fos* en este núcleo ($225,02 \text{ cels/mm}^2 \pm 8,512 \text{ cels/mm}^2$), siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto a los animales del grupo control kindling ($26,47 \text{ cels/mm}^2 \pm 8,687 \text{ cels/mm}^2$) y al subgrupo B ($112,97 \text{ cels/mm}^2 \pm 14,743 \text{ cels/mm}^2$) ($p < 0,05$; $F_{3, 71} = 114,247$). Por otra parte, también se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo control kindling ($26,47 \text{ cels/mm}^2 \pm 8,687 \text{ cels/mm}^2$) con los del grupo GASH:Sal con una estimulación ($216,08 \text{ cels/mm}^2 \pm 8,512 \text{ cels/mm}^2$) y los del subgrupo B ($112,97 \text{ cels/mm}^2 \pm 14,743 \text{ cels/mm}^2$) (Fig. 54).

El porcentaje de variación en relación con la densidad de inmunotinción a *c-fos* es unas 700 veces mayor, tanto en los grupos de animales GASH:Sal con una estimulación (716%), como en los del

subgrupo A (750%). Se han hallado diferencias significativas en cuanto a la densidad de inmunotinción entre los dos subgrupos de GASH:Sal en este núcleo ($p < 0,05$; $F_{3, 71} = 114,247$) (Fig. 55).



Figuras 54 (izda) y 55 (dcha). (54) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes a la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el resto de grupos, que muestran valores de densidad superiores; también se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo B y el grupo GASH:Sal con una estimulación así como con el subgrupo A ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3, 71} = 114,247$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en cels /mm². **(55) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 716% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 750% en el subgrupo A y del 70% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

La evaluación caudo-rostral del núcleo muestra una diferencia en los patrones de expresión de *c-fos* para cada sección analizada, tal como puede apreciarse en la figura siguiente (Fig 56, tabla 8).

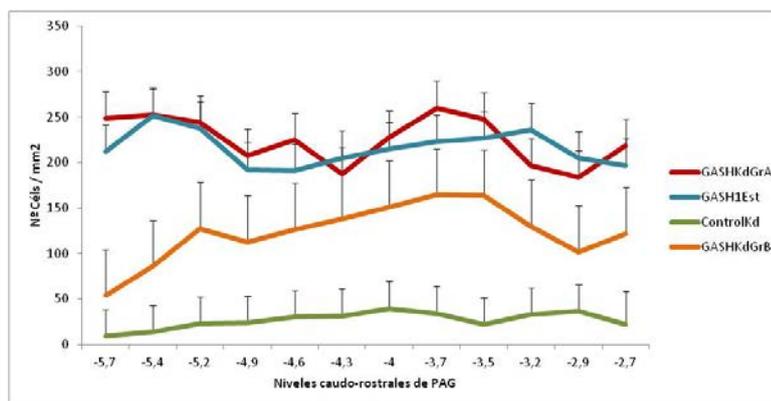
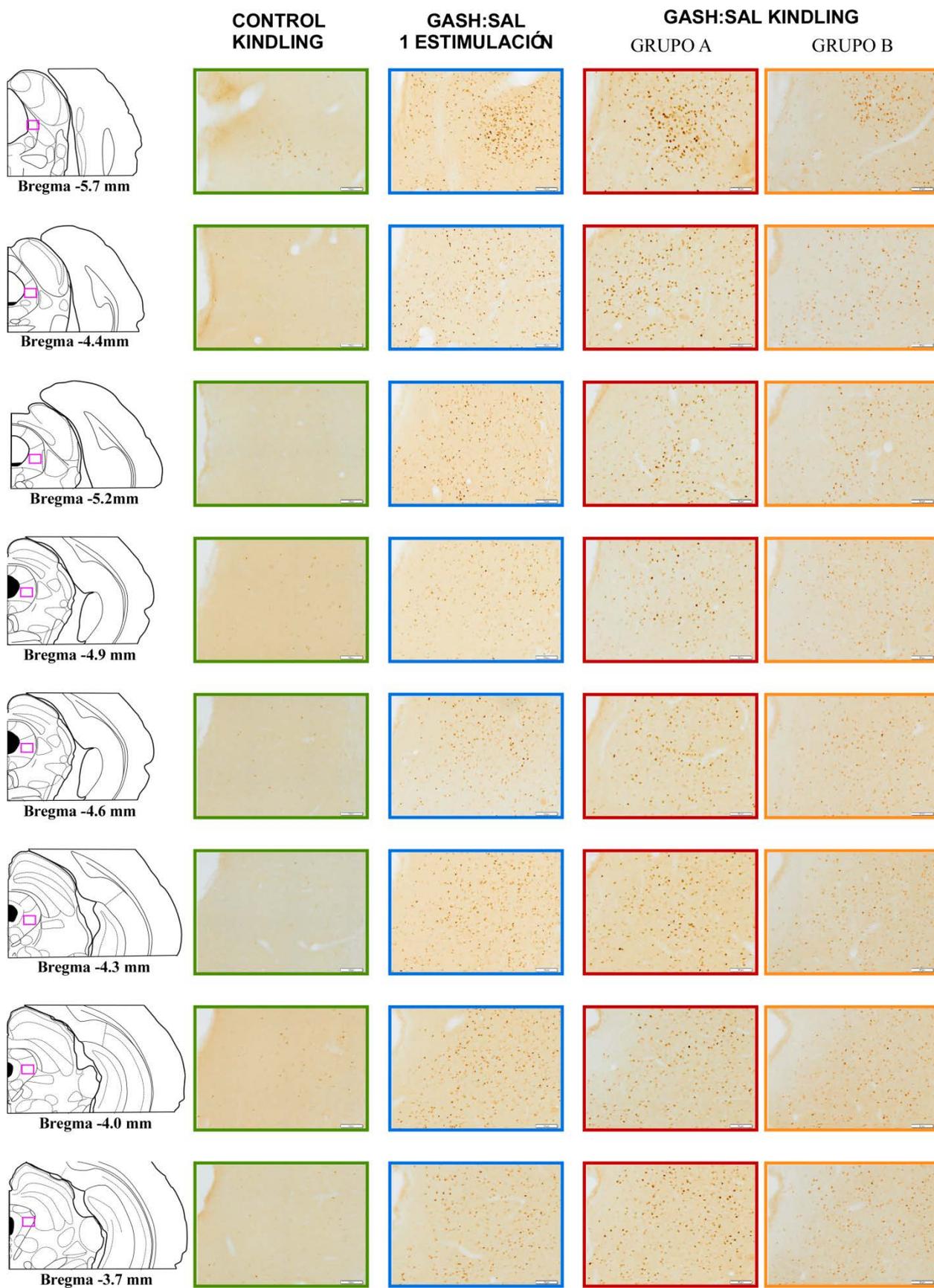


Figura 56. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en la Sustancia Gris Periacueductal de los grupos estudiados. Los datos se expresan en n° de células / mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas constantes en los grupos GASH:Sal con una estimulación y subgrupo A, que mantiene los valores más elevados en las secciones estudiadas; a continuación, en el subgrupo B se observan valores ligeramente inferiores respecto al grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo A. El grupo control kindling presenta los menores valores en las secciones de estudio.



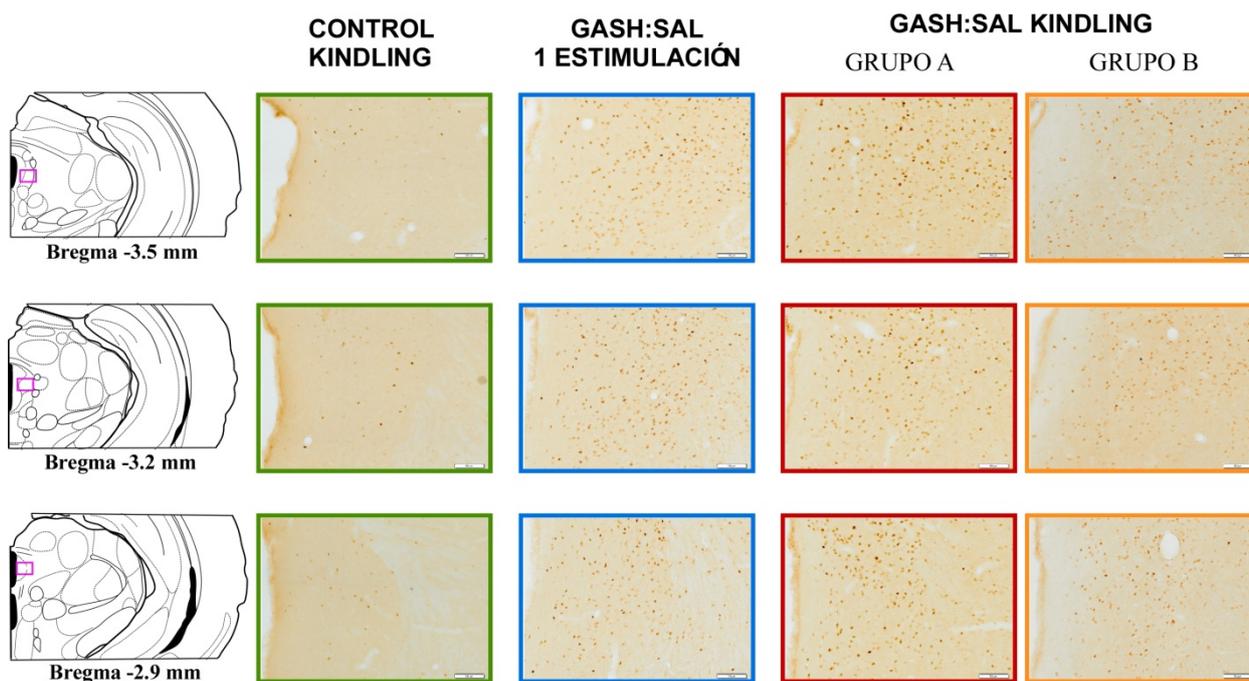
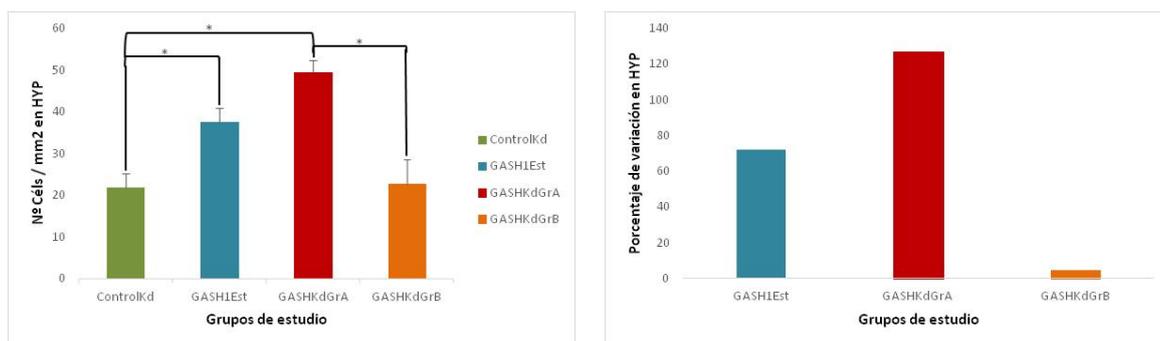


Tabla 8. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales de la Sustancia Gris Periacueductal. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se pueden observar las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del grupo GASH:Sal con una estimulación y los animales pertenecientes al subgrupo A muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El subgrupo B presenta valores similares a los obtenidos en los grupos GASH:Sal con una estimulación y subgrupo A, pero evidenciando niveles inferiores de inmunotinción frente a *c-fos*. Finalmente, los menores niveles de densidad de inmunotinción se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μ m.

6.5.4. Hipocampo

Al igual que los anteriores, el subgrupo A ($49,46 \text{ cels/mm}^2 \pm 2,982 \text{ cels/mm}^2$) y el grupo GASH:Sal con una estimulación ($37,52 \text{ cels/mm}^2 \pm 3,351 \text{ cels/mm}^2$) son los que se diferencian significativamente del resto, mostrando valores superiores a los hallados en los otros dos grupos ($21,809 \text{ cels/mm}^2 \pm 3,351 \text{ cels/mm}^2$ en el grupo control kindling y $22,767 \text{ cels/mm}^2 \pm 5,804 \text{ cels/mm}^2$ en el subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3, 41} = 14,573$), aunque los niveles de células por mm^2 son bajos, encontrándose 50 células por mm^2 el grupo que presenta mayor actividad (subgrupo A). Además, el grupo control kindling se diferencia del grupo GASH:Sal una estimulación (Fig. 57).

En este caso, los subgrupo A y B de GASH:Sal kindling se diferencian significativamente en cuanto a la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas ($p < 0,05$; $F_{3, 41} = 14,573$), presentado el subgrupo B un marcaje muy bajo, en este núcleo en comparación con el subgrupo A (Fig. 58).



Figuras 57 (izda) y 58 (dcha). (57) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación, así como con el subgrupo A, que muestran valores de densidad superiores; también se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y el subgrupo B ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,41} = 14,573$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en células/mm². **(58) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el Hipocampo en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 72% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 127% en el subgrupo A y del 4% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

En el análisis caudo-rostral de las secciones observamos que las mayores diferencias de los valores obtenidos se encuentran en la sección más caudal de las estudiadas, mientras que se observan solapamientos en cuanto a la densidad en la sección más rostral. A lo largo de todo el eje caudo-rostral se evidencia que los resultados obtenidos para el grupo de hámsteres control kindling y los del subgrupo B no presentan ninguna diferencia estadística (Fig. 59; tabla 9).

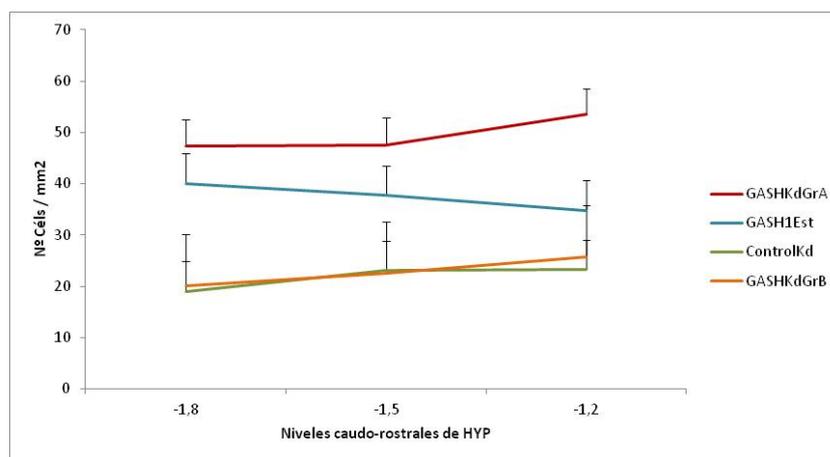
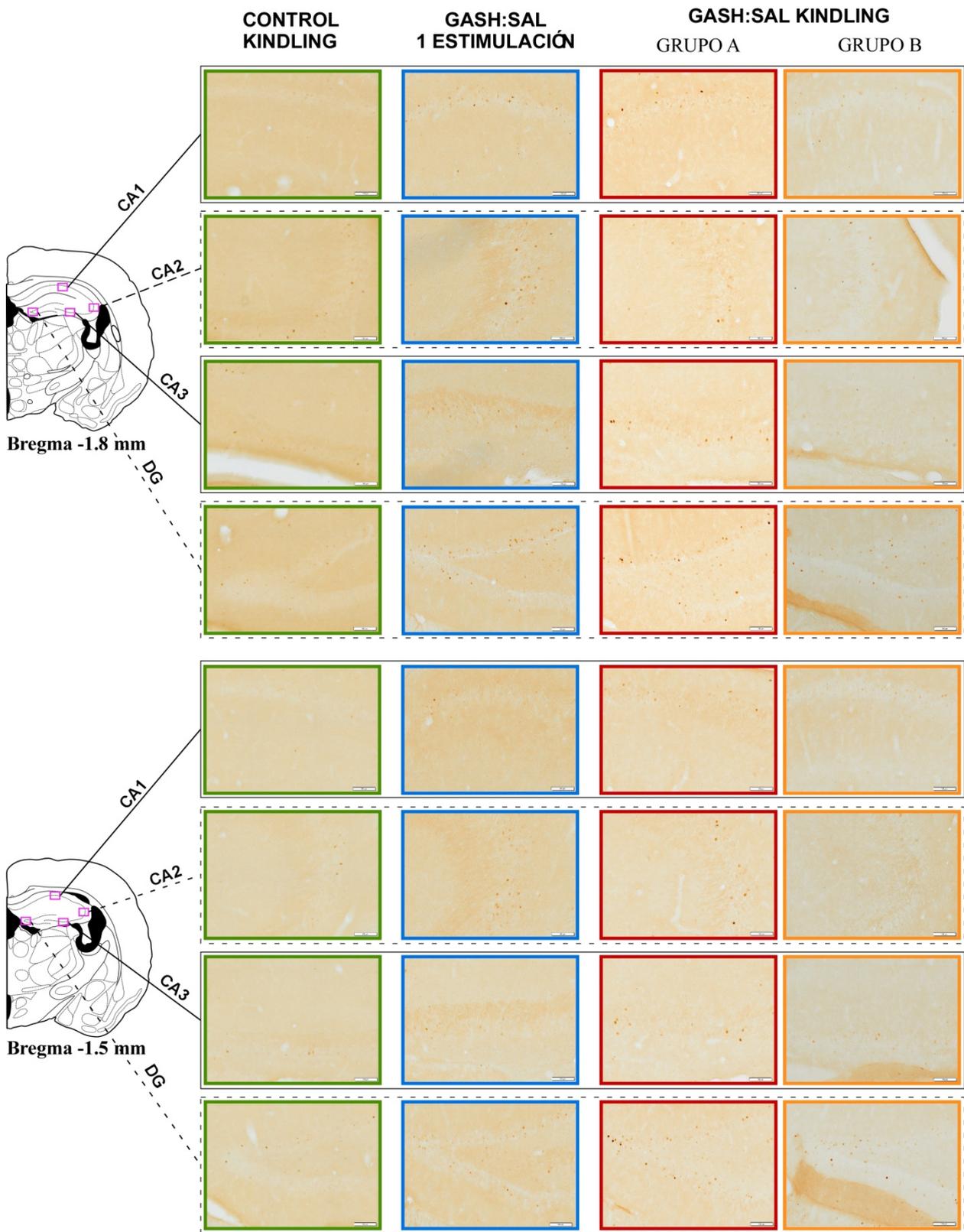


Figura 59. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en el Hipocampo de los grupos estudiados. Los datos se expresan en número de células/mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas constantes en los diferentes grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El grupo control kindling y el subgrupo B presentan los menores valores en las secciones de estudio.



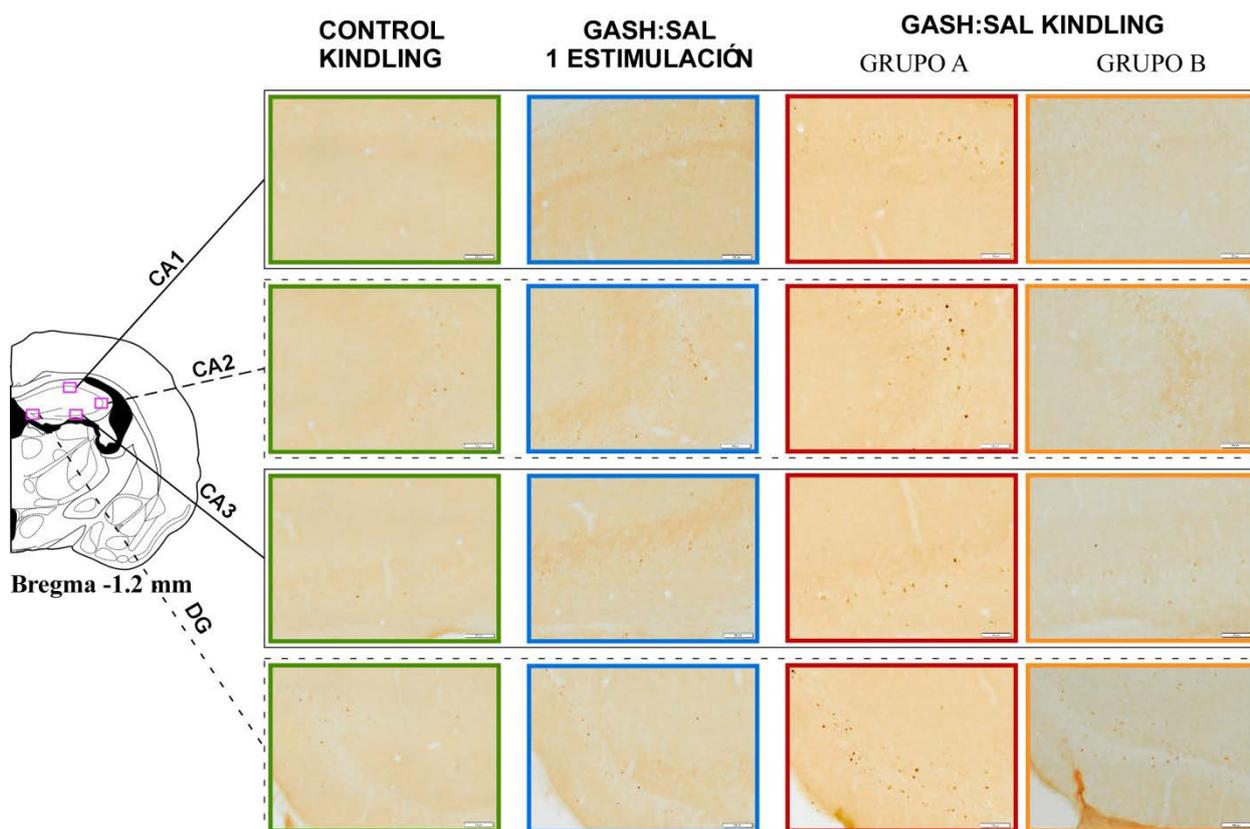
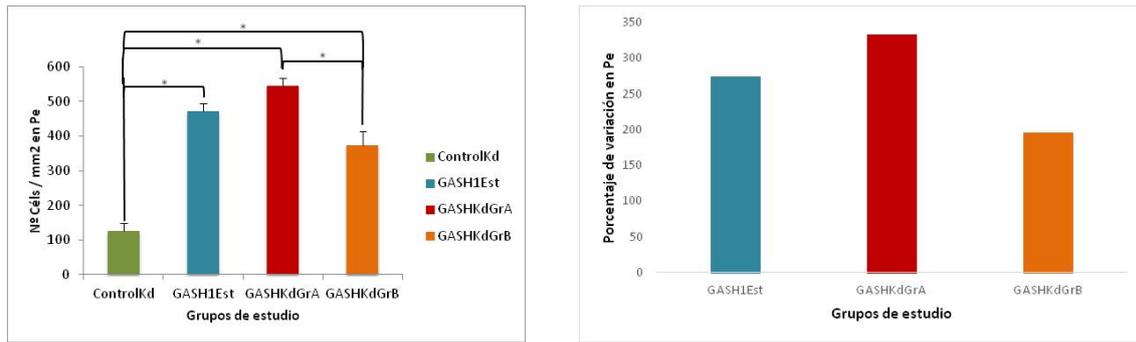


Tabla 9. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales del hipocampo. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes áreas seleccionadas, CA1, CA2, CA3 y DG, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se pueden observar las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El grupo de animales pertenecientes al GASH:Sal con una estimulación presenta valores cercanos, aunque inferiores, a los obtenidos para el subgrupo A. El subgrupo B muestra valores bajos, muy cercanos a los menores niveles de densidad de inmunotinción, que se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μ m.

6.5.5. Núcleo Hipotalámico Periventricular

El subgrupo A ($545,804 \text{ cels/mm}^2 \pm 21,636 \text{ cels/mm}^2$) presenta una mayor expresión de *c-fos* en este núcleo, siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto al grupo control kindling ($125,973 \text{ cels/mm}^2 \pm 23,701 \text{ cels/mm}^2$) y al subgrupo B ($372,270 \text{ cels/mm}^2 \pm 41,051 \text{ cels/mm}^2$) ($p < 0,05$; $F_{3, 20} = 62,645$). Por otra parte, se hallan diferencias significativas entre los grupos control kindling ($125,973 \text{ cels/mm}^2 \pm 23,701 \text{ cels/mm}^2$) y el grupo GASH:Sal con una estimulación ($471,401 \text{ cels/mm}^2 \pm 23,701 \text{ cels/mm}^2$), así como entre control kindling ($125,973 \text{ cels/mm}^2 \pm 23,701 \text{ cels/mm}^2$) y el subgrupo B ($372,270 \text{ cels/mm}^2 \pm 41,051 \text{ cels/mm}^2$) (Fig. 60).

El porcentaje de variación de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al hipocampo muestra un gran incremento del subgrupo A (333%), un aumento del 274% del grupo GASH:Sal con una estimulación y unos valores del 196% superiores en el subgrupo B respecto al al grupo control (Fig. 61).



Figuras 60 (izda) y 61 (dcha). (60) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al Núcleo Hipotalámico Periventricular en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación, así como con el subgrupo A y el subgrupo B, que muestran valores de densidad superiores; también se hallan diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y el subgrupo B ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3, 20} = 62,645$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en células /mm². **(61) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el Núcleo Hipotalámico Periventricular en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 274% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 333% en el subgrupo A y del 196% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

La evaluación caudo-rostral del núcleo muestra un patrón común de marcaje en todos los grupos de hámsteres GASH:Sal, en los que los niveles más caudales presentan mayor inmunotinción mientras los más rostrales disminuyen su densidad de neuronas inmunorreactivas (Fig. 62, tabla 10).

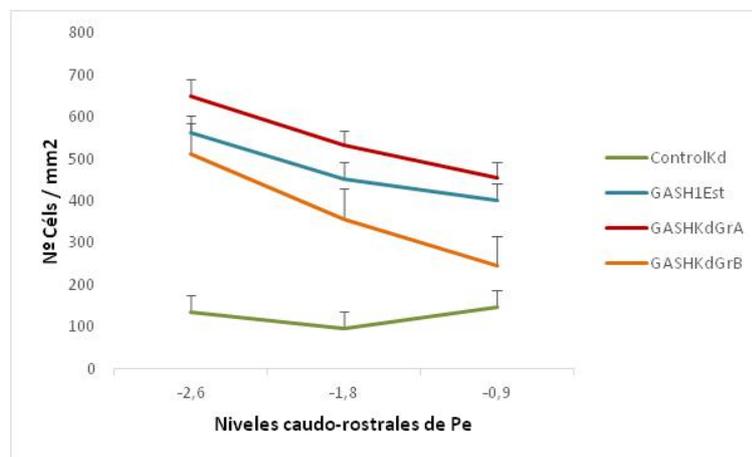


Figura 62. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Hipotalámico Periventricular de los grupos estudiados. Los datos se expresan en valores medios del número de células / mm² para cada sección, con los hemivalores del error estándar de la media. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas constantes en los diferentes grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El subgrupo B presenta valores inferiores y, finalmente, el grupo control kindling muestra los menores valores en las secciones de estudio.

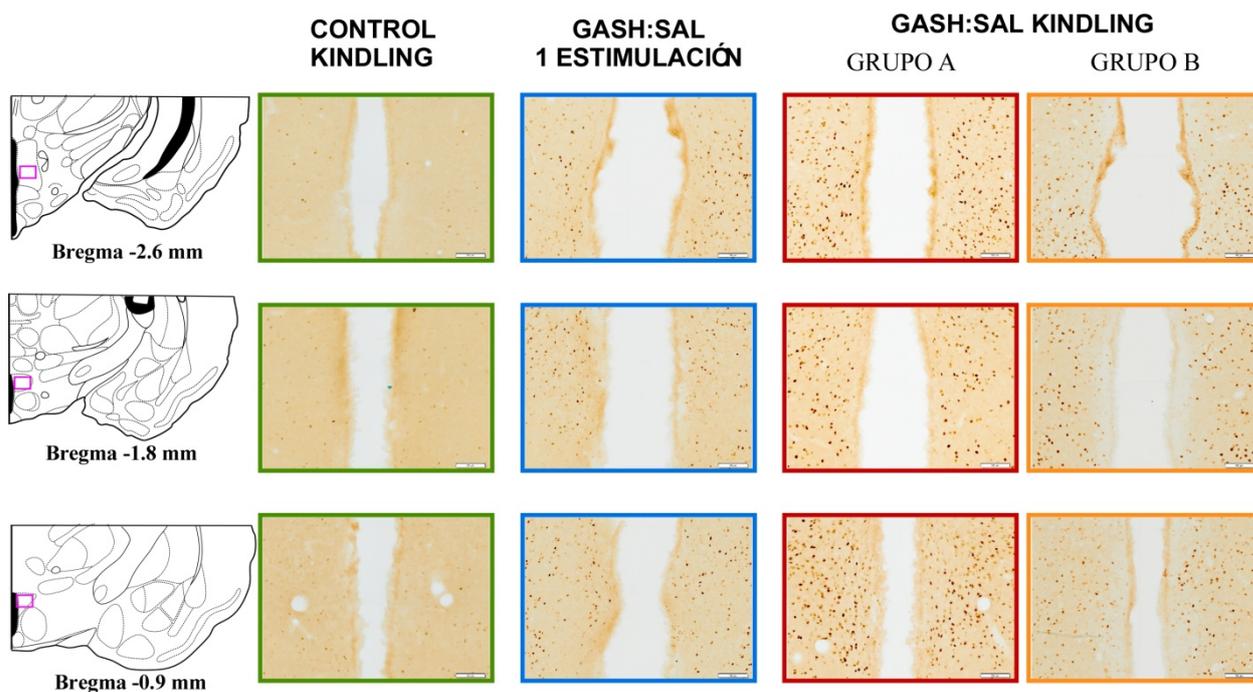


Tabla 10. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales del Núcleo Hipotalámico Periventricular. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se pueden observar las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad de la inmunotinción, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El grupo de animales pertenecientes al GASH:Sal con una estimulación presenta valores cercanos, aunque inferiores, a los obtenidos para el subgrupo A. El subgrupo B muestra valores inferiores de inmunotinción y finalmente, los menores niveles de densidad de inmunotinción se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μ m.

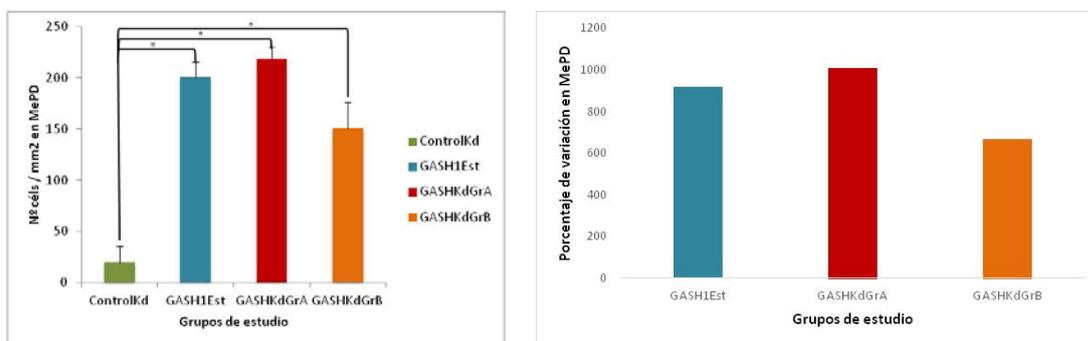
6.5.6. Complejo Amigdalino

En concreto, se analizan los datos de sus núcleos Núcleo Amigdaloides Medial, en su parte posterodorsal, y el Núcleo Amigdaloides Basolateral, tanto en su parte posterior como anterior.

6.5.6.1. Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal

El grupo control kindling presenta unos valores de inmunotinción muy bajos ($20,663 \text{ cels/mm}^2 \pm 16,307 \text{ cels/mm}^2$), determinando diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de grupos evaluados ($200,767 \text{ cels/mm}^2 \pm 15,101 \text{ cels/mm}^2$ en el grupo GASH:Sal con una estimulación; $217,99 \text{ cels/mm}^2 \pm 11,966 \text{ cels/mm}^2$ en el subgrupo A y $150,862 \text{ cels/mm}^2 \pm 25,584 \text{ cels/mm}^2$ en el subgrupo B). No se encontraron diferencias entre ninguno de los otros grupos establecidos en el estudio ($p < 0,05$; $F_{3, 20} = 34,98$) (Fig. 63).

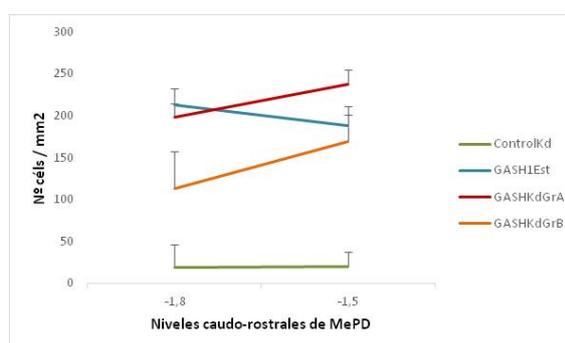
Los porcentajes de variación de la densidad de neuronas *c-fos* inmunoteñidas presentan valores del 921% en el GASH:Sal con una estimulación, un 1008% en el subgrupo A y un 667% en el subgrupo B (Fig. 64).



Figuras 63 (izda) y 64 (dcha). (63) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al Núcleo Amigdalóide Medial Posterodorsal en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el resto de grupos estudiados, que muestran valores de densidad superiores ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3, 20} = 34,98$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en células/mm². (64) **Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el Núcleo Amigdalóide Medial Posterodorsal en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 921% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 1008% en el subgrupo A y del 667% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling.

La representación caudo-rostral del núcleo muestra un patrón de expresión de *c-fos* similar en los dos subgrupos A y B, cuyos valores de densidad se incrementan desde la zona caudal a la rostral, mientras que el GASH:Sal sometido a una estimulación presenta un patrón opuesto, con valores más altos en la zona caudal que en la rostral. En el caso del control kindling, los valores se mantienen constantes y con niveles muy inferiores a lo largo de las dos secciones analizadas (Fig. 65, tabla 11).

Figura 65. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Amigdalóide Medial Posterodorsal de los grupos estudiados. Los datos se expresan en número de células/mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas constantes en los diferentes grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El subgrupo B presenta valores inferiores y, finalmente, el grupo control kindling muestra los menores valores en las secciones de estudio.



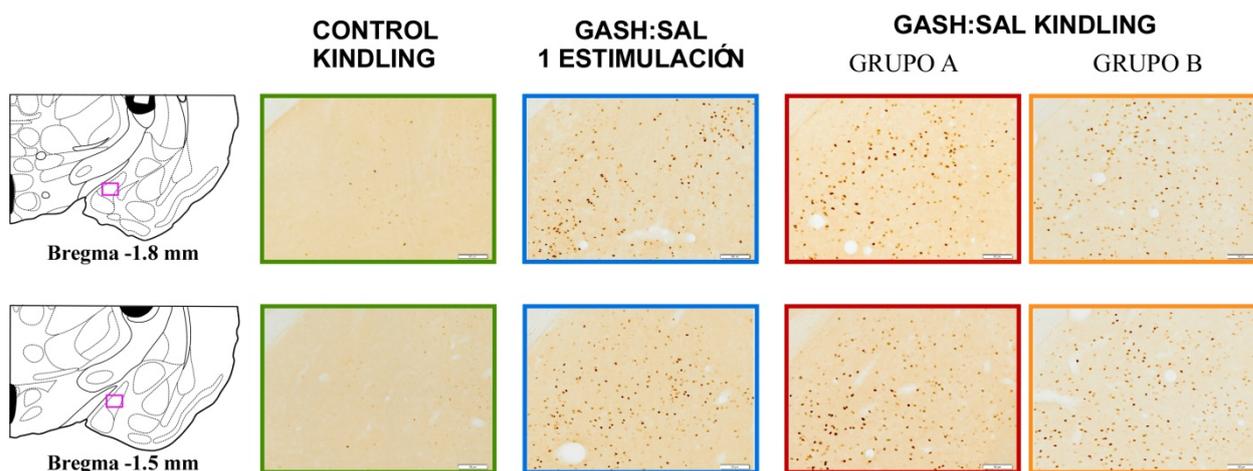
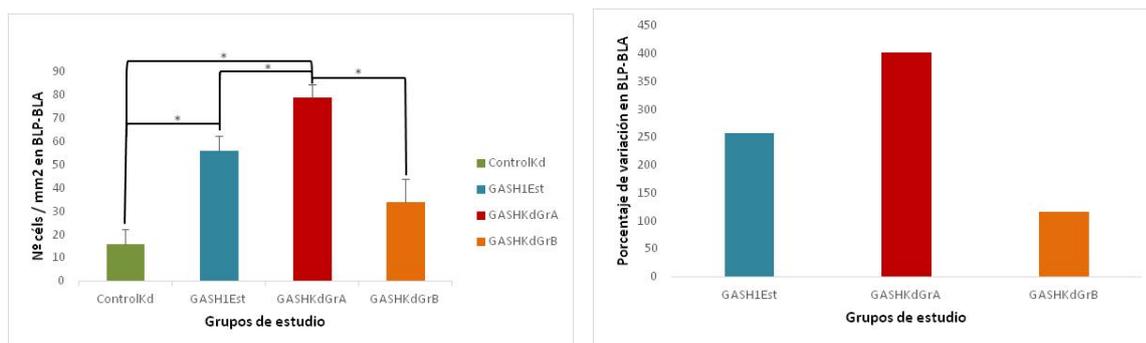


Tabla 11. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales del Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El grupo de animales pertenecientes al GASH:Sal con una estimulación presenta valores cercanos, aunque inferiores, a los obtenidos para el subgrupo A. El subgrupo B muestra valores inferiores de inmunotinción y finalmente, los menores niveles de densidad de inmunotinción se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μ m.

6.5.6.2. Núcleo Basolateral Amigdalino

El subgrupo A presenta los valores de densidad de neuronas inmunorreactivas a *c-fos* más altos ($78,874 \text{ cels/mm}^2 \pm 5,453 \text{ cels/mm}^2$) encontrados en el análisis de este Núcleo Basolateral Amigdalino, diferenciándose estadísticamente de los otros tres grupos de estudio ($15,697 \text{ cels/mm}^2 \pm 6,678 \text{ cels/mm}^2$ en el grupo control kindling; $56,010 \text{ cels/mm}^2 \pm 6,183 \text{ cels/mm}^2$ en el grupo GASH:Sal con una estimulación y $33,893 \text{ cels/mm}^2 \pm 10,096 \text{ cels/mm}^2$ en el subgrupo B). Por su parte, el grupo GASH:Sal una estimulación ($56,010 \text{ cels/mm}^2 \pm 6,183 \text{ cels/mm}^2$) se diferencia también del control kindling ($15,697 \text{ cels/mm}^2 \pm 6,678 \text{ cels/mm}^2$). Finalmente el subgrupo B ($33,893 \text{ cels/mm}^2 \pm 10,096 \text{ cels/mm}^2$) sólo presenta diferencias estadísticas con el subgrupo A ($78,874 \text{ cels/mm}^2 \pm 5,453 \text{ cels/mm}^2$), ($p < 0,05$; $F_{3, 20} = 19,159$) (Fig. 66).

Existe un amplio rango de los porcentajes de variación de los niveles de densidades de inmunotinción frente a *c-fos* observados en este núcleo. El grupo GASH:Sal con una estimulación presenta un 257% de incremento de inmunotinción; el subgrupo A, un 402% y el subgrupo B un 116% (Fig. 67).



Figuras 66 (izda) y 67 (dcha). (66) Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes al Núcleo Basolateral Amigdalino en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas entre el grupo control kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación, así como con el subgrupo A; también se hallan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo A, así como entre el subgrupo A y el subgrupo B (n=3 en grupo control kindling, n=3 en grupo GASH:Sal una estimulación, n=4 en subgrupo A y n=2 en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,20} = 19,159$). Los datos están expresados como el valor medio de la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas \pm error estándar de la media y medidos en células /mm². **(67) Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el Núcleo Basolateral Amigdalino en los cuatro grupos de estudio.** Se observa un incremento del 257% en el grupo GASH:Sal con una estimulación respecto al grupo control kindling, un aumento del 402% en el subgrupo A y del 116% en el subgrupo B respecto al grupo control kindling. Abreviaturas; BLP- Núcleo Basolateral Amigdalino Posterior; BLA- Núcleo Basolateral Amigdalino Anterior.

El análisis caudo-rostral evidencia que las mayores diferencias en las densidades de inmunotinción frente a *c-fos* del Núcleo Basolateral Amigdalino se encuentran en las áreas caudales del mismo, mientras que las secciones rostrales muestran una densidad de expresión de *c-fos* más similares (Fig. 68, tabla 12).

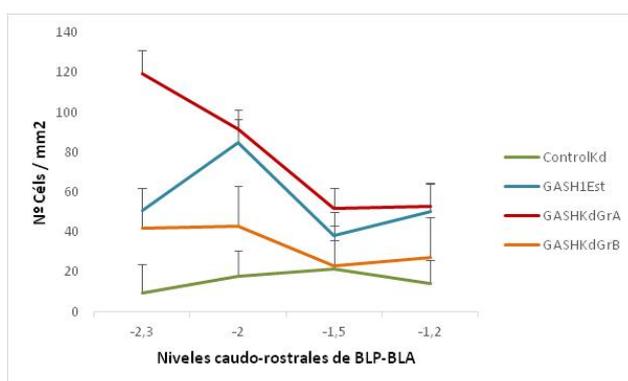


Figura 68. Valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en sentido caudo-rostral en el Núcleo Basolateral Amigdalino de los grupos estudiados. Los datos se expresan en número de células / mm² para cada sección. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas distintos en los diferentes grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El subgrupo B presenta valores inferiores y, finalmente, el grupo control kindling muestra los menores valores en las secciones de estudio. Se pueden observar las mayores diferencias en cuanto a la densidad de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en la sección más caudal estudiada en este núcleo, mientras que las secciones rostrales muestran densidades de inmunotinción más parecidas. Abreviaturas; BLP- Núcleo Basolateral Amigdalino Posterior; BLA- Núcleo Basolateral Amigdalino Anterior.

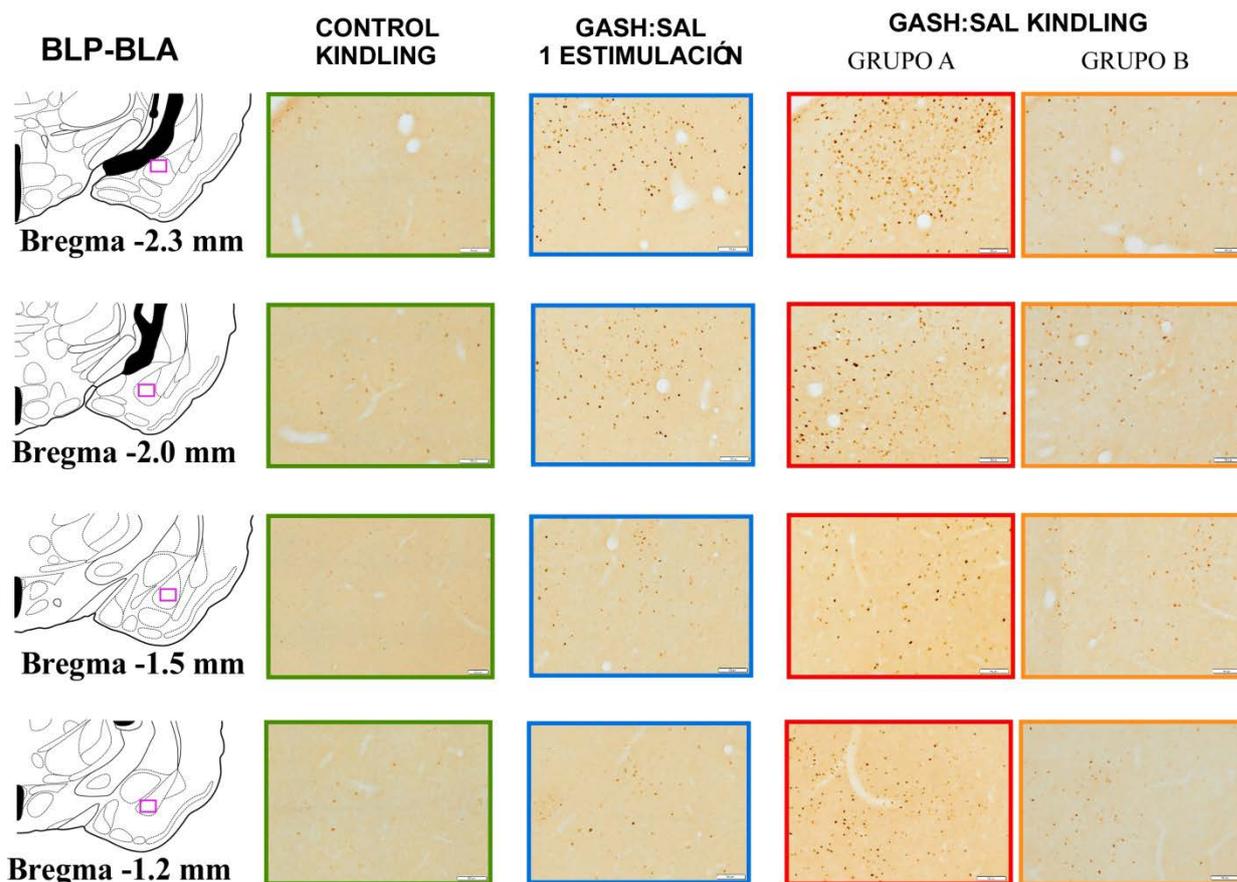


Tabla 12. Inmunotinción de *c-fos* en secciones coronales del Núcleo Basolateral Amigdalino. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la expresión neuronal de *c-fos* según el grupo. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas *c-fos* inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos. El grupo de animales pertenecientes al GASH:Sal con una estimulación presenta valores cercanos, aunque inferiores, a los obtenidos para el subgrupo A. El subgrupo B muestra valores inferiores de inmunotinción y finalmente, los menores niveles de densidad de inmunotinción se encuentran en el grupo control kindling. Barra de calibración: 100 μ m.

6.5.7. Todos los núcleos en conjunto

El **subgrupo A** destaca por su densidad de inmunotinción frente a *c-fos* del Núcleo Hipotalámico Periventricular en comparación con el resto de grupos de estudio. Por otra parte, aunque no se diferencia de una forma tan intensa, también presenta los mayores valores de inmunotinción para los núcleos siguientes: Hipocampo, Núcleo Amigdalino Basolateral, Núcleo Medial Posterodorsal y Sustancia Gris Periacueductal.

El **grupo GASH:Sal con una estimulación** presenta una mayor densidad de neuronas inmunoteñidas frente a *c-fos* en los núcleos de Colículo Inferior y Locus Coeruleus.

Finalmente, el **grupo control kindling** es el que presenta un menor número de neuronas

inmunorreactivas a *c-fos* en todos los núcleos estudiados (Fig. 69).

De acuerdo a la densidad en la expresión de *c-fos*, se demuestra la existencia de dos subgrupos dentro del grupo GASH:Sal sometido a kindling, un subgrupo que muestra mayor inmunotinción para todos los núcleos evaluados y un subgrupo con valores inferiores de inmunotinción; estos grupos se corresponden con los animales A y B descritos en el protocolo de kindling.

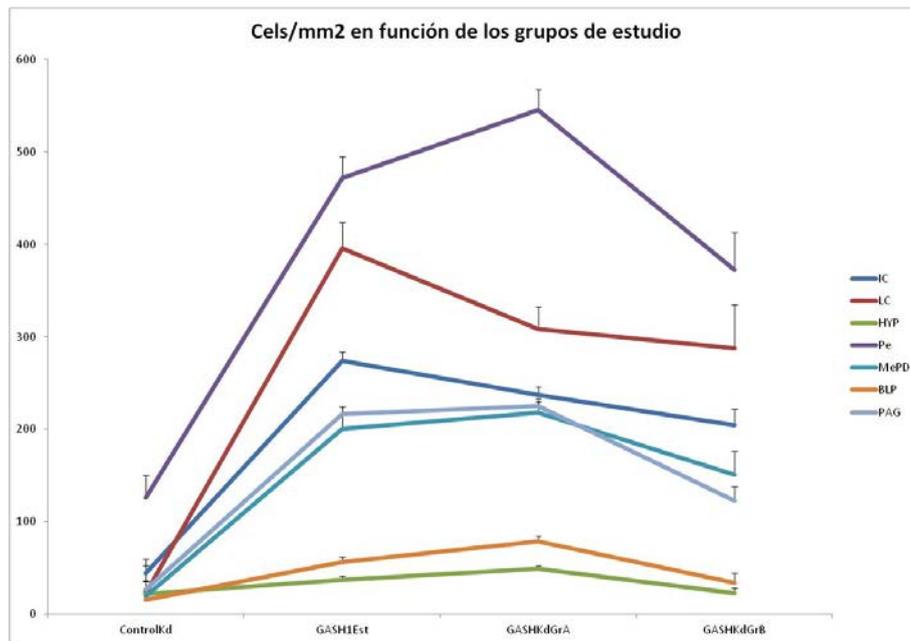


Figura 69. Valores de las densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas correspondientes a cada núcleo analizado en los cuatro grupos de estudio. Abreviaturas; IC- Colículo Inferior; LC-Locus Coeruleus; HYP- Hipocampo; Pe- Núcleo Hipotalámico Periventricular; MePD- Núcleo Amigdalóide medial Posterodorsal; BLP- Núcleo Basolateral Amigdalino Posterior; PAG- Sustancia Gris Periacueductal.

La evaluación conjunta de los porcentajes de variación agrupados en función de los núcleos de estudio permite observar que las diferencias más notables de porcentajes de expresión de *c-fos* entre los subgrupos de kindling se encuentran en la Sustancia Gris Periacueductal y en el Hipocampo, en los que el subgrupo B presenta valores muy inferiores a los demás grupos. Por otra parte, tanto el Colículo Inferior como el Locus Coeruleus mantienen una misma tendencia de expresión evidenciando una mayor inmunotinción en el grupo de GASH:Sal con una estimulación. Finalmente, la evaluación de los núcleos de localización más rostral muestra una mayor expresión de *c-fos* del subgrupo A (Fig. 70).

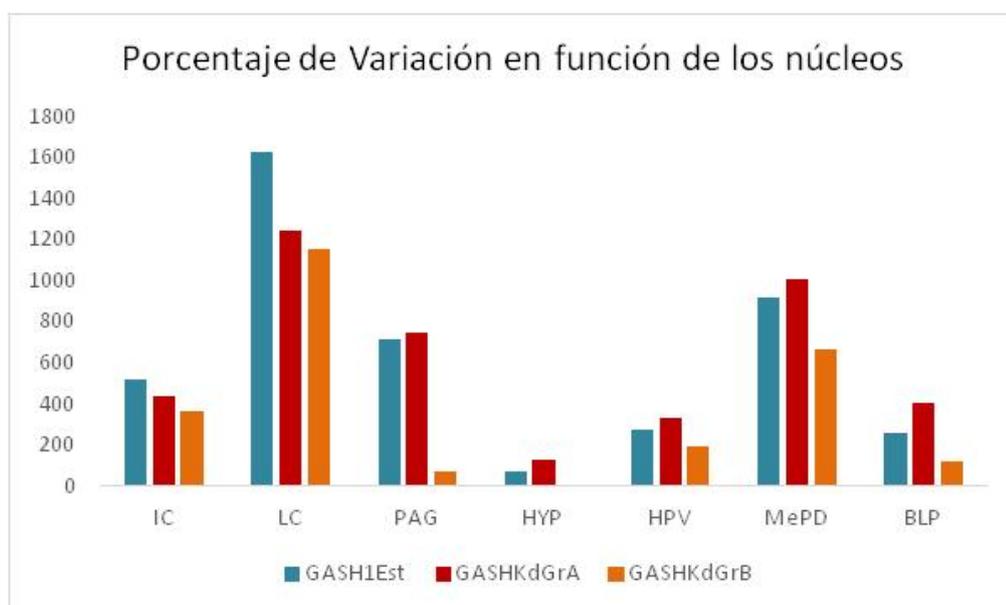


Figura 70. Porcentaje de Variación de los niveles de densidades de expresión de neuronas *c-fos* inmunorreactivas en el conjunto de núcleos analizados en los cuatro grupos de estudio. Se observa un incremento en Colículo Inferior y Locus Coeruleus superior en el grupo GASH:Sal con una estimulación, un incremento más pronunciado en los núcleos Sustancia Gris Periacueductal, Hipocampo, Núcleo Hipotalámico Periventricular, Núcleo Amigdalóide Medial Posterodorsal y Núcleo basolateral Amigdalino en el subgrupo A; finalmente, el subgrupo B presenta valores muy inferiores de porcentaje de variación en comparación con el grupo GASH:Sal con una estimulación y subgrupo A. Abreviaturas; IC- Colículo Inferior; LC-Locus Coeruleus; HYP- Hipocampo; Pe- Núcleo Hipotalámico Periventricular; MePD- Núcleo Amigdalóide medial Posterodorsal; BLP- Núcleo Basolateral Amigdalino Posterior; PAG- Sustancia Gris Periacueductal.

6.6. Neurodegeneración: Distribución de caspasa-3-activa en el cerebro del GASH:Sal

Se establece una doble tinción de Nissl y caspasa-3-activa como método de evaluación de la exactitud del marcaje de áreas en procesos de neurodegeneración, de manera que se establece como criterio de selección de las áreas, aquellas cuyo marcaje de los cuerpos picnóticos de Nissl y mayor tinción de caspasa-3-activa colocalizasen. La siguiente figura (71) muestra células en degeneración, intensamente teñidas por esta doble tinción.

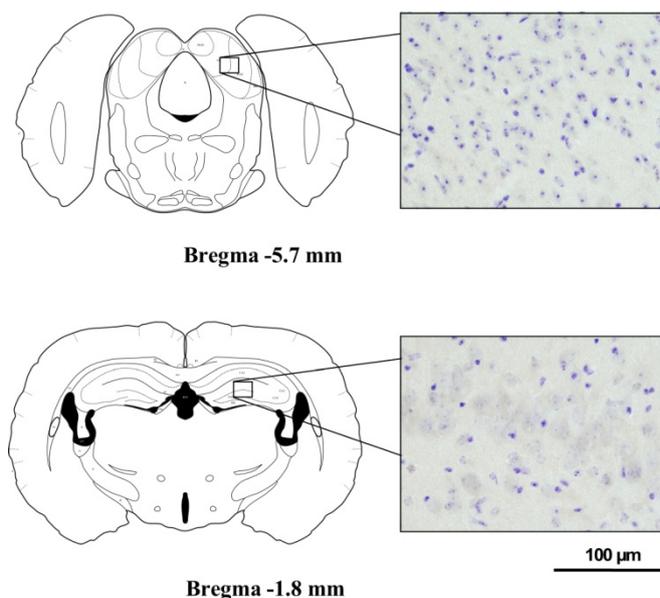


Figura 71. Doble tinción de caspasa-3 activa y Nissl en el Colículo Inferior (imagen superior) y en el Hipocampo (imagen inferior). Se observa la colocalización de núcleos picnóticos e inmunotinción frente a caspasa-3 activa (flechas) en ambos núcleos. Barra de calibración: 100 µm.

Se encuentra una diferencia significativa de la inmunotinción frente a caspasa-3 activa en dos de los núcleos estudiados: en el Colículo Inferior y el Hipocampo; no hallándose diferencias en cuanto al marcaje frente a caspasa-3 activa entre los grupos de estudio planteados en el caso del tercer núcleo analizado, la Sustancia Gris Periacueductal.

6.6.1. Colículo inferior y sustancia gris periacueductal

Los datos de inmunotinción frente a caspasa-3-activa del Colículo Inferior muestran que los grupos con mayor tinción son el GASH:Sal una estimulación (0,267 D.O. \pm 0.015 D.O.) y el subgrupo A (0,300 D.O. \pm 0.015 D.O.), mostrando, éste último diferencias significativas respecto a los grupos control kindling y subgrupo B (0,246 D.O. \pm 0,01 D.O en el grupo control kindling y 0,233 D.O. \pm 0,01 D.O en el subgrupo B) ($p < 0,05$, $F_{3,60} = 5,02$) (Fig. 72, tabla 13).

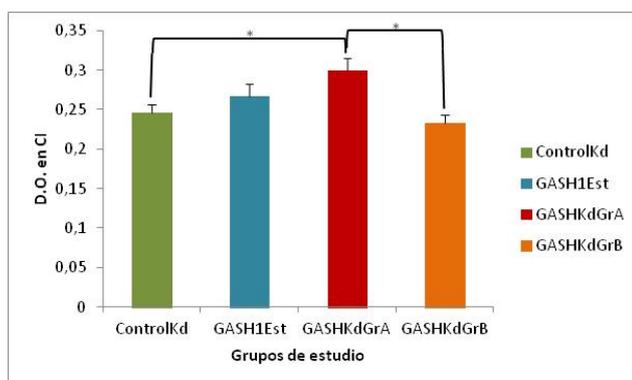


Figura 72. Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción frente a caspasa-3 activa correspondientes al Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad inmunotinción de neuronas caspasa-3 activa entre el grupo control kindling y el subgrupo A; se diferencian estadísticamente el subgrupo A y el subgrupo B ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal con una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,60} = 5,02$). Los datos están expresados como el valor medio de los niveles de grises \pm error estándar de la media y se miden en D. O.

El análisis de las regiones del Colículo Inferior define la corteza dorsal (CDIC) como el área con mayor inmunorreactividad frente a caspasa-3 activa, mientras que el núcleo central (NCIC) es el menos inmunoteñido (Fig. 73). Las diferencias estadísticas halladas entre los subgrupos A y B de GASH:Sal kindling se registran espacialmente en la corteza dorsal ($p < 0,05$, $F_{3,60} = 3,63$).

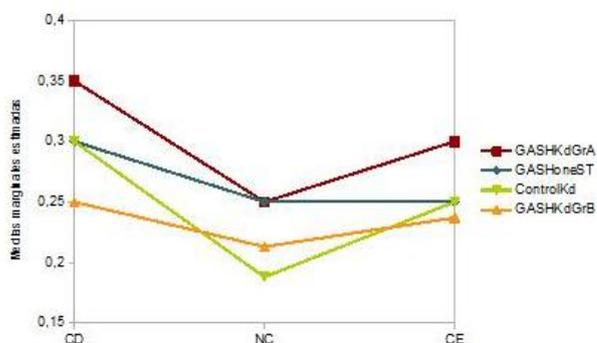


Figura 73. Valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunorreactivas en las tres regiones estudiadas en el Colículo Inferior: Corteza Dorsal (CDIC), Núcleo Central (NCIC) y Corteza Externa (CEIC). Los datos se expresan en D. O. para cada región. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunorreactivas diferentes en los distintos grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El subgrupo B y el grupo control kindling presentan valores inferiores.

En la Sustancia Gris Periacueductal, el grupo que presenta mayor inmunotinción frente a caspasa-3 activa es el subgrupo A (0,700 D.O. \pm 0.014 D.O.); sin embargo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de grupos de estudio (0,633 D.O. \pm 0.01 D.O. en el grupo control kindling; 0,625 D.O. \pm 0.014 D.O. en el grupo GASH:Sal con una estimulación y 0,583 D.O. \pm 0.01 D.O. en el subgrupo B) (Fig. 74, tabla 13).

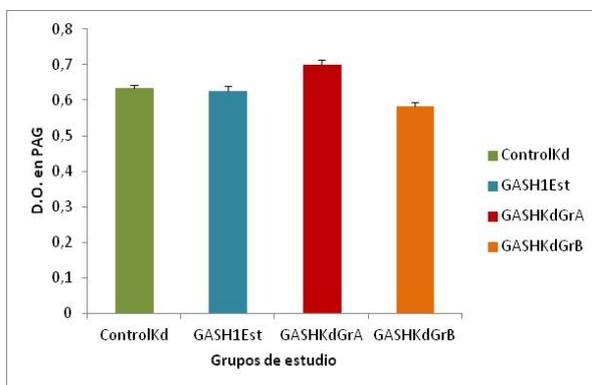
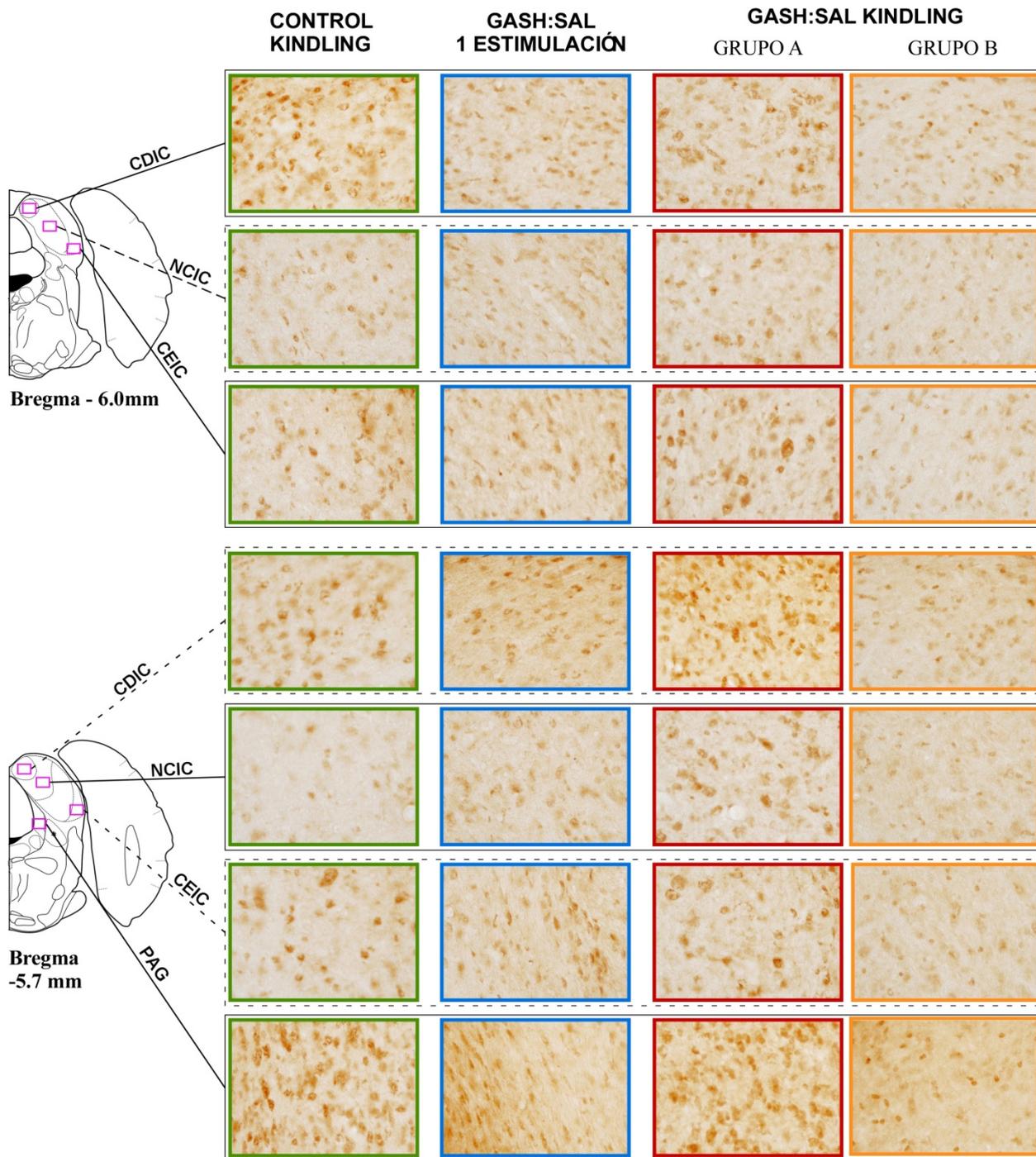


Figura 74. Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción frente a caspasa-3 activa correspondientes a la Sustancia Gris Periacueductal en los cuatro grupos de estudio. Se aprecian los valores de densidad de inmunotinción de neuronas caspasa-3 activa sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B). Los datos están expresados como el valor medio de los niveles de grises \pm error estándar de la media y se miden en D. O.



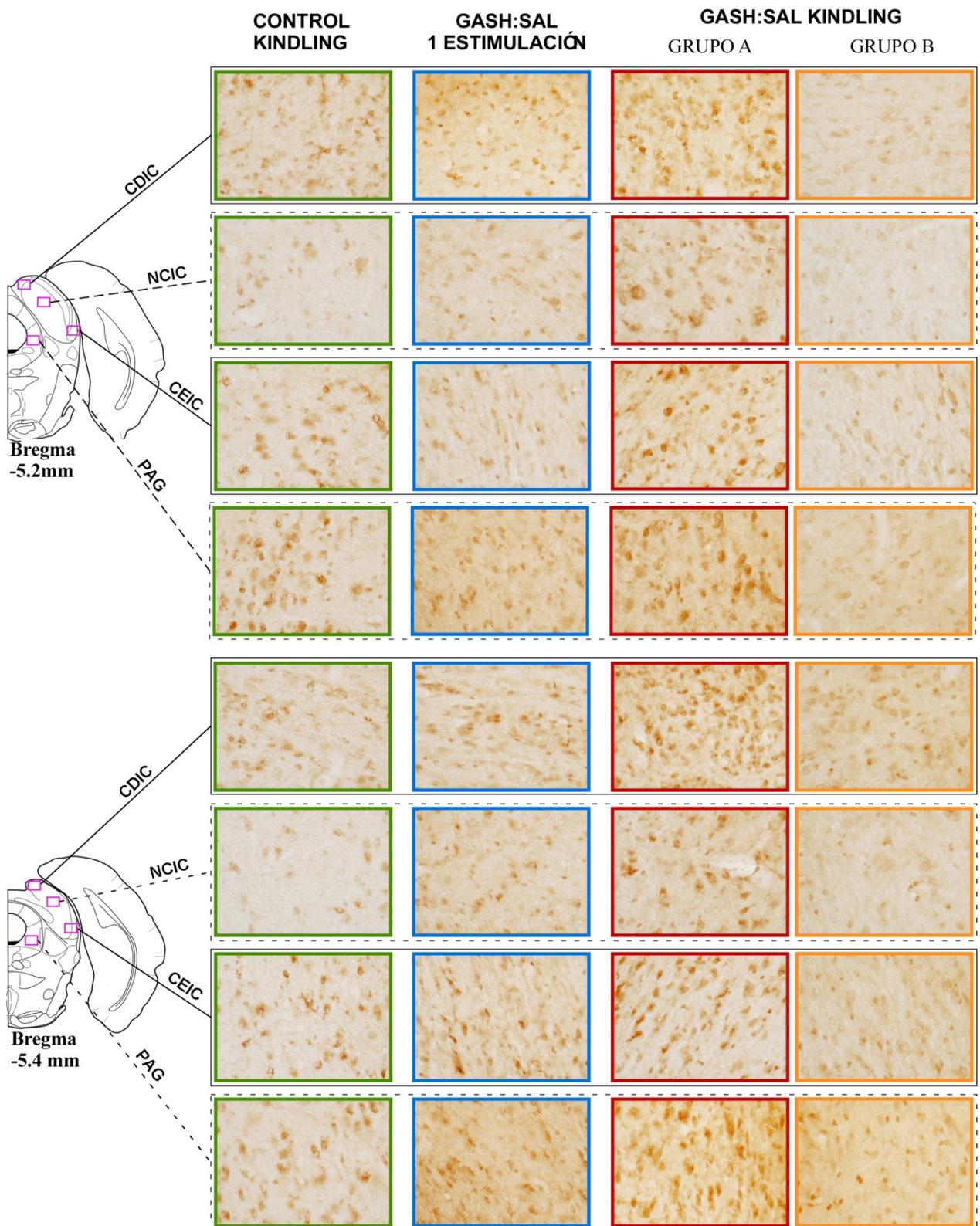


Tabla 13. Inmunotinción de caspasa-3 activa en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo Inferior y Sustancia Gris Periaqueductal. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la inmunotinción frente a caspasa-3 activa según los grupos de estudio. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas caspasa-3 inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el Colículo Inferior respecto al grupo control kindling y al subgrupo B. En cuanto a la

Sustancia Gris Periacueductal, aunque los mayores niveles de inmunotinción frente a la caspasa-3 activa también se hallan en el subgrupo A, no existen diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos estudiados.

6.6.2. Hipocampo

En el Hipocampo, el grupo con mayor inmunoreactividad a caspasa-3-activa es el subgrupo A, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de grupos ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 15,49$). El grupo control kindling (0,317 D.O. \pm 0.035 D.O.) muestra diferencias estadísticas respecto a los subgrupos A (0,433 D.O. \pm 0.049 D.O.) y B (0,300 D.O. \pm 0.035 D.O.) ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 15,49$), pero no respecto al grupo de animales GASH:Sal con una estimulación (0,367 D.O. \pm 0.049 D.O.) (Fig. 75).

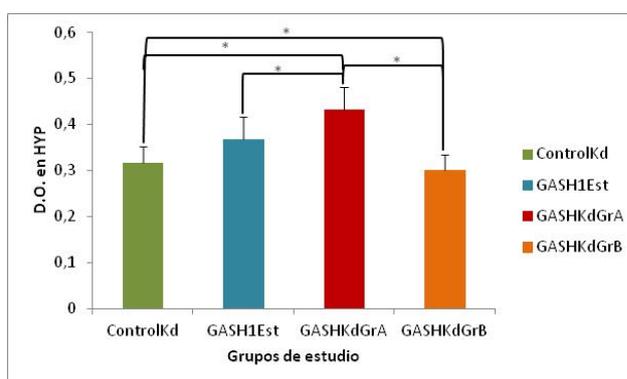
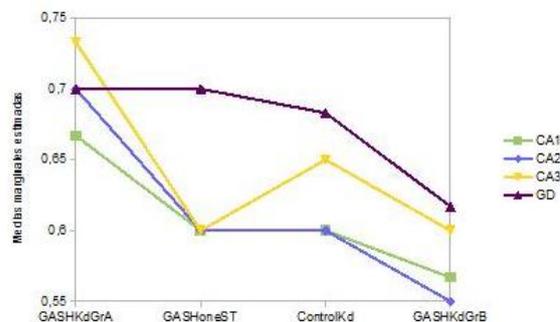
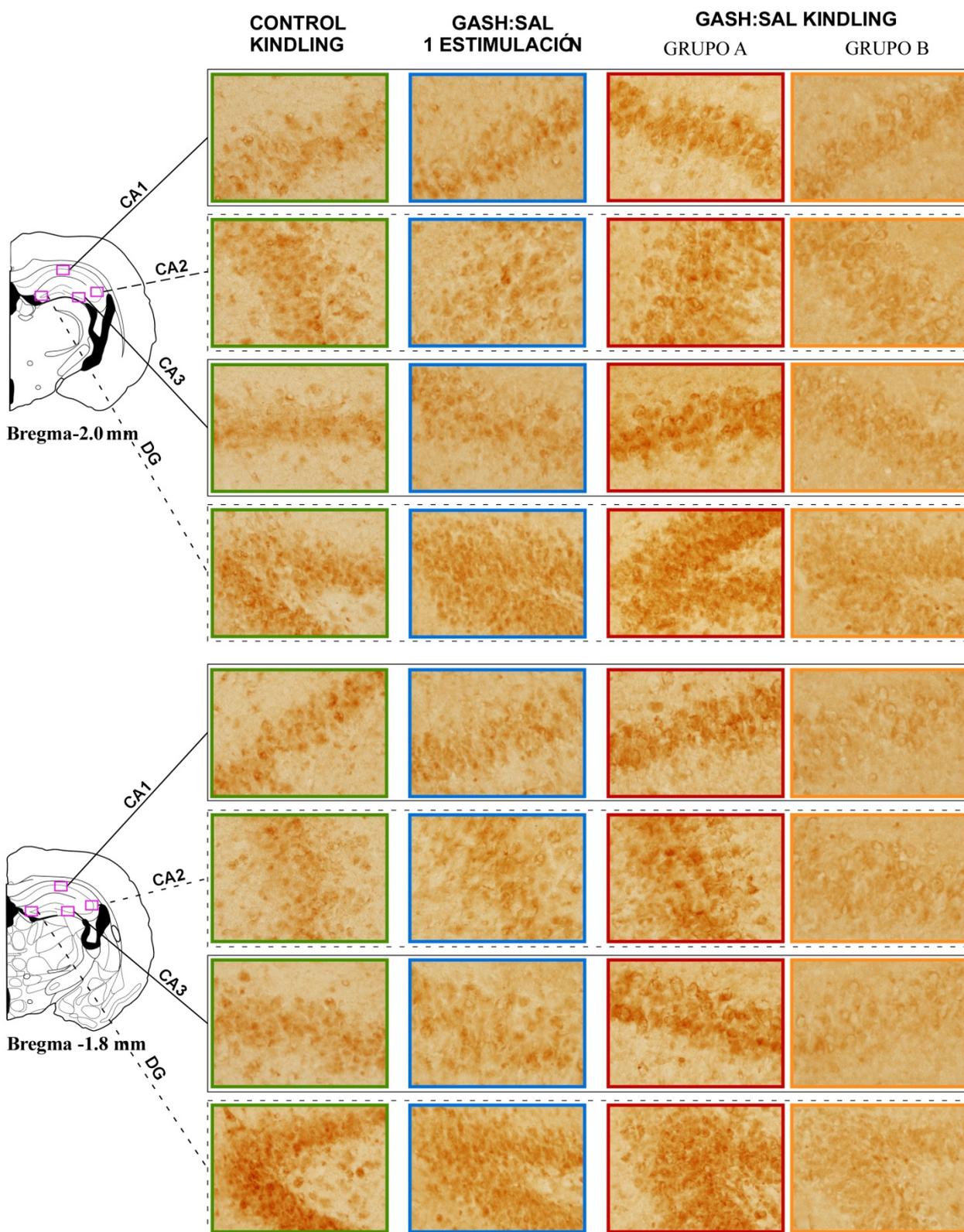


Figura 75. Valores de la cuantificación de las densidades de inmunotinción frente a caspasa-3 activa correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio. Se diferencian los valores de densidad de inmunotinción de neuronas caspasa-3 activa entre el grupo control kindling y el subgrupo A, así como con el subgrupo B; también entre el subgrupo A y el subgrupo B; y entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo A ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 15,49$). Los datos están expresados como el valor medio de los niveles de grises \pm error estándar de la media y se miden en D. O.

El estudio de las distintas áreas del Hipocampo muestra diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la inmunotinción frente a caspasa-3-activa en CA1 ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 2,8$), CA2 ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 6,3$) y CA3 ($p < 0,05$, $F_{3,56} = 5,75$), no encontrándose diferencias en DG (Fig. 76, tabla 14).

Figura 76. Valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunoreactivas en las regiones estudiadas en el Hipocampo: Cornu Ammonis 1 (CA1), Cornu Ammonis 2 (CA2) y Cornu Ammonis 3 (CA3). Los datos se expresan en D. O. para cada región. Se aprecian valores de densidad de expresión de neuronas caspasa-3 activa inmunoreactivas diferentes en los distintos grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo GASH:Sal con una estimulación se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A. El subgrupo B y el grupo control kindling presentan valores inferiores.





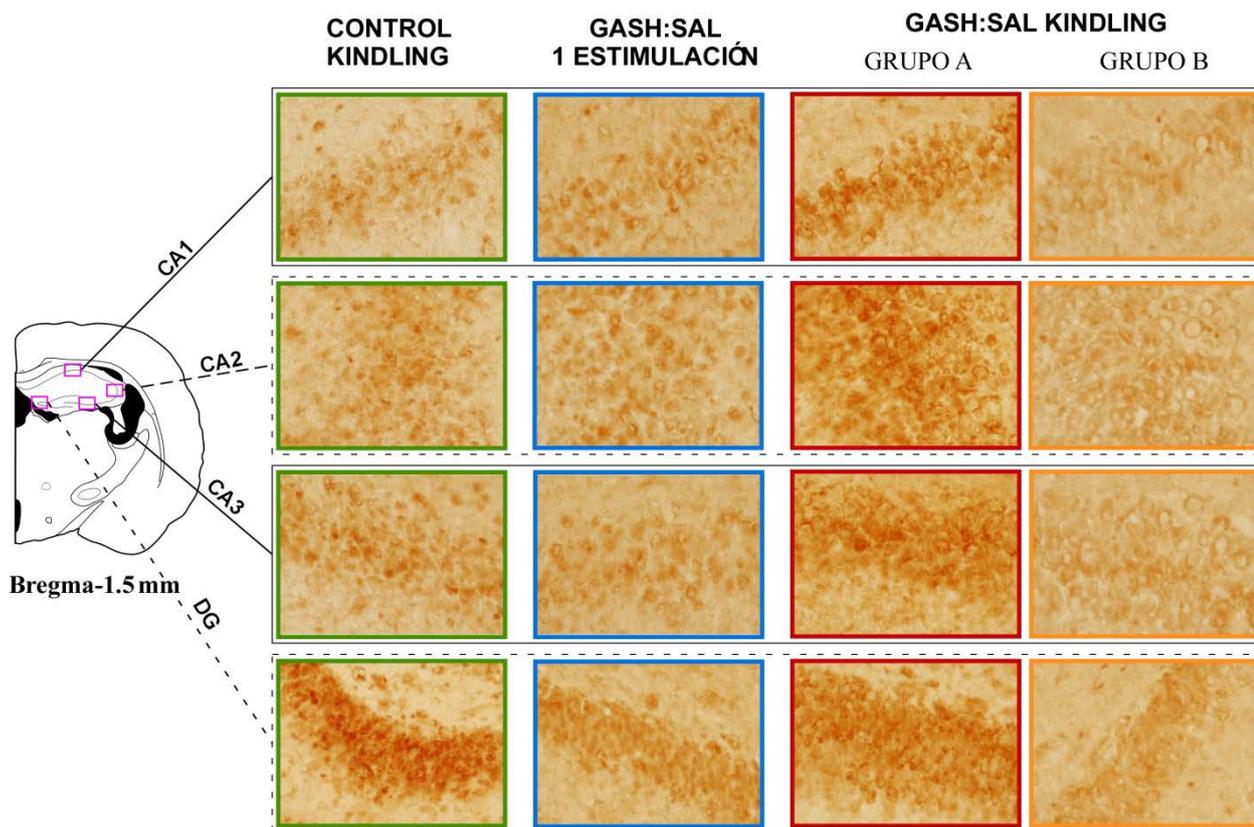


Tabla 14. Inmunotinción de caspasa-3 activa en secciones coronales del Hipocampo. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la inmunotinción frente a caspasa-3 activa según los grupos de estudio. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de neuronas caspasa-3 activas inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el Hipocampo respecto al grupo control kindling, al grupo GASH:Sal con una estimulación y al subgrupo B. También se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control kindling y el subgrupo B.

6.7. Datos preliminares de neurogénesis en el GASH:Sal kindling

El análisis de las secciones inmunoteñidas frente a Ki67 y NeuN en el hipocampo del GASH:Sal kindling permitió detectar dobles marcajes, poniendo así de manifiesto la formación de nuevas neuronas es el modelo experimental utilizado en este trabajo, el GASH:Sal (Fig. 77). Estos datos confirman un hecho establecido en numerosos modelos experimentales de epilepsia en los que se describe la existencia de procesos de neurogénesis. Los datos preliminares obtenidos en nuestra línea permiten establecer una futura vía de investigación.

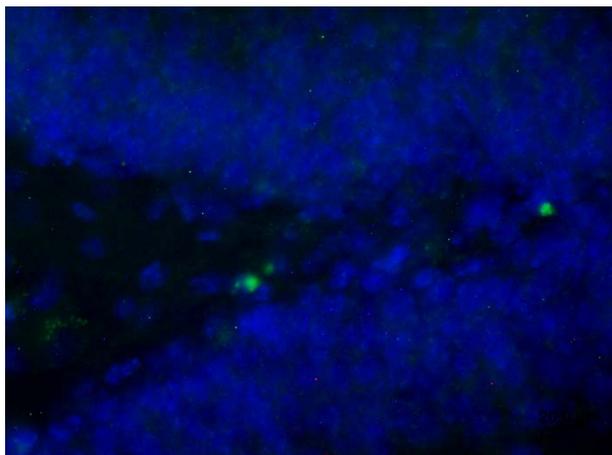


Figura 77. Microfotografía de la zona subgranular del giro dentado hipocampal seleccionada de la sección de un animal perteneciente al subgrupo A de GASH:Sal kindling. Se observan los núcleos neuronales de neuronas maduras en azul (DAPI) y en verde dos núcleos teñidos con Ki67.

6.8. Estado de la población glial

La evaluación de GFAP se lleva a cabo en dos de los seis núcleos del estudio realizado con *c-fos*. Se selecciona como núcleo del tronco encefálico el Colículo Inferior, y como núcleo límbico, el Hipocampo.

6.8.1. Colículo Inferior

En el Colículo Inferior el análisis estadístico realizado en tres secciones (Bregma -6.0 mm, o nivel más caudal del IC; Bregma -5,7 mm y Bregma -5,4 mm o nivel más rostral) muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hámsteres control kindling ($12,40\% \pm 0,59\%$) y el grupo de GASH:Sal con una estimulación ($7,44\% \pm 0,91\%$), así como entre el grupo GASH:Sal con una estimulación ($7,44\% \pm 0,91\%$) con el Grupo GASH:Sal kindling, tanto el subgrupo A ($13,45\% \pm 1,02\%$) como el subgrupo B ($11,89\% \pm 1,06\%$). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje marcado de GFAP del subgrupo A y el B ($p < 0,05$; $F_{3,20} = 5,422$), (Fig. 78).

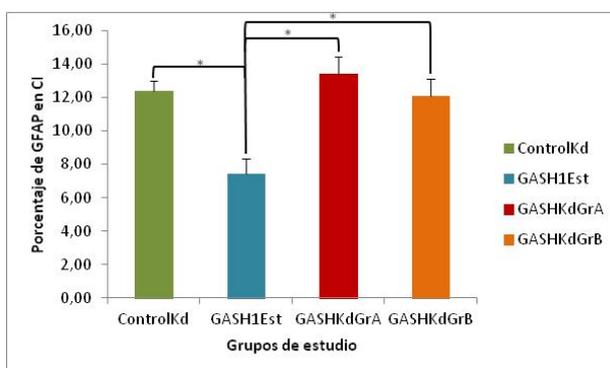


Figura 78. Valores del marcaje de células gliales inmunoteñidas frente a GFAP correspondientes al Colículo Inferior en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de inmunotinción de células gliales frente a GFAP entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el resto de grupos estudiados ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,20} = 5,422$). Los datos están expresados como el valor medio del porcentaje de tinción \pm error estándar de la media y se miden en porcentaje.

Por otra parte, la evaluación caudo-rostral del IC muestra una tendencia en tres de los grupos en la que los menores valores obtenidos en cada caso se sitúan en el corte central; sin embargo, en el

subgrupo GASH:Sal Kindling B, la tendencia es a la inversa, presentando los valores más altos en la sección central de las estudiadas. Además, salvo en el grupo GASH:Sal con una estimulación, el resto de grupos experimentales se encuentran muy próximos en cuanto a los valores obtenidos (Fig. 79, tabla 15).

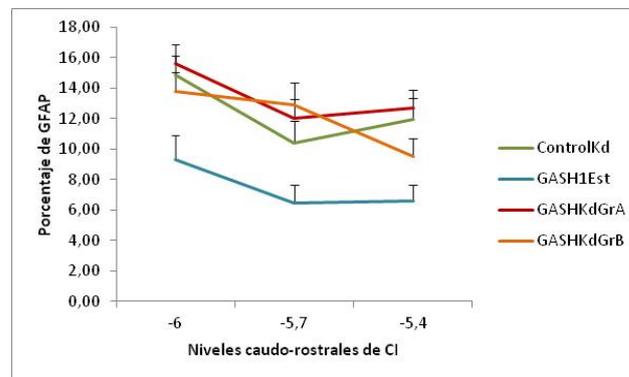


Figura 79. Valores del marcaje de células gliales inmunoteñidas frente a GFAP en las tres secciones caudo-rostrales estudiadas en el Colículo Inferior (IC). Los datos se expresan en porcentaje para cada región. Se aprecian valores de marcaje frente a GFAP diferentes en los distintos grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo control kindling se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A, seguido del subgrupo B. El grupo GASH:Sal con una estimulación presenta valores inferiores.

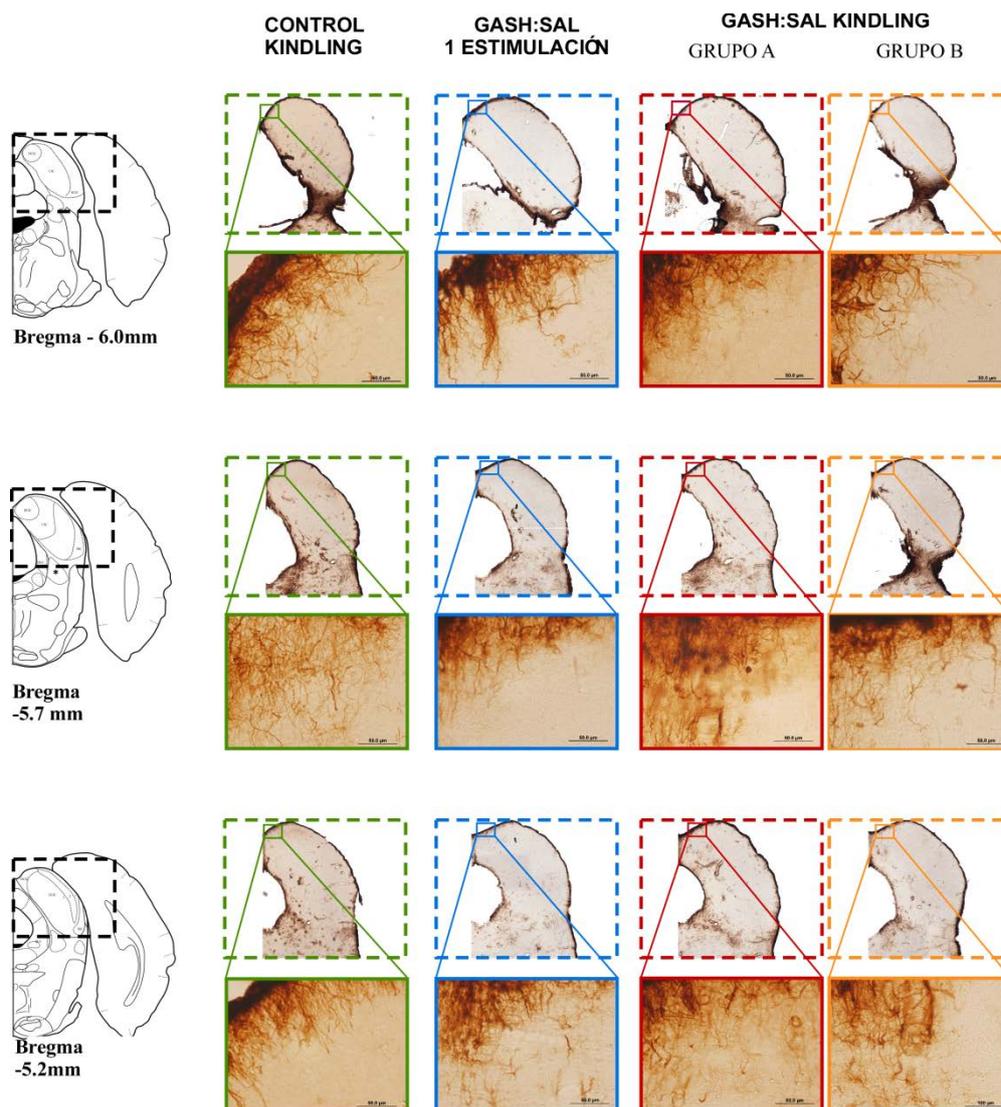


Figura 15. Inmunotinción de GFAP en secciones coronales de la corteza dorsal del Colículo Inferior. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la inmunotinción frente a GFAP según los grupos de estudio. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de células gliales inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el Colículo Inferior respecto al grupo GASH:Sal con una estimulación. También se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo GASH:Sal con una estimulación y el grupo control kindling y el subgrupo B.

6.8.2. Hipocampo

En cuanto al Hipocampo, los resultados obtenidos en el porcentaje de marcaje de GFAP para cada uno de los grupos de estudio fueron los siguientes. Se hallan diferencias estadísticamente significativas del grupo control kindling ($27,42\% \pm 1,30\%$) con cada uno de los otros tres grupos de estudio ($13,99\% \pm 1,63\%$ en el grupo GASH:Sal con una estimulación; $36,58\% \pm 2,41\%$ en el subgrupo A y $18,24\% \pm 2,25\%$ en el subgrupo B). Además, el grupo GASH:Sal con una estimulación ($13,99\% \pm 1,63\%$) se diferencia también del subgrupo A ($36,58\% \pm 2,41\%$) pero no del subgrupo B ($18,24\% \pm 2,25\%$). Finalmente, también se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos A ($36,58\% \pm 2,41\%$) y B ($18,24\% \pm 2,25\%$) en cuanto a su porcentaje de marcaje de GFAP en el hipocampo ($p < 0,05$; $F_{3,20} = 23,652$) (Fig. 80).

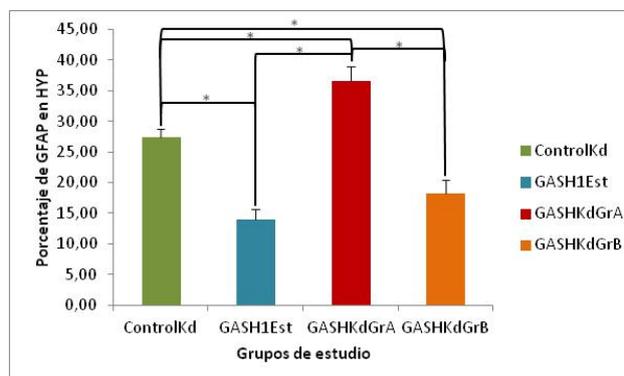


Figura 80. Valores del marcaje de células gliales inmunoteñidas frente a GFAP correspondientes al Hipocampo en los cuatro grupos de estudio. Se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas en los valores de inmunotinción de células gliales frente a GFAP entre el grupo control kindling y el resto de grupos estudiados; además, se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores de inmunotinción de células gliales frente a GFAP entre el subgrupo A y el grupo GASH:Sal con una estimulación, así como con el subgrupo B ($n=3$ en grupo control kindling, $n=3$ en grupo GASH:Sal una estimulación, $n=4$ en subgrupo A y $n=2$ en subgrupo B) ($p < 0,05$; $F_{3,20} = 5,422$). Los datos están expresados como el valor medio del porcentaje de tinción \pm error estándar de la media y se miden en porcentaje.

Finalmente, la representación caudo-rostral del núcleo muestra un patrón similar de marcaje en todos los grupos propuestos, con un ligero incremento de los valores desde la zona caudal a la rostral (Fig. 81, tabla 16).

Figura 81. Valores del marcaje de células gliales inmunoteñidas frente a GFAP en las tres secciones caudo-rostrales estudiadas en el Hipocampo. Los datos se expresan en porcentaje para cada región. Se aprecian valores de marcaje frente a GFAP diferentes en los distintos grupos de estudio, encontrándose el subgrupo A con los valores más elevados; a continuación, en el grupo control kindling se observan valores ligeramente inferiores respecto al subgrupo A, seguido del subgrupo B. El grupo GASH:Sal con una estimulación presenta valores inferiores.

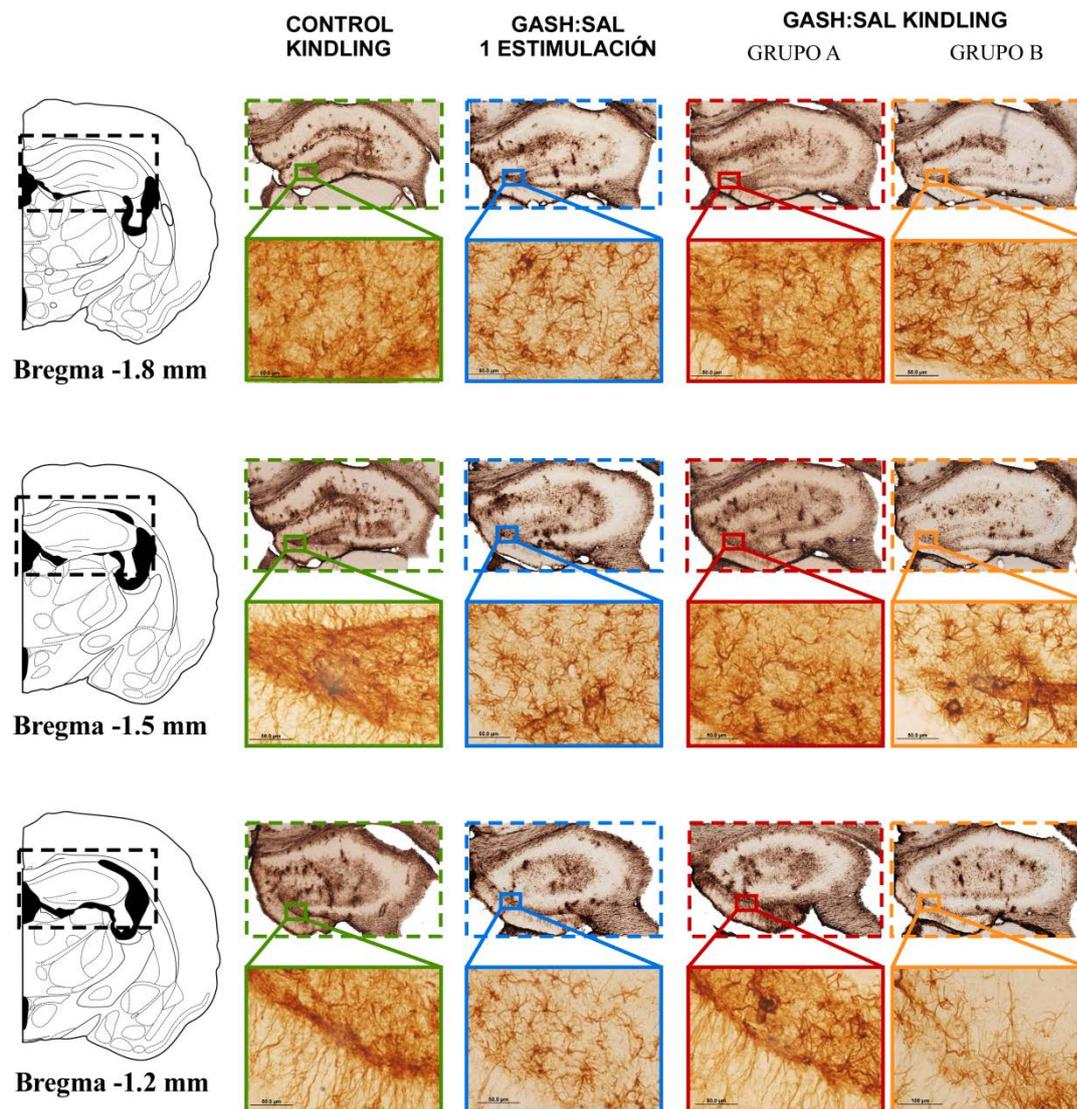
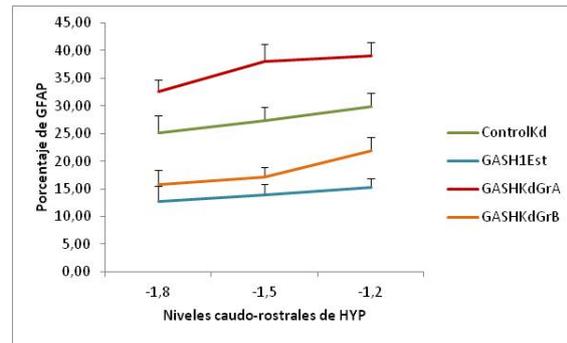
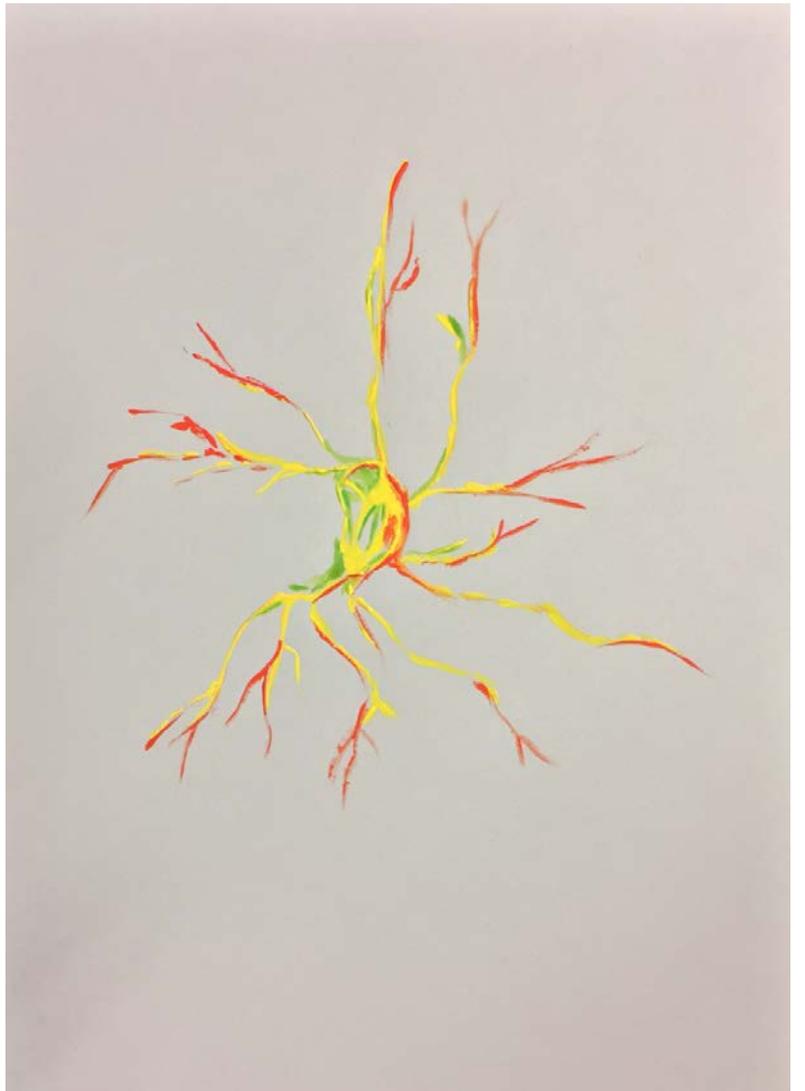


Tabla 16. Inmunotinción de GFAP en secciones coronales del Giro Dentado del Hipocampo. Esquemas a diferentes niveles rostrocaudales mostrando microfotografías de las diferentes zonas seleccionadas, en los grupos de estudio, que se encuentran divididos por columnas. Se evidencian las diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la inmunotinción frente a GFAP según los grupos de estudio. Como se corrobora por el estudio de densidad, los animales del subgrupo A muestran un mayor número de células gliales inmunorreactivas por unidad de área que el resto de grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el Hipocampo respecto al resto de grupos. También se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control kindling y el grupo GASH:Sal con una estimulación y el subgrupo B.



7. DISCUSIÓN

7.1. Discusión metodológica

a) Protocolo de kindling audiógeno

Nuestro modelo de estudio es un hámster, en los que se ha descrito una alta agresividad, especialmente en las hembras, cuando se someten a un estímulo estresor y en estudios de larga duración, como es el protocolo de kindling. Incluso se ha descrito en la bibliografía canibalismo de las hembras de hámsteres, influido, entre otras cosas, por los niveles de estrés (Beery y Zucker, 2012).

Por eso, y también debido al factor determinante del sexo en las pruebas comportamentales, en este trabajo se usaron hámsteres macho. Están documentadas las diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento entre machos y hembras de la misma especie y su influencia en la realización de pruebas comportamentales (Kryvopalov y Yushkov, 2015; Lightoot et al., 2010; McCarthy y Arnold, 2011; Prendergast et al., 2013; Rendon et al., 2015; Shannonhouse et al., 2014; Tabatadze et al., 2015; Terranova et al., 2016).

El protocolo de estimulación audiógena utilizado en el presente estudio se implementó en nuestro laboratorio por Muñoz de la Pascua (2004) y Carballosa-González (2008), teniendo en cuenta las recomendaciones de García-Cairasco (1996) en cuanto a la intensidad, frecuencia, duración y horarios de las estimulaciones. Las características del sonido empleado fueron estandarizadas en el laboratorio según los protocolos previamente validados para el modelo GASH:Sal, como las que inducen de forma segura y fiable la expresión de las CCAs (Barrera-Bailón, 2013; Carballosa-González, 2008; Muñoz de la Pascua 2004). En este sentido, utilizamos el mismo sonido que desencadena las crisis convulsivas en las ratas WAR, modelo con el que habitualmente realizamos estudios comparativos a nivel comportamental, histológico y genético por tratarse de un animal de experimentación con alta uniformidad en el desarrollo de las crisis, así como por su extensa validación como modelo de epilepsia (Pereira Pinto et al., 2017).

La variabilidad de protocolos de kindling encontrada en la bibliografía es elevada (Inoue et al., 2014; Tupal y Faingold, 2012; Vinogradova y Shatskova, 2012; Vinogradova y van Rijn, 2015), estableciendo desde 5 días de estimulación (Ma y Leung, 2016) hasta 30 días (Suleymanova et al., 2016). El protocolo de kindling audiógeno seleccionado para nuestro estudio se corresponde con el utilizado en el laboratorio de García-Cairasco (García-Cairasco, 1996; Cunha et al., 2015), ya que ha sido ampliamente probado y resulta efectivo en los numerosos estudios realizados en las ratas WAR (García-Cairasco et al., 2004).

La evaluación comportamental de las crisis convulsivas se realizó según lo descrito por García-Cairasco, metodología contrastada y eficaz para caracterizar exhaustivamente las crisis convulsivas en pequeños animales de laboratorio (Araujo Rodrigues et al., 2001; García-Cairasco et al., 1996; 2004; Magalhaes et al., 2004), teniendo en cuenta los criterios para la descripción de comportamientos durante las crisis convulsivas establecidos internacionalmente (ILAE, 2014; Lüders et al., 1998).

b) Inmunoreactividad frente a c-Fos

Las actividades funcionales del SNC pueden mapearse mediante el estudio de genes de expresión temprana como *c-fos*. Generalmente, la expresión de *c-fos* en las células presenta niveles muy bajos y se activa por un estímulo; por ejemplo, un estímulo acústico o un agente estresante (Matsuda et al., 1996).

Martinez et al. (2013) establece en 70 minutos el margen de tiempo que transcurre entre el momento en el que se somete al hámster sirio a un estímulo y los máximos niveles de expresión de la proteína c-FOS. Por lo tanto, el momento óptimo para perfundir al animal orientado a visualizar los máximos valores proteicos es de una hora tras la estimulación (Barrios, 2008, Carballosa-González, 2008; Pierson y Snyder-Keller, 1992).

La expresión de *c-fos* ha sido ampliamente utilizada como marcador de activación neuronal en la investigación, y así en nuestro estudio permitió detectar en los hámsteres GASH:Sal las regiones cerebrales con alta actividad neuronal tras el kindling audiógeno, comparándolo con los hámsteres control, a los que también se estimuló acústicamente y con hámsteres GASH:Sal a los que se sometió a una única estimulación. Este abordaje experimental permitió caracterizar las diferencias entre las áreas cerebrales que se activan por una única crisis convulsiva y las que lo hacen como consecuencia del reclutamiento inducido por el kindling en los grupos experimentales estudiados.

Pese a que se ha observado la activación de *c-fos* en la población astrocitaria *in vitro*, este fenómeno parece restringirse únicamente a los experimentos realizados *in vitro*, no encontrándose evidencias de que esto suceda también en los modelos *in vivo*, donde se encuentra el marcaje frente a *c-fos* de manera exclusiva en la población neuronal (Arenander et al., 1989, a, b; Herrera y Robertson, 1996; McNaughton y Hunt, 1992). Por lo tanto, tal como se acepta en la comunidad científica, podemos establecer todo núcleo inmunorreactivo a *c-fos* en nuestro trabajo como núcleo neuronal.

c) Prueba de Campo Abierto

Desde su establecimiento como herramienta de estudio en investigación y hasta la actualidad, el test de campo abierto goza de una gran popularidad como método de evaluación del estrés (Archer, 1973; Barker-Haliski et al., 2016; Belzung y Griebel, 2001; Carola et al., 2002; Esmaeilpour et al., 2017; Gould et al., 2009; Lalonde y Strazielle, 2008; 2009; Motaghinejad et al., 2016; Panday y Rauniar, 2016; Wilson et al., 1976) y ha diversificado tanto sus características temporales como espaciales en cuanto al desarrollo de la prueba (Prut y Belzung, 2003). Al no existir un protocolo definido de forma rígida, los tamaños, formas, tiempos de la prueba e incluso parámetros evaluados son muy variados.

La selección del protocolo utilizado en este trabajo se adaptó al hámster según las características específicas del modelo, en concreto a su tigmotaxis negativa, lo que significa que el animal presenta un movimiento respecto a la pared del campo abierto descrito como de alejamiento de la misma (Bastida et al., 2009; Hamann et al., 2008; Shannonhouse et al., 2014; Solomon et al., 2007). Por tanto, las medidas de campo abierto escogidas son las utilizadas en la rata (1,2 m de diámetro y 0,45 m de altura) (Prut y

Belzung, 2003; Sharma et al., 2017; Solomon et al., 2007). Además, se colocó un foco lumínico a 197 cm sobre el centro del campo abierto para evitar que el animal estableciese puntos externos de referencia tal como se aconseja en la bibliografía consultada (Chen et al., 2016; Kuniishi et al., 2017).

La duración de la prueba utilizada en nuestro trabajo se estableció en 7 minutos, teniendo como referencia los amplios rangos de tiempo aceptados para el protocolo del campo abierto, que fluctúan desde 2 minutos hasta los 20 minutos de duración (Prut y Belzung, 2003), siendo una de las duraciones más utilizadas la de 5 minutos (Careau et al., 2012; Carola et al. 2002; Chen et al., 2016; Kuniishi et al., 2017; Lalonde y Strazielle, 2008; Suleymanova et al., 2016).

El intervalo de tiempo entre la estimulación acústica y la realización de la prueba de campo abierto quedó determinado por el momento óptimo de extracción de la muestra sanguínea con vistas a la determinación de glucocorticoides, teniendo en cuenta también el tiempo medio de recuperación de la crisis observado para el modelo animal, de 10 minutos máximo en observaciones previas y estableciéndose el periodo de estupor posterior a las crisis en 5 minutos hasta su recuperación total (Prieto Martín, 2008). Se estableció la secuencia de estimulación acústica, campo abierto y extracción de la muestra de sangre para evitar que los efectos de la anestesia (necesaria para la extracción de sangre) y del estrés generado por ésta interfirieran en la evaluación del campo abierto (Gebhardt-Henrich et al., 2007; Hankenson et al., 2011; Komatsy et al., 1994; Valentim et al., 2010).

La selección del número de días en los que se realiza la prueba de campo abierto se ajustó a las necesidades del experimento, al hallarse en la bibliografía diferentes propuestas que abarcaban desde la realización una única vez (Chen et al., 2016; Jiang et al., 2016; Taiwe et al., 2016), 3 sesiones de campo abierto (Suleymanova et al., 2016) o 21 días seguidos (Domínguez-Roldan et al., 2016).

La prueba de campo abierto es un método aceptado para estimar la actividad exploratoria a través de los movimientos del animal, las entradas al centro del campo abierto y la actividad de acicalamiento (Walsh y Cummins, 1976). Los parámetros comportamentales evaluados corresponden a los analizados con más frecuencia en los protocolos: distancia recorrida, entradas al centro, velocidades alcanzadas y acicalamiento; además, se evaluaron otros parámetros para recoger la máxima información posible acerca del comportamiento de los animales (Shannonhouse et al., 2014).

d) Protocolos de extracción de sangre

La elección del glucocorticoide cortisol en lugar de la corticosterona se hizo en base a diversos artículos que apuntan al cortisol como principal regulador del estrés en el modelo *Mesocricetus auratus* (Buffenstein y Pinto, 2009). Está aceptado por la comunidad científica que estos dos glucocorticoides tienen una respuesta diferente ante el estrés agudo, observándose una disminución en la ratio corticosterona / cortisol como resultado de una liberación no coordinada de ambos GC y un aumento particularmente pronunciado del cortisol en condiciones de estrés.

Los protocolos de extracción de sangre utilizados son los establecidos en nuestro laboratorio, desde la subclavia (Barrera-Bailón et al., 2013; Barrera-Bailón et al., 2017) y de extracción transcardiaca (Muñoz de la Pascua, 2005; Muñoz de la Pascua et al., 2013).

Los tiempos de extracción de la sangre se seleccionaron acorde a los experimentos realizados por Gebhardt-Henrich et al. (2007) en hámsteres dorados, en los que se determina que la máxima concentración de cortisol en sangre se logra a los 20 minutos tras la inyección de la hormona ACTH.

Aunque hay referencias bibliográficas que ponen de manifiesto que los animales de laboratorio parecen haber perdido los ritmos circadianos de liberación de GC respecto a las especies en libertad (Buffenstein y Pinto, 2009), en todos los casos la extracción de sangre para la evaluación de éstos se realizó en el mismo rango horario (entre las 09.00 h. y las 12:00 h.).

La utilización del anestésico isofluorano para la extracción de sangre y valoración de GC en hámster está ampliamente aceptado y constituye una herramienta muy usada por la comunidad científica (Ashley et al., 2013; Terranova et al., 2016). La medición de los niveles de cortisol se hizo en suero, tal como se ha descrito en la literatura por resultar el adecuado en los modelos de hámster (Domínguez-Roldan et al., 2016; Scotti et al., 2015; Shannonhouse et al., 2014).

e) Neurodegeneración: análisis de la Caspasa-3-activa

El empleo de la técnica inmunocitoquímica para la demostración de caspasa-3-activa en la determinación de la apoptosis en el cerebro del GASH:Sal se escogió tras comprobar su eficacia y validez descrita en la comunidad científica (Guo et al., 2016; Liu et al., 2017; Wang et al., 2017).

La ausencia de bibliografía en hámsteres que utilizasen este protocolo exigió de una titulación previa del anticuerpo, teniendo como referentes las diluciones empleadas en ratas y ratones (Chen et al., 2017; Wang et al., 2017).

La técnica de Nissl empleada se fundamentó en el protocolo previamente estandarizado en nuestro laboratorio.

f) Gliosis

La estandarización del protocolo y la dilución elegida se establecieron tras la consulta de la bibliografía existente, que describe un rango de diluciones de entre 1:2000 (Fuentes-Santamaría et al., 2014) hasta 1:500, ambos en estudios en ratas (Blanco et al., 2015).

7.2 Discusión de los resultados

a) Comportamiento durante las estimulaciones sonoras: grupos de respuesta

Valoramos las crisis producidas durante el kindling mediante su caracterización neuroetológica. Los ítems comportamentales observados en el GASH:Sal durante la primera estimulación ponen de manifiesto el origen troncoencefálico de la crisis convulsiva, al igual que ocurre en la rata WAR (García-Cairasco, et al., 1996; Magalhaes et al., 2004; Scarlatelli-Lima et al., 2003). La estimulación sonora repetida, o kindling audiógeno, modifica la secuencia comportamental de las crisis convulsivas en el GASH:Sal a partir de la 5ª estimulación, induciendo la activación de nuevas áreas cerebrales que involucran regiones límbicas, además de comprometer las áreas troncoencefálicas originales.

En la mayoría de los estudios, los protocolos de kindling originan una disminución del umbral al estímulo convulsivo o epileptogénesis, pero también hay un proceso de neuroplasticidad con modificaciones permanentes en la organización neuronal, lo que produce un incremento progresivo en la respuesta epiléptica y en la susceptibilidad para generar crisis espontáneas (Botterill et al., 2015; Harty et al., 2013; Yang et al., 2016).

Uno de los puntos más interesantes de nuestros resultados ha sido la aparición de dos subgrupos de animales GASH:Sal, caracterizados por su diferente respuesta frente al estímulo sonoro repetitivo. Es decir, no hay homogeneidad entre los GASH:Sal en respuesta al kindling, por lo que es indispensable analizar en profundidad este resultado, teniendo en cuenta la importancia que tiene en la caracterización de este modelo experimental de epilepsia.

Los animales GASH:Sal del estudio son homogéneos en cuanto a la edad y el sexo, por tanto, las diferencias descritas entre los dos subgrupos de respuesta al kindling descartan que lo observado se deba a estos parámetros. Además, el estudio de la consanguinidad de los sujetos de experimentación descarta que los subgrupos estén ligados a la misma, al hallarse situaciones de hermanos que pertenecen a distintos subgrupos de respuesta, y animales de distintas camadas incluidos en el mismo subgrupo de respuesta a los estímulos repetitivos.

Tomando como referente a la línea WAR, observamos analogías con los animales del subgrupo A, que muestran comportamientos similares a los del modelo WAR sometido al mismo protocolo de estimulación, específicamente en los ítems e interacciones relativos al comportamiento exploratorio inicial, carrera salvaje y convulsiones tónico-clónicas (Araujo Rodrigues et al., 2001; García-Cairasco et al., 2004; Terra y García-Cairasco, 1992; Tsutsui et al., 1992).

La utilización de los índices de severidad mesencefálica (Tripathi et al., 2014; Rossetti et al., 2006) y límbica (García-Cairasco et al., 1996; Pinel y Rovner, 1978) para la evaluación de la gravedad de las crisis convulsivas se encuentra ampliamente contrastada y validada en la bibliografía científica (Doretto et al., 2009; Cunha et al., 2015). Los índices de severidad mesencefálica y límbica en el GASH:Sal apoyan la idea del origen mesencefálico de las crisis y la posterior participación de áreas

límbicas a medida que se avanza en el protocolo de kindling. De forma similar, los estudios en el modelo WAR también muestran el reclutamiento de áreas límbicas durante el proceso de estimulación repetitiva (García-Cairasco et al., 2004).

La comparación de los índices de severidad entre los animales GASH:Sal kindling (en su conjunto, subgrupos A y B) y lo descrito en el modelo WAR muestra diferencias en el índice mesencefálico, cuyos valores son más elevados y constantes en el GASH:Sal que los descritos en la línea WAR (Cunha et al., 2015), esto es, el GASH:Sal desarrolla crisis convulsivas de manera más constante y homogénea. En cuanto al índice límbico, las WAR exhiben valores en torno a 3 al final del protocolo (Cunha et al., 2015), al igual que los GASH:Sal. Sin embargo, si se divide en los dos subgrupos de animales GASH:Sal, podemos observar que el subgrupo A presenta valores superiores (4,5) a lo observado en los animales WAR, mientras que los animales del subgrupo B, muestran niveles muy bajos, en torno a 1 al final del kindling. Esta diferencia en los valores de los IL pone de manifiesto una mayor implicación de áreas límbicas en el subgrupo A y una menor gravedad de las crisis en el subgrupo B, lo que también puede observarse en los flujos comportamentales.

Las latencias de carrera salvaje, convulsión tónica y emprostotonus analizadas durante las crisis convulsivas repetitivas tienden a incrementarse con las estimulaciones, tanto en el GASH:Sal kindling en conjunto como al considerar los subgrupos A y B. Sin embargo, sólo el subgrupo A presenta aumentos constantes en las latencias similares a los descritos en el modelo WAR (García-Cairasco, 1996).

El posible significado fisiológico del aumento de las latencias durante las crisis convulsivas puede encontrarse en el aumento del circuito de respuesta al participar más grupos neuronales, atendiendo a la aparición de comportamientos regidos por áreas de carácter límbico. Estos incrementos en las latencias de respuesta al estímulo sonoro se han descrito previamente en el modelo de rata Wistar Audiogenic Sensitive, así como en la línea WAR (François et al., 2008; Rigoulot et al., 2003; Samseishvili et al., 2006).

Las alteraciones conductuales descritas en el GASH:Sal se han analizado en distintos modelos animales de epilepsia audiógena mostrándose, al igual que ocurre en nuestro modelo, mioclonías de diferentes partes del cuerpo, galope y masticación como los principales ítems comportamentales límbicos (Fukumoto et al., 2002; Hasegawa et al., 2014; Kamada et al., 2013; Kubo et al., 2015). La participación de circuitos límbicos reflejada en estas nuevas conductas durante el kindling está apoyada por la activación de nuevas áreas cerebrales observada.

b) Activación neuronal durante el kindling

La utilización de la proteína c-FOS como marcador inducible en procesos de crisis convulsivas se encuentra establecida y es ampliamente aceptada desde los años 80, donde diversos estudios en mamíferos pusieron de manifiesto un incremento masivo de los niveles proteicos de c-FOS ante estímulos desencadenantes de crisis convulsivas (Dragunow y Robertson, 1987, 1988; Morgan y Curran, 1995; Nakajima et al., 1989; Sonnenberg et al., 1989), en concreto, ante estímulos auditivos (Bullitt, 1990).

Tras la aplicación del protocolo de kindling audiógeno, se observan diferencias de expresión de *c-fos* en los hámsteres GASH:Sal. Mientras las áreas con mayor inmunotinción en animales con una única estimulación son el Colículo Inferior y el Locus Coeruleus; al finalizar el kindling, las áreas más inmunoteñidas frente a c-FOS son: Hipocampo, el Complejo Amigdalino, el Hipotálamo, Colículo Inferior, Sustancia Gris Periacueductal y Locus Coeruleus. Estos núcleos coinciden con las áreas de activación neuronal halladas en diferentes modelos animales: en el ratón DBA/2 (Le Gal et al., 1990), en el modelo GEPR (Clough et al., 1997; Eells et al., 2004), en la rata Wistar genéticamente susceptible a estimulación acústica (Simler et al., 1994), en la rata Wistar noise-primed (Snyder-Keller y Pierson, 1992) y en el ratón Frings (Klein et al., 2004).

Los estudios realizados de cuantificación de c-FOS en modelos de epilepsia señalan como áreas implicadas en estos procesos al hipocampo, la amígdala, el estriado y la corteza cerebral entre otras áreas; tanto en la rata GEPR (Clough et al., 1997; Eells et al., 2004) como en la línea Sprague-Dawley (Dragunow y Robertson, 1987, 1988). Además, se han descrito en estos animales alteraciones en los niveles de expresión de dicha proteína tras el kindling (Dragunow y Robertson, 1987) y bloqueos de la inducción tras la administración de fármacos anticonvulsivos (Li et al., 2013; Myher et al., 2006).

En el modelo WAR se describe una activación superior en los núcleos troncoencefálicos ante una única estimulación acústica, mientras que tras someter a los animales a un kindling audiogénico se induce un incremento de la expresión de *c-fos* en áreas límbicas como el hipocampo y la amígdala, al igual que sucede en nuestro modelo GASH:Sal (Arabadzisz et al., 2005; Simler et al., 1994).

Por otro lado, los estudios realizados por Matsuda et al. (1996) en los que se somete a un modelo de ratón a estrés agudo y crónico muestran que, tras el estrés agudo, el animal presenta un escaso marcaje de c-FOS en el sistema nervioso central, sin mostrar excesivas diferencias respecto al animal control no estresado. Sin embargo, tras un estrés crónico (como el provocado en este trabajo) algunas de las áreas que incrementan su inmunorreactividad frente al control y al estrés agudo son, entre otros, Colículo Inferior, Sustancia Gris Periacueductal, Hipocampo e Hipotálamo, Complejo Amigdalino y áreas rostrales que incluyen el Bulbo Olfatorio.

El incremento en la activación de los núcleos estudiados determina una serie de desórdenes del comportamiento en los animales sometidos a estrés crónico, como por ejemplo: una drástica disminución de la movilidad y la actividad exploratoria, aparición de comportamientos de indefensión aprendida, incremento de los comportamientos de estrés o ansiedad e inhibición de los procesos de memoria y aprendizaje, descritos por diversos autores (García-Cairasco et al., 2017; Kaur et al., 2016; Loonen e Ivanova, 2016; Ohdo et al., 1989; Singh et al., 2015; Yoshimura y Kimura, 1991).

Los porcentajes de variación de la activación frente a c-FOS encontrados en nuestro modelo GASH:Sal para los núcleos estudiados (Colículo Inferior, Locus Coeruleus, Sustancia Gris Periacueductal, Hipocampo, Hipotálamo y Complejo Amigdalino) muestran, en la mayor parte de los casos, incrementos del 700% y superiores respecto al control y al animal sometido a estrés agudo (una

única estimulación); valores muy similares a los descritos en la bibliografía (Matsuda et al., 1996). Estos porcentajes de activación corresponden a los hallados para el subgrupo A, cuyos valores se encuentran incrementados en las áreas límbicas respecto al resto de grupos de estudio. Sin embargo, las áreas troncoencefálicas de nuestro modelo presentan una gran activación frente a c-FOS desde la primera estimulación acústica; lo que podría ser debido a la naturaleza sonora del estímulo que actúa directamente sobre esta vía de transmisión.

Los resultados en el modelo GASH:Sal evidencian que el origen de las crisis convulsivas se encuentra en el troncoencéfalo y es provocado por un estímulo sonoro, pero que los procesos de reclutamiento neuronal se deben al estrés provocado por las crisis convulsivas, ya que los animales del subgrupo A son los que muestran crisis convulsivas completas de forma constante, altos niveles de estrés y mayor activación de las áreas límbicas analizadas en este trabajo.

La activación de estas áreas en el GASH:Sal tiene gran importancia, tanto por las funciones que desempeñan en condiciones fisiológicas como durante la epileptogénesis y mantenimiento de las crisis epilépticas.

Colículo Inferior (IC)

Estudios previos en el Colículo Inferior de hámsteres GASH:Sal realizados en nuestro laboratorio comparan animales no estimulados con animales sometidos a una estimulación acústica. En ellos se muestra una mayor inmunoreactividad frente a c-FOS de la zona de la corteza dorsal (DCIC) y de la corteza externa (ECIC), así como un incremento en PAG de la inmunotinción ante c-FOS (Carballosa-González, 2008). Además, se determinó a nivel caudo-rostral la mayor densidad de inmunotinción en la zona más caudal del IC (Carballosa-González, 2008). Nuestros datos, analizados en los diferentes niveles caudo-rostrales, también muestran las mayores diferencias de inmunotinción en IC para los cortes más caudales (correspondientes a Bregma – 6.0 mm).

Los datos de activación del IC descritos en el GASH:Sal ponen de manifiesto su importancia en el origen y desarrollo de las crisis comiciales, al hallarse una alta inmunoreactividad desde la primera estimulación.

El Colículo Inferior se ha descrito como la estructura desde la que se inician las CCAs en diferentes modelos de epilepsia refleja (García-Cairasco et al., 1993), concretamente la región externa y dorsal del IC (Faingold et al., 1988; Kai y Niki, 2002; Klein et al., 2004; Kesner, 1966). Los modelos susceptibles de desarrollar CCAs comparten una serie de alteraciones en las sinapsis de dicho núcleo que determinan una hiperexcitabilidad neuronal. Estas alteraciones se caracterizan a nivel de los neurotransmisores implicados por unos altos niveles de glutamato (Ribak et al., 1988) en el IC acompañados de un déficit de la inhibición GABAérgica (Faingold et al., 1986; Riback et al., 1988) estableciéndose de este modo las condiciones idóneas para el origen y desarrollo de crisis convulsivas.

Por otra parte, estudios de ablación parcial o total de este núcleo muestran una respuesta asimétrica al sonido o al bloqueo de las crisis convulsivas respectivamente (García-Cairasco y Sabbatini, 1989; Kesner, 1966). Este hecho pone de manifiesto los efectos de la denervación del núcleo y los procesos de plasticidad neuronal que ocurren tras la ablación del mismo, así como su importancia en el inicio y propagación de las crisis de origen audiogénico (McCown et al., 1987).

Finalmente, se encuentran referencias bibliográficas de estudios de expresión de *c-fos* en el IC de diferentes modelos y análisis de diversos parámetros, tanto de variaciones tonotópicas como de duración de los estímulos, evidenciando las alteraciones en la inmunotinción frente a c-FOS producidas en cada situación experimental (Kwon y Pierson, 1997; McCown et al., 1995; Pereira Pinto et al., 2017). Estas aproximaciones permiten comprender con gran detalle los mecanismos de respuesta ante el estímulo sonoro.

Locus Coeruleus (LC)

Encontramos una alta activación neuronal en este núcleo en el protocolo de kindling audiogénico, que puede estar provocado por el estrés al que se somete el animal durante la estimulación sonora y la crisis convulsiva.

La principal función del LC es la modulación de la respuesta a procesos de atención, estados de excitación, aprendizaje y memoria, alerta, detección de la novedad (mediante las neuronas Novelty) y vigilancia (Aston-Jones et al., 1991; Lapid y Morilak, 2005).

Por otra parte, las conexiones descritas en relación con este núcleo lo vinculan con áreas prosencefálicas y con la médula espinal (Grzanna y Molliver, 1980; Hormigo Muñoz, 2012; Loughlin et al., 1986; Mason y Fibiger, 1979; Nagai et al., 1981). En concreto, se ha encontrado una conexión recíproca entre el LC y el IC, principalmente con las áreas de CDIC (Corteza Dorsal) y CLIC (Corteza Lateral), mediante una red de inervación noradrenérgica del LC que proyecta al IC (Freitas et al., 2005; Klepper y Herbert, 1991). Esto sugiere una íntima correlación funcional entre los dos núcleos. Las áreas del CI con mayor interacción con el LC corresponden, funcionalmente, a zonas caracterizadas por una gran adaptación específica al estímulo y a la atención selectiva (Hormigo Muñoz, 2012; Lumani y Zhang, 2010; Malmierca et al., 2009).

La participación del LC en el proceso de atención selectiva es posible gracias a los dos modos de actividad eléctrica que presenta este núcleo. Ante un estímulo estresante, una elevada actividad tónica (o de respuesta neuronal asincrónica) y su correspondiente descenso de actividad fásica (o respuesta sincrónica del núcleo) se correlacionan a nivel comportamental con un aumento de la exploración de los nuevos estímulos del entorno. Esto permite al animal adaptarse al ambiente y responder de forma

adecuada, buscando alternativas para actuar de un modo distinto al habitual en un medio potencialmente peligroso.

Se ha descrito la activación del LC en el modelo de rata Wistar Kyoto (WKY) tras estimulación acústica mediante el análisis de expresión de *c-fos* (Palmer y Printz, 1998), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Pese a que generalmente se considera que el papel fundamental ante situaciones de estrés lo realiza el eje hipotalámico-hipofisario, muchos de los estímulos que inician esta respuesta también afectan y activan al sistema LC-norepinefrina, actuando de forma coordinada con el eHHA (Valentino y van Bockstaele, 2008). En esta línea, se han descrito interacciones entre la norepinefrina, la CRH (hormona liberadora de la corticotropina), los opioides endógenos y el glutamato, neurotransmisor excitatorio por excelencia (Chandley et al., 2014; Prouty et al., 2017; Ronken et al., 1993; Van Bockstaele et al., 2001; Wyrofsky et al., 2017). Dichas interacciones permiten al animal ajustar su respuesta a los estímulos recibidos. Esta regulación y modificación de las respuestas adaptativas al estrés, mediada tanto por neurotransmisores como por hormonas, encuentra en el LC la convergencia que permite coordinar la respuesta del animal (Aston-Jones y Cohen, 2005; Curtis et al., 1995).

Sustancia Gris Periacueductal (PAG)

Los altos niveles de activación de *c-fos* en la PAG de los GASH:Sal sometidos a kindling podrían estar evidenciando su papel tanto a nivel motor y de respuesta a estímulos aversivos durante la crisis convulsiva como su función en la respuesta de analgesia en la etapa post-ictal. En esta línea de investigación, los estudios realizados por Samineni et al. (2010) y Albright et al. (2017) describen un aumento de inmunotinción frente a c-FOS en varios modelos murinos sometidos a crisis repetitivas.

La **PAG** se encuentra involucrada en el control del movimiento a través de su interacción con la médula espinal (Behbehani, 1995; Garcia-Rill et al., 1983). Por ello, la carrera salvaje y convulsiones tónico-clónicas que sufre el GASH:Sal durante la crisis, podrían justificar la alta activación de este núcleo en toda su extensión caudo-rostral, al ser responsable del tono muscular del animal (Kommajosyula et al., 2017; Nieuwenhuys et al., 1988; Tupal y Faingold, 2012).

La PAG es una estructura importante en la red neuronal de propagación de las crisis audiógenas, como ocurre en el modelo GEPR-9s (Genetically Epilepsy Prone Rats) (Tupal y Faingold, 2012). El sometimiento de este modelo a un protocolo de kindling muestra un reclutamiento de áreas superiores, mediado por la PAG, entre las que se incluyen la amígdala, fundamental en la respuesta animal condicionada por el miedo (Browning et al., 1999; Faingold, 1999; Feng et al., 2001; Merrill et al., 2005; N'Gouemo y Faingold, 1997). Se han descrito diferencias de activación de PAG en las fases de pre-estimulación y durante la fase de convulsiones tónico-clónicas en el modelo GEPR-9s sometido a

kindling en comparación con un grupo no sometido a kindling (Tupal y Faingold, 2011). Además de su relación con el dolor, las respuestas aversivas y las respuestas motoras en la epilepsia (Hu et al., 2009), Tupal y Faingold (2011) apuntan al posible papel de este núcleo en los procesos de analgesia post-ictal. PAG interacciona con diversos núcleos (como el núcleo del rafe, la corteza y el hipotálamo), constituyendo la denominada como “vía neuronal descendente de inhibición de la sensación de dolor”, centro de transmisión de la señal dolorosa modulada por la encefalina (Basbaum y Fields, 1978, 1984; Sampaio et al., 2012; Semenenka et al., 1994; Yoshida et al., 2005). La activación de la PAG durante un estrés repetido podría estar potenciando este mecanismo a través del incremento en la síntesis y liberación de encefalina (de Freitas et al., 2014; White y Gall, 1987).

En esta línea de investigación, Carr et al. (1998) se centraron en el estudio de PAG, describiendo una relación inversamente proporcional entre los niveles de β -endorfina y la severidad de las crisis en ratas genéticamente susceptibles. Pese a que no existen referencias en este ámbito en la línea GASH:Sal, podría resultar interesante evaluar las concentraciones de esta hormona en las diferentes situaciones de estudio planteadas, para dilucidar su efecto analgésico y anticonvulsivo y los niveles existentes en los dos subgrupos de GASH:Sal kindling, profundizando así en el mecanismo biológico que determina esta diferencia de comportamiento ante un mismo estímulo sonoro repetitivo.

Núcleo Hipotalámico Paraventricular (Pe)

Los resultados en nuestro modelo GASH:Sal sometido a kindling, concretamente los hallados en el subgrupo A, muestran un notable incremento de la activación de este núcleo. Estos datos resultan concordantes con los estudios en modelos de epilepsia sometidos a crisis repetitivas han mostrado un incremento en los niveles de inmunotinción frente a c-FOS para la zona paraventricular del hipotálamo, coincidentes con un aumento de la severidad de las crisis (Albright et al., 2017).

El hipotálamo se considera el centro de control endocrino responsable del comportamiento (Dornan y Malsbury, 1989; Saper, 1990). Sus conexiones con otras áreas límbicas, como por ejemplo el complejo amigdalino (Bleier y Byne, 1985) modulan un circuito de respuesta emocional ante los distintos estímulos a los que se somete el animal.

Este núcleo posee un papel fundamental en el control endocrino ante el estrés crónico. Se ha encontrado una alta inmunorreactividad a c-FOS en ratones sometidos a estrés (Matsuda et al., 1996; Swanson et al., 1983; Vandesande y Dierickx, 1975) que se relaciona con la síntesis y liberación en sangre de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), desencadenante de la respuesta fisiológica al estrés en la que se encuentra involucrado el cortisol y la corticosterona como GC principales.

Hipocampo

Los datos de inmunorreactividad en el GASH:Sal muestran diferencias entre el subgrupo A y B de kindling, siendo superiores los niveles en el subgrupo A.

Este núcleo es fundamental en el control de los procesos de la memoria y su lesión causa alteraciones en el proceso de aprendizaje, concretamente en la consolidación de memoria a largo plazo (Miendlarzewska et al., 2016). Además, se han descrito sus implicaciones en la toma de decisiones en

modelos murinos (O'Neil et al., 2015) y en la codificación de la información en contextos novedosos (Moreno-Castilla et al., 2017).

Los estudios realizados por Hiscock et al. (Hiscock et al., 2001; Willoughby et al., 1997) sobre la expresión de *c-fos* en diferentes regiones del cerebro tras la inyección de kainato mostraron que las neuronas septohipocampales estaban involucradas en el efecto antiepileptogénico del sistema colinérgico, que se activa durante el protocolo de kindling hipocampal. Este aumento en la inmunoreactividad frente a c-FOS tras el protocolo de kindling ya fue descrito en 1988 por Dragunow y Robertson en las células piramidales del hipocampo y en el DG, donde se observó un incremento masivo de la proteína como consecuencia de las crisis convulsivas repetidas.

Por otro lado, la denervación del hipocampo facilita la respuesta convulsiva al kindling de los animales inyectados con kainato. Por ello, una mayor activación de esta área al finalizar el protocolo de kindling podría representar un mecanismo compensatorio que contrarrestase el desarrollo de las crisis epilépticas. Sin embargo, esta interpretación de los resultados no explica la diferencia de activación entre los subgrupos A y B de kindling audiógeno, debido a que el subgrupo A muestra una mayor activación frente a c-FOS y sus crisis son constantes mientras el subgrupo B muestra una menor inmunoreactividad frente a c-FOS y la respuesta a la estimulación acústica es variable durante el kindling, cuando lo esperable, si el hipocampo actúa como inhibidor, hubiera sido lo contrario.

Actualmente, se ha descrito que la activación específica de unas neuronas hipocampales u otras determina el aumento o la inhibición de la severidad de las crisis (Albright et al., 2016; Matsuda et al., 2015; Yi et al., 2015). En las regiones CA1, CA3 y DG en ratón existen neuronas glutamatérgicas (excitatorias y, por tanto, potenciadoras de las crisis tónico-clónicas), mientras las neuronas situadas en la capa estriada de CA1, en la capa piramidal de CA3 y en la zona molecular y del hilo del DG son interneuronas inhibitorias (y por tanto, bloqueantes de las crisis tónico-clónicas) (Hofmann et al., 2016; Shetty y Upadhyay, 2016; Toyoda et al., 2015). Debido a esta diferencia, sería necesario plantear experimentos futuros que pusieran de manifiesto, a través de dobles marcajes, si las células inmunorreactivas a c-FOS son excitatorias o inhibitorias (Tripathi et al., 2014).

El análisis de c-FOS en el hipocampo en el periodo interictal de animales sometidos a kindling mostró un marcado descenso de la respuesta ante ambientes novedosos en comparación con los animales control, lo que podría indicar una menor capacidad de memoria espacial y de localización de los objetos (Ahmadi et al., 2017).

Por último, el hipocampo está relacionado con la regulación de la síntesis y secreción de GC, incrementándose las concentraciones de éstos ante la disminución en la función del hipocampo (Kamal et al., 2014; Reser, 2016; Wennström et al., 2006). Esta capacidad del núcleo para bloquear la síntesis y secreción de GC permite modular sus niveles en sangre, impidiendo que se alcancen en el cerebro niveles que resulten especialmente dañinos para el hipocampo de manera recurrente. Cuando este bloqueo se

sobrepasa y los niveles de estrés del organismo aumentan, el núcleo más dañado es el hipocampo, al ser el más susceptible a los aumentos de estrés (Gupta y Morley, 2014; Sasaki y Yoshizaki, 2015).

Complejo amigdalino

La Amígdala envía proyecciones a gran cantidad de núcleos del troncoencéfalo, incluida la Sustancia Gris Periacueductal (Rizvi et al., 1991; da Costa Gomez y Behbehani, 1995; Oka et al., 2008).

Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal (MePD)

Los estudios sobre el papel de la amígdala durante las crisis epilépticas repetitivas han sugerido que es un área potenciadora de la actividad epiléptica y que las crisis convulsivas ocurren de forma más rápida tras su activación. Además, se ha descrito que la amígdala presenta un umbral de activación particularmente bajo al comienzo del protocolo de kindling, en comparación con otras zonas encefálicas. En el GASH:Sal, este núcleo se encuentra altamente activado después del kindling en los grupos de estudio propuestos en comparación con el grupo control kindling, especialmente en el subgrupo A. Por otro lado, cabe destacar que el DG y los núcleos basolaterales de la amígdala, junto con el núcleo amigdaloides medial posterodorsal, mostraron un incremento de inmunotinción a *c-fos* en etapas finales del kindling, por lo que estos núcleos se consideran de reclutamiento tras el kindling (Kairiss et al., 1984; McIntyre et al., 1986).

Núcleo amigdalino basolateral (BLP-BLA)

En el subgrupo A hallamos un aumento de activación en este núcleo, en comparación tanto con el subgrupo B como con el grupo GASH:Sal sometido a una estimulación y el grupo control kindling. Estos datos de reclutamiento neuronal ponen de manifiesto el papel del kindling en los cambios de neuroplasticidad inducidos por degeneración neuronal y neurogénesis; cambios que finalmente conducen a una hiperexcitabilidad del circuito neuronal. Además, al pertenecer *c-fos* a la familia de genes de inducción temprana, su activación o no en un área concreta determina y altera la transcripción de los genes de efecto tardío, que codifican enzimas, receptores, factores de crecimiento o proteínas estructurales, pudiendo producir un cambio morfológico y bioquímico permanente en las redes neuronales, que a su vez incrementaría la respuesta ante el kindling (Szyndler et al., 2008).

Descrito como núcleo representativo del complejo amigdalino, se ha documentado su relación con la epilepsia (Chen et al., 2016; McReynolds et al., 2014; Scholl et al., 2013) y es una de las áreas afectadas en modelos de epilepsia del lóbulo temporal sometidos a crisis repetidas, coincidiendo con el incremento de severidad de las crisis (Albright et al., 2017). Su actividad eléctrica ha mostrado modificaciones en los umbrales de activación de forma previa y al finalizar el kindling, evidenciando así una alteración en la excitabilidad de la amígdala en este proceso. Estos hallazgos se relacionan con una pérdida de neuronas GABA-érgicas, inducción de astrogliosis reactiva en diferentes áreas amigdalinas y activación de procesos de muerte neuronal en dichas regiones (Löscher y Ebert, 1996).

Por otro lado, los altos niveles de estrés sobre el núcleo amigdalino basolateral afectan a la neuroplasticidad de este núcleo, especialmente en los procesos de consolidación de la memoria asociada a emociones, del mismo modo que afecta al hipocampo (McReynolds et al., 2014).

c) Estrés: Campo abierto y parámetros fisiológicos

Comportamiento en la prueba de campo abierto

En el estudio del comportamiento en campo abierto analizamos parámetros útiles para determinar los niveles de ansiedad o estrés a los que el animal se encuentra sometido: latencia a la exploración o latencia de salida de inicio (Grigoletto et al., 2016), número de entradas en el centro y tiempo pasado allí (Jiang et al., 2016), tiempo en la periferia o actividad en la periferia (Shannonhouse et al., 2014), acicalamientos, distancia total recorrida, velocidad media alcanzada, descritos en la bibliografía (Tripathi et al., 2014).

Al igual que ocurre en nuestro trabajo, tras la estimulación repetitiva en diferentes modelos animales, se describen valores muy bajos de exploración o “hipo-exploración” con registros de animales que prácticamente no se mueven del lugar de inicio de la prueba de campo abierto (Mlsna y Koh, 2013; Tripathi et al., 2014), mientras que los animales utilizados como grupo control mostraban altos valores en los parámetros de comportamiento exploratorios (Domínguez-Roldan et al., 2016). La mayor parte de los artículos que determinan el número de veces que el animal cruza las líneas establecidas en el suelo del campo abierto hallan una relación entre el aumento del estrés y el descenso del número de cruces (Citraro et al., 2017; Domínguez-Roldan et al., 2016; Salari et al., 2015; 2016).

Pese a las discrepancias sobre la interpretación de los datos relativos al acicalamiento, diversos autores coinciden en la importancia de su valoración para la evaluación de los niveles de estrés, encontrándose, en la mayoría de los artículos consultados una disminución en los niveles de acicalamiento ante una condición o un estímulo estresante (Blanchard et al., 1998; Ducottet et al., 2004; Ennaceur, 2014; Flügge et al., 2001; Kramer et al., 1999). En nuestro caso, encontramos una importante disminución de este parámetro en el subgrupo A en función del nº de estimulaciones, mientras el subgrupo B presenta valores más similares a los hallados en el grupo GASH:Sal con una estimulación, disminuyendo sus niveles únicamente en el 10º día de estimulación del kindling.

Estudios realizados en el modelo WAR en campo abierto evalúan la distancia recorrida, el número de veces y tiempo pasado en el área central, así como los episodios de acicalamiento y rearing. Los datos muestran diferencias de la WAR respecto al grupo control de ratas Wistar resistentes a estimulación acústica en el tiempo pasado en cada área, el número de entradas al centro, pero no se encuentran diferencias en cuanto al acicalamiento, rearing y la distancia recorrida. En los parámetros en los que se detectaron diferencias, la rata WAR mostró un mayor tiempo pasado y mayor número de entradas en el área más cercana a la pared del campo abierto. Los parámetros analizados en nuestro modelo GASH:Sal establecen una serie de similitudes con el modelo WAR en cuanto a la distancia recorrida y la distribución espacial y temporal del animal durante el campo abierto.

Estos datos parecen poner de manifiesto una alteración en los comportamientos del animal sometido a estimulación acústica repetitiva; cuyas bases biológicas pueden definirse a través del reclutamiento de determinadas áreas, así como a nivel fisiológico en relación al estrés sufrido por el animal (Castro et al., 2017).

Indicadores fisiológicos del estrés: Glucocorticoides en sangre

La bibliografía consultada sobre parámetros de estrés en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) establece los valores de concentración de GC (cortisol más corticosterona) en sangre en $1,77 \pm 0,1 \mu\text{g/dl}$ en condiciones de estrés, siendo el cortisol el GC mayoritario (Rendon et al., 2015).

En nuestro trabajo se evalúan los niveles de cortisol en sangre en los distintos grupos experimentales. El grupo control kindling presenta pequeñas variaciones a lo largo de las diferentes estimulaciones (1^{er} día: 1 ug/dL; 5^o día: 1,33 ug/dL; 10^o día: 0,75 ug/dL). En el resto de grupos propuestos no se aprecian diferencias significativas durante el 1^{er} día, pero durante el 5^o y el 10^o día, los datos muestran que el estrés repetido producido por el estímulo acústico provoca un incremento de los niveles de cortisol en el subgrupo A (1^{er} día: 2 ug/dL; 5^o día: 3,04 ug/dL; 10^o día: 2,86 ug/dL) respecto al grupo control kindling. Sin embargo, tanto los animales GASH:Sal sometidos a una única estimulación (1^{er} día: 2 ug/dL; 5^o día: 0,23 ug/dL; 10^o día: 0,25 ug/dL) como los hámsteres del subgrupo B que no sufrieron crisis convulsivas completas durante la estimulación correspondiente (1^{er} día: 2 ug/dL; 5^o día: 0,27 ug/dL; 10^o día: 1,49 ug/dL) presentan unos valores muy similares e inferiores, incluso a los del grupo control kindling.

Estos resultados podrían indicar una íntima interacción entre los niveles de cortisol en sangre tras el kindling audiógeno y la presencia o no de crisis convulsivas. Sin embargo, para establecer si el estrés es causa o consecuencia de las crisis, resulta necesario realizar más experimentos que permitan dilucidar los mecanismos subyacentes al desencadenamiento de la respuesta tanto de estrés como de crisis convulsiva en este modelo.

Las primeras investigaciones en este ámbito datan de los años 50 (Levin, 1950; O'Neill, 1958; Stevens, 1959) y apuntan a la estrecha relación entre epilepsia y estrés, encontrándose éste como desencadenante de crisis convulsivas, además de incrementar la frecuencia de las mismas (Allendorfer et al., 2014; van Campen et al., 2013). Diversos experimentos con ratas modelos experimentales de epilepsia, en los que la hormona principal de respuesta a estrés es la corticosterona, muestran que la administración de dicha hormona incrementa la susceptibilidad a las convulsiones y aumenta la gravedad de las mismas (Krugers et al., 2000; Roberts y Keith, 1994; Smith-Swintosky et al., 1996). Estos datos apuntarían a la posibilidad de que el estrés actuase como factor causante de la crisis. Sin embargo, debido al diferente papel en la respuesta al estrés de los GC cortisol y corticosterona hallada en la bibliografía que establece como principal GC en el hámster el cortisol, mientras en rata es la corticosterona, no puede establecerse una correlación en los resultados analizados en este ámbito de estudio (Umeoka et al., 2011).

Según van Campen et al. (2013), los efectos del eHHA sobre el cerebro no sólo se deben a los corticosteroides. Muchas hormonas (como CRH y AVP) se encuentran involucradas en la respuesta al estrés, pudiendo afectar a la excitabilidad neuronal, junto con diversos neurotransmisores moduladores del proceso. El estrés incrementa el nivel de esteroides neuroactivos sintetizados por las células gliales que determina la excitabilidad neuronal. Además, otras áreas cerebrales son capaces de producir CRH en milisegundos tras la exposición a estrés, como por ejemplo, la amígdala (Gillies et al., 1983), el hipocampo (Chen et al., 2001; Swanson et al., 1983) y el locus coeruleus (Gillies et al., 1983; Swanson et al., 1983; Valentino y van Bockstaele, 2008).

Por su parte, los estudios realizados por Allendorfer et al. (2014) apuntan al estrés como factor inductor de crisis convulsivas en pruebas realizadas a pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, en los que se halla un incremento de los niveles basales de cortisol respecto a su grupo control. En esta misma línea de investigaciones en humanos se encuentran los estudios realizados por Novakova et al. (2017) y van Campen et al. (2015). También existen diversos modelos animales que correlacionan el estrés con la epileptogénesis, poniendo de manifiesto el importante papel del hipocampo y el sistema endocannabinoide en esta regulación (Alger, 2004; Savic y Engel, 2014; Tabatadze et al., 2015), así como en la regulación del estrés (Hill y Patel, 2013).

Ronkina et al. (2011) investigaron la respuesta al estrés en el ámbito de la expresión génica, mostrando una relación entre la activación de los genes de respuesta temprana (IEGs) coordinada bajo la vía de señalización de las MAP kinasas, la misma vía involucrada en la activación de la respuesta apoptótica celular y el estrés (Ronkina et al., 2011). De modo que diversos tipos de estrés se han descrito como inductores de la transcripción de IEGs. Estudios genéticos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto alteraciones en la expresión de genes asociados a esta ruta metabólica, propias del modelo GASH:Sal (López López, 2016).

Por otro lado, el sometimiento a estrés en estudios en hámsteres mostró una supresión de la vía inmunológica IL-1, asociada a un incremento de la activación hipotalámica, área de gran importancia en la regulación cerebral de la fase aguda de respuesta a infección (Ashley et al., 2013; Blatteis, 1988; Guijarro et al., 2006). Este hecho, relacionado con el descenso de las células de la serie blanca hallado en nuestro modelo tras el kindling, podría manifestar una situación de inmunosupresión y por tanto, mayores posibilidades de sufrir diversas infecciones o enfermedades.

Finalmente, experimentos recientes establecen que el sufrir crisis convulsivas y el estrés que éstas conllevan, pueden tener efectos sobre los procesos de memoria a corto plazo (Holley y Lugo, 2016; Titiz et al., 2014), así como a la memoria espacial, episódica y emocional (Breier et al., 1996; Dodrill, 2002; LaBar et al., 1995; Pedersen y Dam, 1986) afectando a la plasticidad del hipocampo. Se han descrito daños y pérdida masiva celular como resultado de las crisis repetitivas, pudiendo afectar al aprendizaje y la memoria (Becker et al., 1995; Liu et al., 2003). Estos datos podrían establecer una interesante vía de

investigación futura que permita comprender la interacción de las crisis, el estrés, la muerte neuronal (concretamente en el hipocampo) y sus consecuencias a nivel comportamental.

d) Efectos del estrés en los parámetros hematológicos

Muñoz de la Pascua et al. (2013) describe el hemograma del hámster control y del GASH:Sal con niveles de eosinófilos de 1,2% a 5,9% en el hámster control, mientras que el rango en el GASH es de 1,2% a 9,8%; por otra parte, el porcentaje de linfocitos sobre el total de células de la serie blanca hallado en el grupo control es de 55,7 a 78,2%, mientras en el GASH el rango se encuentra entre 29,8 y 77,4 % del total de la fórmula de la serie blanca. Por su parte, Pacanaro Oliveira (2013) determina en el hámster control *Mesocricetus auratus* unos valores de hemoglobina de aproximadamente 17 g/dl y una cantidad de eritrocitos cercana a 10 g/dl; en cuanto a la serie blanca, los eosinófilos se encuentran en 600 por mm³, mientras los linfocitos se hallan en torno a los 3000 por mm³. Estos datos concuerdan con los encontrados en nuestro trabajo y representan una interesante referencia para la interpretación de nuestros datos.

La membrana celular de las células inmunitarias, específicamente de los linfocitos B y T es el lugar de interacción entre los niveles estrés a los que el sistema nervioso se encuentra sometido y la respuesta inmune. Existen receptores para los GC y para la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en los linfocitos B y T. Así mismo, el cerebro produce y presenta receptores ante distintos tipos de citocinas importantes en el proceso de respuesta inmune como las interleucinas y factores de necrosis tumoral (Sirera et al., 2006). Esta interacción podría ser la base celular mediante la que explicar las alteraciones del sistema inmunitario así como de otros parámetros hematológicos que se encuentran en el modelo GASH:Sal tras la estimulación sonora repetitiva y el consiguiente estrés.

Sirera et al. (2006) también apunta en su estudio a la enorme importancia del sistema inmune (regulado, entre otros factores, por el estrés) en la aparición y desarrollo de distintos tipos de tumores, teniendo especial relevancia en aquellos producidos por agentes infecciosos como por ejemplo los linfoproliferativos. Muñoz de la Pascua et al. (2013) mostró un incremento en la frecuencia de aparición de tumores, linfomas provocados por el poliomavirus HaPyV; posiblemente asociados también con una alta susceptibilidad a desarrollarlo debido a las características propias del modelo, como la susceptibilidad a las crisis y los niveles de estrés asociados que sufren. Esta relación entre niveles de estrés y desarrollo de tumores se ha observado en distintos tipos de tumores (Burchfield et al., 1978; Vegas et al., 2006) lo que determina que sea una importante vía de investigación futura en este modelo GASH:Sal.

e) Neurodegeneración: análisis de la expresión de caspasa-3-activa

En este trabajo se analizó la muerte neuronal en Colículo Inferior, Sustancia Gris Periacueductal y en el Hipocampo, teniendo en cuenta las referencias bibliográficas encontradas respecto a estos núcleos en otros estudios donde se observa tanto la degeneración como la regeneración neuronal y su importancia en el desarrollo de las crisis convulsivas (Prieto Martín et al., 2015; Wada et al., 1970).

La activación de la Caspasa-3-activa puede llevarse a través de distintas vías de señalización. Actualmente, entre ellas, las más estudiadas son la vía de las MAPK y, en relación con la epilepsia, la vía de señalización AKT/mTOR.

La excitotoxicidad es la base del daño cerebral relacionado con las crisis convulsivas, los factores cerebrales locales como los radicales libres del oxígeno (ROS) pueden conducir a la muerte neuronal (Levite, 2014; Loss et al., 2012; Quincozes-Santos et al., 2014; Tsai y Chang, 2015). El acoplamiento electrotónico neuronal que tiene lugar durante una crisis convulsiva provoca una menor eficacia en la amortiguación del K^+ por parte de la glía y una disminución del transporte de la glucosa (Steinhäuser et al., 2012).

En el caso del Colículo Inferior, nuestros resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos A y B, diferenciándose durante el protocolo de kindling los animales que dejaron de sufrir crisis convulsivas constantes (cuyos datos de inmunotinción son menores) de aquellos que continuaron teniendo las crisis hasta la finalización del experimento (cuyos valores de inmunotinción son superiores). Estos datos pueden interpretarse como resultado de la excitotoxicidad producida tras someterse a crisis repetitivas específicamente en el subgrupo A.

En el hipocampo se ha descrito daño celular tras protocolos de crisis convulsivas repetitivas, en concreto en el área CA1; también en la amígdala basolateral (BLA) y diferentes áreas rostrales (Mlsna y Koh, 2013). Nuestro trabajo presentó diferencias significativas entre los subgrupos A y B en el hipocampo; también se hallaron diferencias respecto al grupo control kindling y al GASH:Sal con una estimulación. Estas diferencias entre el subgrupo A y B, con los mayores valores de expresión hipocampal de caspasa-3 activa en el subgrupo A, indican un mayor daño neuronal y niveles superiores de apoptosis cuando se experimenta un mayor número de crisis convulsivas completas.

En nuestros experimentos, aunque se encuentran afectadas las cuatro áreas hipocampales evaluadas (GD, CA1, CA2 y CA3) respecto al hámster control, se hallaron los valores más elevados de inmunotinción frente a caspasa-3-activa en el área GD y CA3, lo que indica una mayor afectación en estas zonas en nuestro modelo experimental. Varios estudios han encontrado patrones de lesiones llamativos en el hipocampo, en CA1 y CA3, lo que muestra una vulnerabilidad selectiva de las neuronas ubicadas en esas áreas ante las crisis, así como patrones de pérdida de neuronas hipocampales (Maia et al., 2014; Figueredo et al., 2011).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en diferentes investigaciones en modelos de epilepsia (Filipkowski et al., 1994; Nobili et al., 2015), refrendando la hipótesis de partida en la que se planteaba un incremento en la inmunotinción frente a caspasa-3 activa observada en los hámsteres GASH:Sal sometidos a estimulaciones repetitivas en comparación con el grupo GASH:Sal con una estimulación y el grupo control kindling. Por otro lado, cabe destacar que los niveles basales de muerte neuronal en el hipocampo son superiores a los observados en otras áreas cerebrales debido a que en el

hipocampo están documentados los procesos de neurogénesis y muerte neuronal en condiciones fisiológicas que regulan la neuroplasticidad propia de este área (Tauber et al., 2014; Tzeng et al., 2013).

El estudio de la transcripción genética en modelos animales sometidos a kindling muestra una relación entre el incremento de la expresión de los IEGs (entre los que se encuentra *c-fos* o *EGR1*) y el aumento de expresión de genes de la vía apoptótica, activados en situaciones de crisis convulsivas repetidas. Estos hallazgos sugieren que existe un incremento en los procesos de muerte neuronal en las circunstancias de crisis convulsivas repetidas (Hughes et al., 1998). En concreto, se induce la pérdida neuronal en poblaciones límbicas, especialmente en el hipocampo (Cavazos y Sutula, 1990; Hughes et al., 1998; Wang et al., 2014). En este núcleo, los hallazgos del aumento de muerte neuronal se encuentran relacionados con alteraciones de los procesos LTP (Long-Term Potentiation) de modulación de la consolidación de la memoria y en procesos de aprendizaje, así como alteraciones en la plasticidad neuronal (Braga Calais et al., 2013; Amin et al., 2015).

f) Gliosis reactiva

Se ha descrito en este trabajo un incremento en la población glial del hámster GASH:Sal tanto en el IC como en el hipocampo tras someterse al protocolo de kindling audiógeno. Se encontraron también valores elevados en el grupo control kindling.

Los estudios realizados por Fuentes Santamaría et al. (2014) mostraron una disminución progresiva de la actividad del nervio coclear iniciada por un incremento de la activación de la microglía pero no de la astrogliá en ratas adultas en uno de los primeros núcleos de la vía auditiva en respuesta ante un estímulo sonoro (AVCN o núcleo coclear ventral).

Sin embargo, los estudios realizados por Blanco et al. (2015) en áreas más rostrales muestran alteraciones en el reconocimiento espacial y en la memoria en ratas, en las que también se halla una fuerte reacción de astrogliosis hipocampal sin pérdida neuronal.

Mohr y Sisk (2013) estudiaron los procesos de gliosis en diferentes núcleos límbicos e hipotalámicos en el hámster sirio durante su desarrollo fisiológico. Entre los núcleos analizados, están MePD y el DG del hipocampo, manifestando la importancia de estos procesos a lo largo de la vida del hámster, en relación con la plasticidad tanto estructural como funcional de las regiones hipotalámicas y límbicas en el cerebro de los mamíferos (Fowler et al., 2008; Kokoeva et al., 2005).

Estos procesos gliales se encuentran muy conservados a lo largo de la escala evolutiva y juegan un importante papel en numerosas patologías cerebrales, incluyendo la epilepsia (Pekny et al., 2014). La activación astrocitaria y la gliosis reactiva tienen un doble efecto en el SNC; sus efectos (tanto los beneficiosos como los perjudiciales) no se comprenden actualmente con claridad. Los ejemplos de estudios descritos ponen de manifiesto el debate acerca del papel y la importancia que tienen las células gliales. La glía está implicada en un elevado número de procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos, la

modulación de los mecanismos moleculares que permiten o determinan la plasticidad celular (Khaspekov y Frumkina, 2017).

Por una parte, se ha descrito un papel beneficioso de la glía frente al daño en el SNC; la regulación y neuroprotección glial sobre las células neuronales se basa en las evidencias observadas durante la activación astrocitaria: los astrocitos conforman una barrera que limita la zona afectada e impide que el daño se propague al resto del SNC. Sin embargo, si el daño (isquemia, alteraciones osmóticas, diferentes tipos de estrés, etc.) no se resuelve, se mantiene en el tiempo y la gliosis reactiva no se revierte, existen datos que apuntan los efectos negativos causados por la glía a través del bloqueo de la regeneración del SNC e inhibición de la neuroplasticidad (Pekny et al., 2014).

Por otro lado, concretamente en modelos de epilepsia, los procesos fisiológicos llevados a cabo por la glía en la regulación de neurotransmisores y aporte de metabolitos a las neuronas cobran una especial importancia (Steinhauser y Seifert, 2002). Esta función de la glía ha dado lugar al concepto de sinapsis tripartita, que representa la nueva visión de la fisiología sináptica, constituida por tres elementos: los elementos pre y postsinápticos y los astrocitos adyacentes. Se han mostrado alteraciones en las células gliales en epilepsia que determinan una baja o nula funcionalidad de las mismas, lo que impide que el transporte de metabolitos se realice correctamente, provocando una mayor susceptibilidad a las crisis convulsivas (Halassa y Haydon, 2010).

Debido a que la estimulación de los astrocitos resulta suficiente para inducir la sincronización neuronal en modelos de epilepsia (Tian et al., 2005), se han definido como una posible diana para el desarrollo de nuevas terapias. La sinapsis tripartita y la respuesta astrocitaria ante la liberación de glutamato debido a sus receptores de membrana mGluRs, podría establecerse como un punto importante tanto en la plasticidad sináptica de las redes neuronales relacionadas con la epilepsia, como en el mecanismo de gliotransmisión de las crisis convulsivas (Tang y Lee, 2001).

Estudios de kindling han puesto de manifiesto que la activación de la glía y el incremento en la frecuencia de liberación de olas de calcio al espacio extracelular de la sinapsis tripartita están directamente correlacionados con un incremento en la frecuencia de las crisis (Carmignoto y Fellin, 2006). Por otro lado, se ha correlacionado la pérdida de la enzima glutamina sintetasa (GS) astrocitaria en el hipocampo, con una facilitación en el desarrollo de las crisis epilépticas y con un incremento en áreas límbicas de la producción de c-FOS en modelos de epilepsia murinos (Albright et al., 2017). Este último hallazgo origina un circuito de retroalimentación positiva, ya que también se ha descrito un incremento de la activación glial a través de los productos generados por genes de la familia de *c-fos* (Nomaru et al., 2014). En conjunto, se establece una situación a nivel cerebral de una mayor actividad y una actividad defectuosa de la glía, que coincide, en parte, con los datos de incremento de activación neuronal determinado mediante c-FOS y de incremento de la población glial tras el kindling. Esto podría explicar el mantenimiento de la susceptibilidad a las crisis convulsivas en nuestro modelo animal, siendo sin embargo necesarias más investigaciones acerca del funcionamiento de la población glial.

Ejemplos de investigaciones realizadas en monos Rhesus (Hong et al., 2013) que sufren convulsiones tónico-clónicas generalizadas muestran una correlación entre la estimulación repetitiva y el daño mitocondrial y activación astrocitaria, de modo similar a como ocurre en pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal (TLE) (McIntyre y Gilby, 2009).

Por otra parte, diversos estudios han descrito alteraciones en la astrogliosis reactiva en modelos animales sometidos a kindling hipocampal, concretamente en el área del DG del hipocampo. Estos hallazgos sugieren que dichas alteraciones incrementan de manera progresiva la susceptibilidad a sufrir convulsiones (Szyndler et al., 2009; Yu et al., 2016). A su vez, la astrogliosis se ha podido relacionar con un aumento de la muerte neuronal, visualizada a través de la tinción con FluoroJade y Caspasa-3-activa. Esta relación entre astrogliosis y muerte neuronal parece tener su base biológica en una cascada de fosforilación proteica que determina una respuesta selectiva de señalización astrocítica, probablemente modulada por el incremento de activación neuronal y de los niveles de estrés producidos por el protocolo de kindling, que provoca una respuesta aberrante y muerte neuronal. Se ha descrito el proceso de astrogliosis reactiva en áreas hipocampales de rata Wistar sometidas a kindling, involucrando tanto a los receptores TLR que median la respuesta inmunitaria por la que se reconoce y degrada a las células sometidas a un elevado nivel de estrés, como a mediadores proinflamatorios, principalmente interleuquinas (Medel-Matus et al., 2017).

Finalmente, estudios preliminares de la distribución de receptores CB1 en animales GASH:Sal realizados en nuestro laboratorio muestran una alta intensidad de marcaje, entre otros, en el DG; evidenciando sin embargo una menor tinción en otros núcleos (por ejemplo la Sustancia Gris Periacueductal) respecto a la cepa WAR establecida como control (Masa González, 2016). Se ha descrito la importancia de los receptores CB1 y los endocannabinoides en el control del espacio extracelular de la sinapsis regulado por la población glial. La glía responde tanto a los cannabinoides endógenos como exógenos a través de sus receptores CB1, incrementando los niveles de calcio intracelular y estimulando la recaptación del glutamato (Navarrete y Araque, 2008). Estos cambios en los niveles de calcio y la recaptación de glutamato determinan la disminución de la descarga epileptogénica debido a que no se libera el calcio y disminuyen los altos niveles de glutamato del espacio extracelular sináptico (Coiret et al., 2012). El estudio futuro de la funcionalidad de estos receptores CB1 podrá determinar si están realizando correctamente su función o si son defectuosos y no están realizando su papel regulador inhibitorio, lo que explicaría el desarrollo de las crisis y además, supondría una posible diana farmacológica.

g) Heterogeneidad de la línea GASH:Sal

No se ha encontrado otro modelo animal de susceptibilidad genética para el desarrollo de crisis convulsivas en la bibliografía que muestre esta respuesta dual dentro del propio modelo frente a la misma estimulación sonora, por lo que este hecho plantea numerosas hipótesis y posibles ámbitos de investigación futura.

No obstante, se ha descrito en otro modelo animal de rata la existencia de dos líneas denominadas FAST (susceptibles a presentar crisis epilépticas) y SLOW (resistentes a la estimulación por kindling) (Langberg et al., 2016). Los estudios más recientes en este modelo se centran en las diferencias de la conducción eléctrica debidas a deficiencias en la sustancia blanca, la mielina (Sharma et al., 2017). La degeneración progresiva de la mielina se ha descrito anteriormente en epilepsia crónica (Chiang et al., 2016; Glenn et al., 2016), poniendo en evidencia una sustancia blanca aberrante en modelos de crisis espontáneas, en los que destaca una disminución del grosor de la misma alrededor de los axones (Parekh et al., 2010; Sharma et al., 2017).

Baum et al. (2014) y Gu et al. (2013) describieron en epilepsia (en humanos y en hámsteres, respectivamente) una alteración en la sustancia blanca asociada a cambios en los canales de sodio dependientes de voltaje (SCN), involucrados tanto en la mielinización como en la susceptibilidad a las crisis. Alteraciones de infraexpresión en estos SCN se han encontrado en nuestro modelo animal GASH:Sal, en concreto en los canales SCN2b y SCN1b (López-López, 2016).

Por otro lado, estudios en el modelo murino Swiss realizados por Kaur et al. (2017), al que provocan crisis epilépticas con un protocolo de kindling por inyección de PTZ vía intraperitoneal, mostraron una diferenciación en dos subgrupos, uno de ellos que desarrollaba crisis convulsivas de forma satisfactoria y otro que se volvía resistente a las convulsiones, en una proporción 60-40 respectivamente. El enfoque científico elegido en este estudio es el análisis de la neuroquímica cerebral, en concreto en la amígdala, cortex e hipocampo, hallándose una concentración mayor de los neurotransmisores GABA, Taurina, Serina y Glicina en el grupo de animales resistentes al kindling en comparación con los susceptibles. Por su parte, la ratio Glutamato/GABA se encontraba incrementada en los animales susceptibles a experimentar crisis frente a los resistentes a ellas. Los altos niveles de GABA encontrados en el grupo de ratones resistentes indican la implicación de este neurotransmisor en el mecanismo antiepileptogénico endógeno (Temkin et al., 1999), alterado y disminuido en los animales susceptibles (Smeland et al., 2013). Además, los hallazgos relativos a la Glicina, la Serina y la Taurina sugieren su potencial papel en la modulación del mecanismo antiepileptogénico, al relacionarse el incremento de la susceptibilidad a las convulsiones con descenso en los niveles de estos neurotransmisores (Betz et al., 2001; Shen et al., 2015; Boison, 2016).

El establecimiento de los niveles de GABA y Glutamato en los diferentes grupos experimentales propuestos para esta tesis podría suponer un futuro campo de investigación mediante el que evaluar la situación neuroquímica en cada uno de los subgrupos de GASH:Sal kindling estudiados, que pueda explicar las diferencias comportamentales encontradas ante la estimulación sonora repetitiva en estos subgrupos.

h) Futuras líneas de investigación en el GASH:Sal

La relación descrita entre el protocolo de kindling y el incremento de muerte neuronal del hipocampo en este trabajo, así como las referencias bibliográficas encontradas en otros modelos animales

que apuntan en esta dirección, plantean un nuevo campo de estudio de evaluación de la memoria en el GASH:Sal. Los trabajos consultados señalan a una pérdida de funcionalidad del hipocampo que se ve reflejada en alteraciones tanto en la memoria espacial, como en los procesos de aprendizaje y en el comportamiento en ambientes novedosos. Por ello, podría resultar interesante comprobar si en nuestro modelo GASH:Sal existe una afectación a estos niveles y en qué medida se encuentran afectados durante la realización del protocolo de kindling.

La corroboración de los procesos de neurodegeneración en el GASH:Sal deberá realizarse mediante diversos protocolos que pongan de manifiesto otras etapas relevantes del proceso de muerte neuronal, como la formación de cuerpos apoptóticos o la ruptura de la hebra de ADN. Estos estudios permitirán cuantificar la pérdida neuronal que está teniendo lugar en los diferentes núcleos encefálicos activados durante las crisis repetitivas.

Estudios llevados a cabo en nuestro modelo experimental en condiciones basales muestran un perfil de neurotransmisores en el que destacan unos valores muy superiores de Glutamato, neurotransmisor excitador del SNC más importante, pero también de GABA, principal inhibidor de la propagación de las crisis epilépticas, en comparación con sus antecesores, los GPG/Vall (Muñoz de la Pascua, 2004).

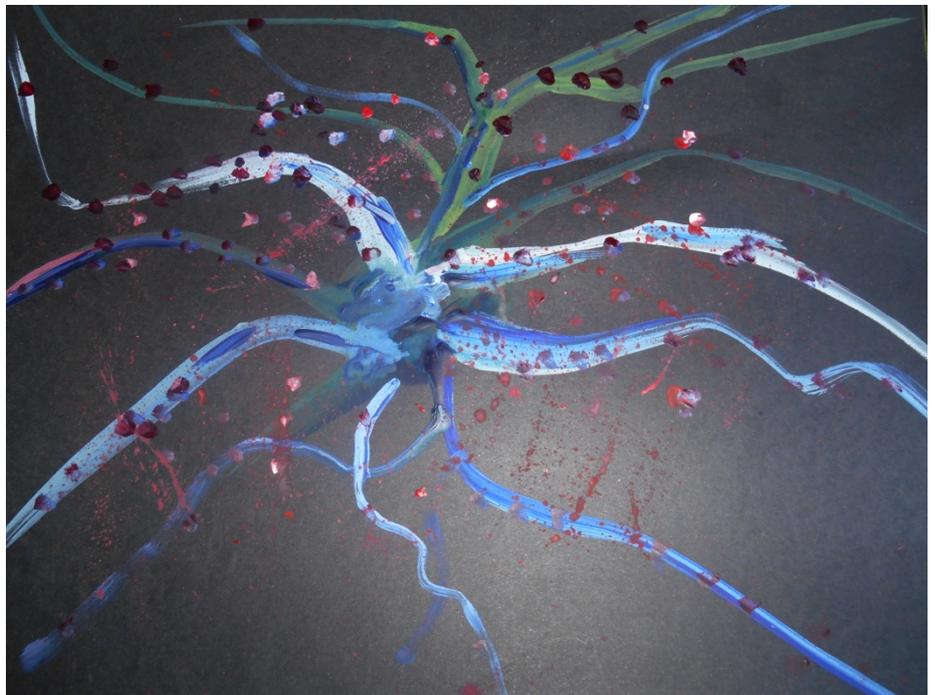
Sin embargo, no existen referencias de los valores de los neurotransmisores tras el protocolo de estimulación repetitiva, por lo que no ha sido posible analizar si los subgrupos A y B presentan diferencias en la concentración de neurotransmisores, tal como hallaron los científicos Kaur et al. (2107) en el modelo de ratón sometido a crisis. Tampoco se ha descrito en el GASH:Sal si la síntesis de estos neurotransmisores y su unión a receptores sucede de manera adecuada (Jobe et al., 1981), por lo que podría abrirse un interesante campo de estudio futuro.

Asímismo, el papel de la β -endorfina liberada por la PAG supone un área que permitirá establecer futuros mecanismos de actuación sobre la severidad de las crisis convulsivas utilizando como diana terapéutica sus receptores.

La participación de la glía en la sinapsis tripartita y su función en la recaptación de metabolitos pone de manifiesto su importancia en la epilepsia como mecanismo modulador de las crisis convulsivas. Los datos descritos en la bibliografía y los presentados en este trabajo podrían establecer una vía futura de investigación en la que abordar el bloqueo de las crisis convulsivas a través de la potenciación de la actividad recaptadora de la población glial.

Se conocen y utilizan en el ámbito científico de la investigación en epilepsia diversas especies (peces, ranas, pollos, ratones, ratas, conejos, gatos, perros y monos, entre otros) en los que el proceso de kindling es inducido mediante estimulación química o eléctrica de diferentes áreas cerebrales (cortex, amígdala, hipocampo, bulbo olfatorio, etc.) (Buckmaster, 2004). Sin embargo, un modelo de estudio como el que representa el GASH:Sal supone una enorme ventaja al no ser necesaria la inyección de

sustancias ni la implantación de electrodos por tratarse de un modelo en el que la susceptibilidad a las crisis está determinada genéticamente. Este hecho hace del GASH:Sal un modelo de epilepsia con el que resulta fácil trabajar y cuyas características son altamente reproducibles, al no involucrarse en el desarrollo de las crisis convulsivas ningún fármaco ni llevarse a cabo ninguna otra aproximación química o eléctrica.



8. CONCLUSIONES

PRIMERA

La estimulación sonora repetida modifica la secuencia comportamental de las crisis convulsivas del hámster GASH:Sal a partir de la quinta estimulación.

SEGUNDA

El análisis comportamental de los animales GASH:Sal durante las crisis repetidas permite la identificación de dos subgrupos, el **subgrupo A**, que incluye a los animales que desarrollan crisis convulsivas de forma permanente a lo largo de todo el protocolo de kindling, y el **subgrupo B**, que engloba a los animales que a partir de la 9ª estimulación acústica, no experimentan crisis convulsivas típicas.

TERCERA

El kindling audiógeno provoca en el hámster GASH:Sal la aparición de comportamientos de origen límbico a medida que aumenta el número de estimulaciones, lo que se confirma con un incremento del índice de severidad límbico de las crisis.

CUARTA

El GASH:Sal muestra reclutamiento de áreas cerebrales tras el kindling audiógeno, tanto de regiones mesencefálicas como límbicas, manifestándose una activación diferencial de los núcleos Colículo Inferior, Locus Coeruleus, Sustancia Gris Periacueductal, Hipocampo, Núcleo Hipotalámico Periventricular, Núcleo Amigdaloides Medial Posterodorsal y Núcleo Basolateral Amigdalino.

QUINTA

En los grupos de estudio, el grupo control sometido a estimulaciones repetitivas es el que presenta una menor activación en todos los núcleos estudiados; el GASH:Sal estimulado una vez, por el contrario, es el que muestra una mayor activación de los núcleos troncoencefálicos estudiados (Colículo Inferior y Locus Coeruleus)

SEXTA

Las crisis convulsivas repetidas provocan estrés en el GASH:Sal, detectándose un aumento de los niveles de cortisol en sangre y alteraciones comportamentales. También se demuestran variaciones hematológicas que podrían relacionarse con la exposición al estrés de forma continuada, como cambios en los niveles de eosinófilos y linfocitos.

SÉPTIMA

Las crisis convulsivas repetidas provocan en el GASH:Sal neurogénesis en el Hipocampo y un aumento de la muerte neuronal en este núcleo y en el Colículo Inferior.

OCTAVA

El desarrollo de crisis convulsivas repetidas en los animales GASH:Sal induce incremento de la glía, específicamente de la población astrocitaria, en el Colículo Inferior e Hipocampo.

NOVENA

El presente estudio permite caracterizar alteraciones de la cepa GASH:Sal a distintos niveles tras sufrir crisis convulsivas repetidas, desencadenadas por la aplicación del protocolo de kindling.



9. BIBLIOGRAFÍA

A

- Ahmadi, M., Dufour, J-P., Seifritz, E., Mirnajafi-Zadeh, J. and Saab, B. J. (2017). The PTZ kindling mouse model of epilepsy exhibits exploratory drive deficits and aberrant activity amongst VTA dopamine neurons in both familiar and novel space. *Behavioural Brain Research* 330, 1-7.
- Albright, B., Dhaher, R., Wang, H., Harb, R., Lee, T-S. W., Zaveri, H. and Eid, T. (2017). Progressive neuronal activation accompanies epileptogenesis caused by hippocampal glutamine synthetase inhibition. *Experimental Neurology* 288, 122-133.
- Alger, B. E. (2004). Endocannabinoids and their implications for epilepsy. *Epilepsy Curr.* 4, 169-173.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145, 573-591.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with septal reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp Neurol.* 137, 433-457.
- Alunni, A. and Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development* 143(5), 741-753.
- Alvarez, P. and Squire, L. R. (2012). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7041-7045.
- Alvarez-Linera Prado, J., Bargalló Alabart, N. y Sentoain Perego, X. (2012). Métodos diagnósticos en epilepsia: Neuroimagen. *Guía oficial de práctica clínica en epilepsia. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología.*
- Amin, S. N., El-Aidi, A. A., Ali, M. M., Attia, Y. M. and Rashed, L. A. (2015). Modification of hippocampal markers of synaptic plasticity by memantine in animal models of acute and repeated restraint stress: implications for memory and behavior. *Neuromol. Med.*, 17, 121-136.
- Appavu, B., Mangum, T. and Obeid, M. (2015). Glucose Transporter 1 deficiency: a treatable cause of opsoclonus and epileptic myoclonus. *Pediatr. Neurol.* 53 (4), 364-366.
- Arabadzisz, J., Antal, C., Parpan, P., Emri, M. and Fritschy, L. (2005). Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus. *Experimental*

Neurology 194, 76-90.

Araújo Guedes, R. C., Cortes de Oliveira, J. A., Amancio-dos-Santos, A. and García-Cairasco, N. (2009). Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar Audiogenic Rat (WAR). *Epilepsy Research* 83, 207-214.

Araújo Rodrigues, M. C., Guizzo, R., Ferreira dos Santos, W. and García-Cairasco, N. (2001). A comparative neuroethological study of limbic seizures induced by *Parawixia bistriata* venom and kainic acid injections in rats. *Brain Research Bulletin* 55, 79-86.

Archer, J. (1973). Test for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 21, 205-235.

Arenander, A. T., de Vellis, J. and Herschman, H. R. (1989a). Induction of *c-fos* and TIS genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.* 24, 107-117.

Arenander, A. T., Lim, R. W., Varnum, B. C., Cole, R., De Vellis, J. and Herschman, H. R. (1989b). TIS gene expression in cultured rat astrocytes: induction by mitogens and stellation agents. *J. Neurosci. Res.* 23, 257-265.

Ashley, N. T., Walton, J. C., Haim, A., Zhang, N., Prince, L.A., Fruchey, A. M., Lieberman, R. A., Weil, Z. M., Magalang, U. J. and Nelson, R. J. (2013). Sleep deprivation attenuates endotoxin-induced cytokine gene expression independent of day length and circulating cortisol in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *The Journal of Experimental Biology* 216, 2581-2586.

Aston-Jones, G., Chaing, C. and Alexinsky, T. (1991). Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Progress in Brain Research* 88, 501-520.

Aston-Jones, G. and Cohen, J. D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Ann. Rev. Neurosci.* 28, 403-450.

B

Bajic, D. and Proudfit, H. K. (1999). Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *J. Comp. Neurol.* 405 (3), 359-379.

Bak, L. K. (2017). Astrocytes take the stage in a tale of signaling-metabolism coupling. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 292 (22), 9439-9440.

- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuisen, H. H. and Feldon, J. (2004). Regional dissociations withing the hippocampus – memory and anxiety. *Neurosci.Biobehav. Rev.* 28, 273-283.
- Barker-Haliski, M. L., Vanegas, F., Mau, M. J., Underwood, T. K. and White, H. S. (2016). Acute cognitive impact of antiseizure drugs in naïve rodents and corneal-kindled mice. *Epilepsia*, 57 (9), 1386-1397.
- Barrera-Bailón, B., Oliveira, J. A. C., López, D. E., Muñoz de la Pascua, L. J., Garcia-Cairasco, N. and Sancho, C. (2013). Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior* 28(3), 413-425.
- Barrera-Bailón, B., Oliveira, J. A. C., López, D. E., Muñoz, L. J., Garcia-Cairasco, N. and Sancho, C. (2017). Pharmacological validation of the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal) using several antiepileptics. *Epilepsy Behav* 71, 207-217.
- Barrios Rodríguez, L. F. (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.
- Basbaum, A. I. and Fields, H. L. (1978). Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. *Ann. Neurol.*4, 451-462.
- Basbaum, A. I. and Fields, H. L. (1984). Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* 7, 309-338.
- Bast, T. and Feldon, J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* 70, 319-345.
- Bastida, C. C., Puga, F. and Delville, Y. (2009) Risk assessment and avoidance in juvenile golden hamsters exposed to repeated stress. *Horm Behav.* 55, 158-62.
- Baum, L., Haerian, B. S., Ng, H. K., Wong, V. C., Ng, P. W., Lui, C. H., Sin, N. C., Zhang, C., Tomlinson, B., Wong, G. W., Tan, H. J., Raymond, A. A., Mohamed, Z. and Kwan, P. (2014). Case-control association study of polymorphisms in the voltagegated sodiumchannel genes SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN1B, and SCN2B and epilepsy. *Hum. Genet.* 133, 651–659.
- Becker, A., Grecksch, G. and Brosz, M. (1995). Antiepileptic drugs-their effects on kindled seizures and kindling-induced learning impairments. *Pharmacol Biochem Behav.* 52, 453-459.

- Beery, A. K. and Zucker, I. (2012). Sex ratio adjustment by sex-specific maternal cannibalism in hamsters. *Physiology & Behavior* 107, 271-276.
- Belzung, C. and Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research* 125, 141-149.
- Bergles, D. E., Jabs, R. and Steinhauser, C. (2010). Neuron-glia synapses in the brain. *Brain research reviews* 63, 130-137.
- Berti, P., Tejada, J., Pinheiro Martins, A. P., Dal-Cól, M. L. C., Terra, V. C., de Oliveira, J. A. C., Rodrigues Velasco, T., Sakamoto, A. C. and García-Cairasco, N. (2014). Looking for complexity in quantitative semiology of frontal and temporal lobe seizures using neuroethology and graph theory. *Epilepsy and behavior* 38, 81-93.
- Betz, H., Harvey, R. J. and Schloss, P. (2001). Structures, diversity and pharmacology of glycine receptors and transporters. *Pharmacology of GABA and glycine neurotransmission* 34, 375–401.
- Blanchard, R. J., Nikulina, J. N., Sakai, R. R., McKittrick, C., McEwen, B. and Blanchard, D. C. (1998). Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav.* 63, 561–569.
- Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M. I., Romero, J. I., Logica, T., Rivera, P., Pavón, F. J., Suárez, J., Capani, F. and Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Frontiers in Neuroanatomy* 9 (141), 1-16.
- Blatteis, C. M. (1988). Neural Mechanisms in the pyrogenic and acute-phase responses to interleukin-1. *Int. J. Neurosci*, 38, 223-232.
- Bleier, R. and Byne, W. (1985). “Septum and hypothalamus”. Paxinos, The rat nervous System, 1, academic Press, Australia, 87-118.
- Boison, D. (2016). The biochemistry and epigenetics of epilepsy: focus on adenosine and glycine. *Front Mol Neurosci.* 9, 26-35.
- Botterill, J. J., Guskjolen, A. J., Marks, W. N., Caruncho, H. J. and Kalynchuk, L. E. (2015). Limbic but not non-limbic kindling impairs conditioned fear and promotes plasticity of NPY and its Y2 receptor. *Brain Struct. Funct.* 220 (6), 3641-3655.

- Braga Calais, J., Valvassori, S. S., Resende, W. R., Feier, G., Pedro Athié, M. C., Ribeiro, S., Farid Gattaz, W., Quevedo, J. and Benquique Ojopi, E. (2013). Long-term decrease in immediate early gene expression after electroconvulsive seizures. *J. Neural Transm.* 120, 259-266.
- Breier, J. I., Plenger, P. M., Castillo, R., Fuchs, K., Wheless, J. W., Thomas, A. B., Brookshire, B. L., Willmore, L. J. and Papanicolaou, A. (1996). Effects of temporal lobe epilepsy on spatial and figural aspects of memory for a complex geometric figure. *J Int Neuropsychol Soc.* 2, 535-540.
- Buckmaster, P. S. (2004). Laboratory animal models of temporal lobe epilepsy. *Comp Med.* 54, 473-485.
- Buffenstein, R. and Pinto, M. (2009). Endocrine function in naturally long-living small mammals. *Mol Cell Endocrinol.* 299, 101-111.
- Bullitt, E. (1990). Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat.
- Burchfield, S. R., Woods, S. C. and Elich, M. S. (1978). Effects of cold stress on tumor growth. *Physiol Behave.* 21, 537-540.
- C**
- Cameron, H. A. and McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* 435, 406-417.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C. and Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista brasileira de Psiquiatria* 35, 101-111.
- Canto, C. B., Witter, L. and De Zeeuw, C. I. (2016). Whole cell properties of cerebellar nuclei neurons *in vivo*. *PLoS ONE* 11(11), 1-19.
- Carballosa-Gonzalez, M. M., Muñoz, L. J., López-Alburquerque, T., Pardal-Fernández, M. J., Nava, E., de Cabo, C., Sancho, C. and López, D. E. (2013). EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research* 106, 318-325.
- Careau, V., Bininda-Emons, O. R. P., Ordonez, G. and Garland, Jr. T. (2012). Are voluntary Wheel running and open-field behavior correlated in mice? Different answers from comparative and artificial selection approaches. *Behav. Genet.* 42, 830-844.
- Çarçak, N., Dileköz, E., Gülhan, R., Onur, R., Onat, F. Y. and Sara, Y. (2016). Increased inhibitory

synaptic activity in the hippocampus (CA1) of genetic absence epilepsy rats: Relevance of kindling resistance. *Epilepsy Research* 126, 70-77.

Carmignoto, G. and Fellin, T. (2006). Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *J. Physiol. Paris* 99, 98-102.

Carr, A. M., Carpenter, M. M., Souza, A. R., Elmore, A. T. Lovering, C. E. and Reigel, N. C. (1998). Alterations in brain and pituitary b-endorphin content in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Research* 31, 113-122.

Carvalho, K. C., Uchida, C. G., Guaranha, M. S., Guilhoto, L. M, Wolf, P. and Yacubian, E. M. (2016). Cognitive performance in juvenile myoclonic epilepsy patients with specific endophenotypes. *Seizure* 40, 33-41.

Castro, G. P., de Castro Medeiros, D., de Oliveira Guarnieri, L., Gonçalves Mourao, F. A., Pereira Pinto, H. P., Pereira, G. S. and Moraes, M. F. D. (2017). Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy and behavior* 71, 243-249.

Cavazos, J. E. and Sutula, J. P. (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fibre synaptic reorganization. *Brain Res.*, 527, 1-6.

Chakravarty, D. N. and Faingold, C. L. (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), 263-270.

Chandley, M. J., Szebeni, A., Szebeni, K., Crawford, J. D., Stockmeier, C. A., Turecki, G., Kostrzewa, R. M. and Ordway, G. A. (2014). Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17 (10), 1569-1578.

Chernigovskaya, E. V., Korotkov, A. A., Nikitina, L. S., Dorofeeva, N. A. and Glazova, M. V. (2015). The expression and distribution of seizure-related and synaptic proteins in the insular cortex of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Neurol. Res.* 37 (12), 1108-1117.

Chen, Z. and Trapp, B. D. (2016). Microglia and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 136, 10-17.

Chen, L., Cheng, L., Wei, X., Yuan, Z., Wu, Y., Wang, S., Ren, Z., Lui, X. and Liu, H. (2017).

- Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against dopaminergic neuronal apoptosis via activation of PI3K/Akt/GSK3b signaling pathway in 6-OHDA-induced Parkinson's disease mice. *Neurochem. Res.* 42, 1141-1150.
- Chen, S-D., Wang, Y-L., Liang, S-F. and Shaw, F-Z. (2016). Rapid amygdala kindling causes motor seizures and comorbidity of anxiety – and depression – like behaviors in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience* 10, 1-12.
- Chen, Y., Bender, R. A., Frotscher, M. and Baram, T. Z. (2001). Novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: a quantitative spatiotemporal analysis. *J. Neurosci.* 21(18), 7171-7181.
- Chiang, S., Levin, H. S., Wilde, E. and Haneef, Z. (2016). White matter structural connectivity changes correlate with epilepsy duration in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, 120, 37–46
- Chung, S. H., Guo, F., Jiang, P., Pleasure, D. E. and Deng, W. (2013). Olig2/Plp-positive progenitor cells give rise to Bergmann glia in the cerebellum. *Cell death dis.* 546, 1-12.
- Cioczek-Czuczwar, A., Czuczwar, P., Turski, W. A. and Parada-Turska, J. (2017). Influence of picolinic acid on seizure susceptibility in mice. *Pharmacol. Rep.* 69, 77-90.
- Clough, R. W., Eells, J. B., Browning, R.A. and Jobe, P.C. (1997). Seizures and proto-oncogene expression of fos in the brain of adult genetically epilepsy-prone rats. *Exp. Neurol.* 146, 341-353.
- Citraro, R., Leo, A., Franco, V., Marchiselli, R., PeruCCAs, E., De Sarro, G. and Russo, E. (2017). Perampanel effects in the WAG/Rij rat model of epileptogenesis, absence epilepsy, and comorbid depressive-like behavior. *Epilepsia* 58 (2), 231-238.
- Coiret, G., Ster, J., Grewe, B., Wendling, F., Helmchen, F., Gerber, U., and Benquet, P. (2012). Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *PLoS One* 7, 327-340.
- Cunha, A. O. S., de Oliveira, J. A. C., Almeida, S. S., García-Cairasco, N. and Leao, R. M. (2015). Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. *Neuroscience* 310, 114-127.
- Curran, T. and Teich, N. M. (1982). Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology* 116, 221-235.

- Curran, T., MacConnell, W. P., van Straaten, F. and Verma, I. M. (1983). Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol* 3, 914-921.
- Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. and Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36, 259-268.
- Curran, T. and Morgan, J. I. (1995). Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J. Neurobiol.*, 26 (3), 403-412.
- Curtis, A. L., Pavcovich, L. A. and Valentino, R. J. (1995). Previous stress alters corticotrophin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience* 65, 541-550.
- Czéh, B., Müller-Kueker, J. I. H., Rygula, R., Abumaria, N., Hiemke, C., Domenici, E. and Fuchs, E. (2007). Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32, 1490-1503.
- D**
- Dal-Cól, M. L. D., Terra-Bustamante, V. C., Velasco, T. R., Oliveira, J. A. C., Sakamoto, A. C. and García-Cairasco, N. (2006). Neuroethology application for the study of human temporal lobe epilepsy: From basic to applied sciences. *Epilepsy and behavior* 8, 149-160.
- De Freitas, R. L., de Oliveira, R. C., de Oliveira, R., Paschoalin-Maurin, T., de Aguiar Correa, F. M. and Coimbra, N. C. (2014). The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse*, 68, 16-30.
- Depaulis, A., David, O. and Charpier, S. (2016). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *Journal of Neuroscience Methods* 260, 159-174.
- Del Bigio, M. R. (1999). Proliferative status of cells in adult human dentate gyrus. *Microsc Res Tech.* 45 (6), 353-358.
- Djogo, T., Robins, S. C., Schneider, S., Kryzskaya, D., Liu, X., Mingay, A., Gillon, C. J., Kim, J. H., Storch, K. F., Boehm, U., Bourque, C. W., Stroh, T., Dimou, L. and Kokoeva, M. V. (2016). Adult NG2-Glia are required for median eminence-mediated leptin sensing and body weight

- control. *Cell Metab.* 23 (5), 797-810.
- Dodrill, C. B. (2002). Progressive cognitive decline in adolescents and adults with epilepsy. *Prog Brain Res.* 135, 399-407.
- Domínguez-Roldan, R., Hallal-Calleros, C., Sciutto, E., Hernández, M., Aguirre-Flores, V., García-Jiménez, S., Báez-Saldaña, A. and Flores-Pérez, F. I. (2016). Behavioral and hormonal changes associated with the infective dose in experimental taeniasis in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Experimental parasitology* 166, 173-180.
- Doretto, M. C., Cortes de Oliveira, J. A., Rossetti, F. and García-Cairasco, N. (2009). Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar Audiogenic Rats. *Epilepsia* 50, 2563-2574.
- Dornan, W. A. and Malsbury, C. W. (1989). Neuropeptides and male sexual behavior. *Neurosci. Behav. Rev* 13, 1-15.
- Dragunow, M. and Robertson, H. A. (1987). Kindling stimulation induces *c-fos* protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329, 441-442.
- Dragunow, M. and Robertson, H. A. (1988). Seizure-inducible *c-fos* protein(s) in mammalian neurons. *Elsevier Publications* 9, 5.
- Dragunow, M. and Robertson, H. A. (1988). Localization and induction of *c-fos* protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. *Brain Research* 440, 252-260.
- Ducottet, C., Aubert, A. and Belzung, C. (2004). Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. *Behav Brain Res.* 155, 291–299.
- Duman, R. S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry* 56, 140-145.
- E**
- Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A. and Jobe, P. C. (2004). Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience* 123, 279-292.
- Egawa, N., Lok, J. and Arai, K. (2016). Mechanisms of cellular plasticity in cerebral perivascular region. *Prog Brain Res.* 225, 183-200.
- Elinos-Báez, C. M., Maldonado, V. and Meléndez-Zajgla, J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de

apoptosis. *Gac. Méd. Méx.* 139, 493-499.

Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety – Pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior* 135, 55-71.

Esmailpour, K., Sheibani, V., Shabani, M. and Mirnajafi-Zadeh, J. (2017). Effect of low frequency electrical stimulation on seizure-induced short- and long-term impairments in learning and memory in rats. *Physiology & Behavior*, 168, 112-121.

F

Faingold, C. L. (1999). Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv. Neurol.* 79, 311-321.

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. and Caspary, D. M. (1986). Inferior colliculus neuronal response abnormalities in genetically epilepsy-prone rats: evidence for a deficit of inhibition. *Life Sci.* 39, 869-878.

Faingold, C. L., Millan, M. H., Boersma, C. A. and Meldrum, B. S. (1988). Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. I. Afferent seizure initiation pathway. *Exp. Neurol.* 99, 678-686.

Faingold, C. L. and Randall, M. E. (1995). Pontine reticular formation neurons exhibit a premature and precipitous increase in acoustic responses prior to audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res.* 704 (2), 218-226.

Faingold, C. L. and Randall, M. E. (1999). Neurons in the deep layers of superior colliculus play a critical role in the neuronal network for audiogenic seizures: mechanisms for production of wild running behavior. *Brain Res.* 815 (2), 250-258.

Fauvelle, F., BoCCAsrd, J., Cavarec, F., Depaulis, A. and Deransart, C. (2015). Assessing susceptibility to epilepsy in three rat strains using brain metabolic profiling based on HRMAS NMR Spectroscopy and chemometrics. *J. Proteome Res.* 14 (5), 2177-2189.

Feng, H. J., Naritoku, D. K., Randall, M. E. and Faingold, C.L. (2001). Modulation of audiogenically kindled seizures by gamma-aminobutyric acid-related mechanisms in the amygdala. *Exp. Neurol.* 172 (2), 477-481.

- Figueredo, T. H., Qashu, F., Apland, J. P., Aroniadou-Anderjaska, V., Souza, A. P. and Braga, M. F. M. (2011). The GluK1 (GluR5) Kainate/ α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor Antagonist LY293558 reduces soman-induced seizures and neuropathology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336 (2), 303-312.
- Florio, M. and Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182-2194.
- Flügge, G., Kramer, M. and Fuchs, E. (2001). Chronic subordination stress in male tree shrews: replacement of testosterone affects behaviour and central α 2-adrenoceptors. *Physiol. Behav.* 73, 293–300.
- Fowler, C. D., Liu, Y. and Wang, Z. (2008). Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Brain Res Rev.* 57(2), 342-351.
- François, J., Boehrer, A. and Nehlig, A. (2008). Effects of carisbamate (RWJ-333369) in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia*, 49 (3), 393-399.
- Freitas, R. L., Ferreira, C. M., Ribeiro, S. J., Carvalho, A. D., Elias-Filho, D. H., Garcia-Cairasco, N. and Coimbra, N. C. (2005). Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. *Exp Neurol.* 191(2), 225-242.
- Fukumoto, S., Tanaka, S., Tojo, H., Aikane, K. and Takigawa, M. (2002). Perirhinal cortical lesion suppresses the secondary generalization in kainic acid-induced limbic seizure. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 56, 561-567.
- G**
- Galanopoulou, A. S. (2013). Basic mechanisms of catastrophic epilepsy – overview from animal models. *Brain Dev.* 35 (8), 748-756.
- Gao, M., Igata, H., Takeuchi, A., Sato, K. and Ikegaya, Y. (2017). Machine learning-based prediction of adverse drug effects: an example of seizure-inducing compounds. *Journal of Pharmacological Sciences* 133, 70-78.
- García-Cairasco, N. and Sabbatini, R. M. (1989). Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in

- hemidelencephalated rats. *Behav. Brain Res.* 33, 65-77.
- García-Cairasco N., Terra, V.C., Doretto M.C. (1993). Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behavioral Brain Research* 58, 26-38.
- García-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Cortes de Oliveira, J. A., Gomes, E. L. T., Del Bel, E. A. and Mello, L. E. A. M. (1996). Neuroethological and morphological (Neo – Timm Staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar Rats. *Epilepsy Research* 26, 177-192.
- García-Cairasco, N. (2002). A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Research* 168, 208-222.
- García-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J. A. C. and Furtado, M. A. (2003). Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar Audiogenic Rats (WAR strain). *Epilepsy and behavior* 5, 455-463.
- García-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J. A. C. and Furtado, M. de A. (2004). Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar Audiogenic Rats (WAR strain). *Epilepsy & Behavior* 5, 455-463.
- García-Cairasco, N., Umeoka, E. H. L. and Cortes-de-Oliveira, J. A. (2017). The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior* 71, 250-273.
- Gebhardt-Henrich, S. G., Fischer, K., Hauzenberg, A. R., Keller, P. and Steiger, A. (2007). The duration of capture and restraint during anesthesia and euthanasia influences glucocorticoid levels in male golden hamsters. *Lab Animal* 36, 41-46.
- Gil-Loyzaga, P. y Carricondo, F. (2013). *Presbiacusia: envejecimiento de la vía auditiva central*. Libro blanco sobre la Presbiacusia. Comité científico GAES, 28-41.
- Glenn, G.R., Jensen, J. H., Helpem, J. A., Spampinato, M. V., Kuzniecky, R., Keller, S. S. And Bonilha, L. (2016). Epilepsy-related cytoarchitectonic abnormalities along white matter pathways. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 930-936.
- Goes Gitaí, D. L., Fachin, A. L., Mello, S. S., Fuzachi Elias, C., Cioni Bittencourt, J., Pereira Leite, J., Da Silva Passos, G. A., García-Cairasco, N. and Pacó-Larson, M. L. (2011). The non-coding

- RNA BC1 is down-regulated in the hippocampus of Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain after audiogenic kindling. *Brain Research* 1367, 114-121.
- Gould, T. D., Dao, D. T. and Kovacsics, C.E. (2009). The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests. *Human Press* 1-20.
- Grigoletto, J., Oliveira, C. V., Grauncke, A. C., Souza, T. L., Souto, N. S., Freitas, M. L., Furian, A. F., Santos, A. R. and Oliveira, M. S. (2016). Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylentetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy Behav.* 62, 27-34.
- Gu, Z., Li, F., Zhang, Y. P., Shields, L. B., Hu, X., Zheng, Y., Yu, P., Zhang, Y., Cai, J., Vitek, M. P. and Shields, C. B. (2013). Apolipoprotein E mimetic promotes functional and histological recovery in lysolecithin-induced spinal cord demyelination in mice. *J Neurol Neurophysiol* 23, 456-467.
- Guijarro, A., Laviano, A. and Meguid, M. M. (2006). Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 367-405.
- Guo, B., Zheng, C., Cai, W., Cheng, J., Wang, H., Li, H., Sun, Y., Cui, W., Wang, Y., Han, Y., Lee, S. M-Y. and Zhang, Z. (2016). Multifunction of chrysin in Parkinson's model: anti-neuronal apoptosis, neuroprotection via activation of MEF2D, and inhibition of monoamine oxidase-B. *journal of agricultural and food chemistry* 64, 5324-5333.
- Gupta, D. and Morley, J. E. (2014). Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr. Physiol.*, 4 (4), 1495-1510.
- Grzanna, R. and Molliver, M. E. (1980). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5(1), 21-40.
- H**
- Halassa, M. M. and Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335-355.
- Hamann, M., Bennay, M., Gernert, M., Schwabe, K., Koch, M. and Richter, A. (2008). Decreased density of amygdaloid parvalbumin-positive interneurons and behavioral changes in dystonic hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behav Neurosci* 122, 36-43.
- Hankenson, F. C., Braden-Weiss, G. C. and Blendy, J. A. (2011). Behavioral and activity assessment of laboratory mice (*Mus musculus*) after tail biopsy under isoflurane anesthesia. *J. Am Assoc Lab*

*Anim Sci.*50 (5), 686-694.

Harty, R. C., Kim, T. H., Thomas, E. A., Cardamone, L., Jones, N. C., Petrou, S. and Wimmer, V. C. (2013). Axon initial segment structural plasticity in animal models of genetic and acquired epilepsy. *Epilepsy Res.* 105 (3), 272-279.

Hasegawa, D., Mizoguchi, S., Kuwabara, T., Hamamoto, Y., Ogawa, F., Matsuki, N., Uchida, K. and Fujita, M. (2014). Electroencephalographic features of familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Research*, 108, 1018-1025.

Heckers, S., Zalesak, M., Weiss, A. P., Ditman, T., and Titone, D. (2004). Hippocampal activation during transitive inference in humans. *Hippocampus* 14, 153-162.

Helbig, I. (2015). Genetic causes of generalized epilepsies. *Semin. Neurol.* 35 (3), 288-292.

Heldmaier, G. and Steinlechner, S. (1981). Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48 (2), 265-270.

Herdegen, T. and Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research* 28, 370-490.

Herrera, D. G. and Robertson, H. A. (1996). Activation of *c-fos* in the brain. *Progress in Neurobiology* 50, 83-107.

Henshall, D. C. and Simon, R. P. (2005). Epilepsy and apoptosis pathways. *J. Cereb Flow Metab.* 25 (12), 1557-1572.

Hildebrand, M. S., Damiano, J. A., Mullen, S. A., Bellows, S. T., Oliver, K. L., Dahl, H. H., Scheffer, I. E. and Berkovic, S. F. (2014). Glucose metabolism transporters and epilepsy: only GLUT1 has an established role. *Epilepsia* 55 (2), 18-21.

Hill, M. N. and Patel, S. (2013). Translational evidence for the involvement of the endocannabinoid system in stress-related psychiatric illnesses. *Biol Mood Anxiety Disord.* 24, 3-19.

Hofmann, G., Balgooyen, L., Mattis, J., Deisseroth, K. and Buckmaster, P. S. (2016). Hilar somatostatin interneuron loss reduces dentate gyrus inhibition in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 57 (6), 977-983.

Hong, Z., Yang, T. H., Tang, M. H., Zhang, H., Li, H. X., Chen, L., Chen, Q. and Zhou, D. (2013). A novel kindling model of temporal lobe epilepsy in Rhesus monkeys induced by Coriaria

- lactone. *Epilepsy Behav.* 29 (3), 457-465.
- Hormigo Muñoz, S. (2012). El papel del locus coeruleus en la inhibición del reflejo auditivo de sobresalto por estímulo previo (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca.
- Houser, C. R., Zhang, N., Peng, Z., Huang, C. S. and Cetina, Y. (2012). Neuroanatomical clues to altered neuronal activity in epilepsy: from ultrastructure to signaling pathways of dentate granule cells. *Epilepsia* 53, 67-77.
- Hu, J., Wang, Z., Guo, Y. Y., Zhang, X. N., Xu, Z. H., Liu, S. B., Guo, H. J., Yang, Q., Zhang, F. X., Sun, X. L. and Zhao, M. G. (2009). A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain. *Mol. Pain* 5, 71-78.
- Huber, B. and Bocchicchio, M. (2015). A retrospective evaluation of retigabine in patients with cognitive impairment with highly drug-resistant epilepsy. *Epilepsy & behavior* 44, 234-237.
- Hughes, P. E., Alexi, T., Walton, M., Williams, C. E., Dragunow, M., Clarck, R. G. and Gluckman, P. D. (1998). Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 57, 421-450.
- I**
- ILAE (2014). Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J. Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., PeruCCAs, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M. and Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475-482.
- Inoue, K. (2017). Purinergic signaling in microglia in the pathogenesis of neuropathic pain. *Proc.Jpn. Acad.* 93, 174-182.
- Inoue, M., Yamamoto, A., Kaneko, Y., Noda, A. and Naito, H. (2014). Effect of conventional anticonvulsivant drugs on generalized tonic-clonic seizures in Noda epileptic rats. *Epilepsy Research* 108, 1158-1167.
- Ishida, Y., Nakahara, D., Hashiguchi, H., Nakamura, M., Ebihara, K., Takeda, R., Nishimori, T. and Niki, H. (2002). Fos expression in GABAergic cells and cells immunopositive for NMDA receptors in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats. *Synapse* 46 (2), 100-107.

J

- Jackson, G. D., Pedersen, M. and Harvey A. S. (2017). How small can the epileptogenic region be? A case in point. *Neurology* 88 (21), 2017-2019.
- Jiang, Y., Lu, Y., Jia, M., Wang, X., Zhang, Z., Hou, Q. and Wang, B. (2016). Ketogenic diet attenuates spatial and ítem memory impairment in pentylenetetrazol-kindled rats. *Brain Research* 1646, 451-458.
- Jobe, P. C. and Laird, H. E. (1981). Neurotransmitter abnormalities as determinants of seizure susceptibility and intensity in the genetic models of epilepsy. *Biochem Pharmacol.* 30 (23), 3137-3144.

K

- Kai, N. and Niki, H. (2002). Altered tone-induced Fos expression in the mouse inferior colliculus after early exposure to intense noise. *Neuroscience Research* 44, 305-313.
- Kairiss, E. W., Racine, R. J. and Smith, G. K. (1984). The development of the interictal spike during kindling in the rat. *Brain Research* 322, 101-110.
- Kamada, T., Sun, W. Takase, K., Shigeto, H., Suzuki, S. O., Ohyagi, Y and Kira, J. (2013). Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. *Epilepsy Research*, 105, 280-291.
- Kamal, A., Ramakers, G. M. J., Altinbilek, B. and Kas, M. J. H. (2014). Social isolation stress reduces hippocampal long-term potentiation: effect of animal strain and involvement of glucocorticoid receptors. *Neuroscience*, 256, 262-270.
- Kaur, D., Pahwa, P. and Goel, R. K. (2016). Protective effect of nerolidol against pentylenetetrazol induced kindling, oxidative stress and associated behavioral comorbidities in mice. *Neurochem Res.*, 41, 2859-2867.
- Kaur, N., Singh, T., Kumar, S. and Kumar Goel, R. (2017). Neurochemical evidence based suggested therapy for safe management of epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior* 72, 8-16.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F. and Verkhratsky, A. (2013) Microglía: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77, 10-18.
- Kerr, J. F., Willie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kesner, R. P. (1966). Subcortical mechanisms of audiogenic seizures. *Exp. Neurol.* 15, 192–205.

- Khaspekov, L. G. and Frumkina, L. E. (2017). Molecular mechanisms mediating involvement of glial cells in brain plastic remodeling in epilepsy. *Biochemistry* 82 (3), 380-391.
- Kim, J. E., Jang, B. G., Choi, B. Y., Kwon, L. M., Sohn, M., Song, H. K. and Suh, S. W. (2012). Zinc Chelation Reduces Hippocampal Neurogenesis after Pilocarpine-Induced Seizure. *Plos One* 7, 1-10.
- Klein, B. D., Fu, Y-H., Ptacek, L. J. and 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 Research* 62, 13-25.
- Klepper, A. and Herbert, H. (1991). Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Brain Res.* 557, 190-201.
- Komatsu, H., Nogaya, J. and Ogli, K. (1994). Volatile anaesthetics as central nervous system excitants. *Ann Acad Med Singapore* 23 (6), 130-138.
- Kommajosyula, S. P., Randall, M. E., Brozoski, T. J., Odintsov, B. M. and Faingold, C. L. (2017). Specific subcortical structures are activated during seizure-induced death in a model of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): A manganese-enhanced magnetic resonance imaging study. *Epilepsy Research*, 135, 87-94.
- Kramer, M., Hiemke, C. and Fuchs, E. (1999). Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependant behavioural and endocrine effects. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 937-947.
- Kriegstein, A. and Álvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32, 149-184.
- Krivopalov, S. A. and Yushkov, B. G. (2015). Sex differences in behavioral reactions and the character of audiogenic seizures in Krushnisky-Molodkina Rat strain. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 65(6), 756-765.
- Krugers, H. J., Maslam, S., Korf, J., Joels, M. and Holsboer, F. (2000). The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. *Stroke* 31(5), 1162-1172.
- Koellhoffer, E. C., McCullough, L. C. and Ritzel, R. M. (2017). Old maids: aging and its impact on microglia function. *International journal of molecular sciences* 18, 769-284.

- Kokaia, Z. and Lindvall, O. (2003). Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 127-132.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. and Flier, J. S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: Potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.
- Kotagiri, P., Chance, S. A., Szele, F. G. and Esiri, M. M. (2013). Subventricular Zone Cytoarchitecture Changes in Autism. *Journal of Neurobiology* 15, 25-41.
- Kovacs, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- *c-fos* and beyond. *J Neuroendocrinol* 20, 665-672.
- Kubo, K. Y., Iinuma, M and Chen, H. (2015). Mastication as a stress-coping behavior. *Biomed Res. Int.*, 15, 2-11.
- Kumar, A. and Cugani, H. T. (2017a). The role of radionuclide imaging in Epilepsy, part 1: Sporadic temporal and extratemporal lobe epilepsy. *J. Nucl. Med. Technol.* 45, 14-21.
- Kumar, A. and Cugani, H. T. (2017b). The role of radionuclide imaging in Epilepsy, part 2: Epilepsy Syndromes. *J. Nucl. Med. Technol.* 45, 22-29.
- Kuniishi, H., Ichisaka, S., Yamamoto, M., Ikubo, N., Matsuda, S., Futora, E., Harada, R., Ishihara, K. and Hata, Y. (2017). Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. *Neuroscience Research* (in press).
- Kwon, J. and Pierson, M. (1997). Fos-immunoreactive responses in inferior colliculi of rats with experimental audiogenic seizure susceptibility. *Epilepsy Research* 27, 89-99.
- L**
- LaBar, K. S., LeDoux, J. E., Spencer, D. D. and Phelps, E. A. (1995). Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci.* 15, 6846-6855.
- Labate, A., Mumoli, L., Fratto, A., Quattrone, A. and Gambardella, A. (2013). Hippocampal sclerosis worsens autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) phenotype related to CHRN2 mutation. *Eur. J. Neurol.* 20 (3), 591-593.
- Lalonde, R. and Strazielle, C. (2008). Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice. *Journal of Neuroscience Methods* 171, 48-52.
- Lalonde, R. and Strazielle, C. (2009). The relation between open-field and emergence tests in a

- hyperactive mouse model. *Neuropharmacology* 57, 722-724.
- Langberg, T., Dashek, R., Mulvey, B., Miller, K. A., Osting, S., Stafstrom, C. E. and Sutula, T. P. (2016). Distinct behavioral phenotypes in novel “fast” kindling-susceptible and “slow” kindling-resistant rat strains selected by stimulation of the hippocampal perforant path. *Neurobiol. Dis.* 85, 122-129.
- Lapiz, M. D. and Morilak, D. A. (2005). Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience* 137(3), 1039-1049.
- Larsen, J., Johannesen, K. M., Ek, J., Tang, S., Marini, C., Blichfeldt, S., Kibaek, M., von Spiczak, S., Weckhuysen, S., Fragu, M., Neubauer, B. A., Uldall, P., Striano, P., Zara, F., Kleiss, R., Simpson, M., Muhle, H., Nikanorova, M., Jepsen, B., Tommerup, N., Stephani, U., Gerrini, R., Duno, M., Hjalgrim, H., Pal, D., Helbig, I. and Moller, R. S. (2015). The role of SLC2A1 mutations in myoclonic astatic epilepsy and absence epilepsy, and the estimated frequency of GLUT1 deficiency syndrome. *Epilepsia* 56 (12), 203-208.
- Law, N., Kerr, E. and Smith, M. L. (2015). Evaluation of behavioral outcomes in children 1 year after epilepsy surgery. *Epilepsia* 56 (10), 1605-1614.
- Le Gal La Salle, G. and Naquet, R. (1990). Audiogenic seizures evoked in DBA/2 mice induce *c-fos* oncogene expression into subcortical auditory nuclei. *Brain Res.* 518, 308-312.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y. and Lengacher, S. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443-450.
- Lehn, H., Steffenach, H. A., van Strien, N. M., Veltman, D. J., Witter, M. P. and Haberg, A. K. (2009). A specific role of the human hippocampus in recall of temporal sequences. *J. Neurosci.* 29, 3475-3484.
- Levin M. (1950). The pathogenesis of narcoleptic and epileptic seizures occurring under acute emotional stress. *J Nerv Ment Dis* 111(2), 101-108.
- Levira, F., Thurman, D. J., Sander, J. W., Hauser, W. A., Hesdorffer, D. C., Hasanja, H., Odermatt, P., Logroscino, G. and Newton, C. R. (2017). Premature mortality of epilepsy in low- and middle-income countries: A systematic review from the mortality Task force of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 58, 6-16.

- Levite, M. (2014). Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GluR3 antibodies, anti-NMDA-NR1 antibodies, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGluR1 antibodies or anti-mGluR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy, encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. These autoimmune anti-glutamate receptor antibodies can bind neurons in few brain regions, activate glutamate receptors, decrease glutamate receptor's expression, impair glutamate-induced signaling and function, activate blood brain barrier endothelial cells, kill neurons, damage the brain, induce behavioral/psychiatric/cognitive abnormalities and ataxia in animal models, and can be removed or silenced in some patients by immunotherapy. *J Neural Transm.*, 121, 1029-1075.
- Li, B., Tang, F., Wang, L., Liu, L., Zhao, J., Zhou, Y., Wang, Y., Song, Y., Li, Y. and Cui, R. (2013). Anticonvulsivant effects of Fuzi total alkaloid on Pentylentetrazole-induced seizure in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 123, 195-198.
- Lightfoot, J. T., Leamy, L., Pomp, D., Turner, M. J., Fodor, A. A., Knab, A., Bowen, R. S., Ferguson, D., Moore-Harrison, T. and Hamilton, A. (2010). Strain screen and haplotype association mapping of Wheel running in inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 109, 623-634.
- Lima, R. R., Santana, L. N. S., Fernandes, R. M., Nascimento, E. M., Oliveira, A. C. A., Fernandes, L. M. P., dos Santos, E. M. N., Tavares, P. A. N., dos Santos, I. R., Gimaraes-Santos, A. and Gomes-Leal, W. (2016). Neurodegeneration and glial response after acute striatal stroke: histological basis for neuroprotective studies. *Oxidative medicine and cellular longevity* 1-16.
- Liu, B. and Qian, S-B. (2014). Translational reprogramming in cellular stress response. *WIREs RNA* 5, 301-315.
- Liu, G., Wang, J., Deng, X-H., Ma, P-S., Li, F-M., Peng, X-D., Niu, Y., Sun, T., Li, Y-X. and Yu, J-Q. (2017). The anticonvulsivant and neuroprotective effects of oxysophocarpine on pilocarpine-induced convulsions in adult male mice. *REV*
- Liu, R. S., Lemieux, L., Bell, G. S., Hammers, A., Sisodiya, S. M., Bartlett, P. A., Shorvon, S. D., Sander, J. W. and Duncan, J. S. (2003). Progressive neocortical damage in epilepsy. *Ann Neurol.* 53, 312-324.
- Liu Y. C., Lee, J. W., Bellows, S. T., Damiano, J. A., Mullen, S. A., Berkovic, S. F., Bahlo, M.,

- Scheffer, I. E. and Hildebrand, M. S. (2016). Evaluation of non-coding variation in GLUT1 deficiency. *Dev. Med. Child. Neurol.* 58 (12), 1295-1302.
- Loonen, A. J. M. and Ivanova, S. A. (2016). Circuits regulating pleasure and happiness – Mechanisms of depression. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, 159-168.
- López-López, D. (2016). Transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el hámster GASH:Sal. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- López-López, D., Gómez-Nieto, R., Herrero-Turrión, M. J., García-Cairasco, N., Sánchez-Benito, D., Ludeña, M. D. and López D. E. (2016). Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior (Article in press)*, 1-12.
- Löscher, W. and Ebert, U. (1996). The role of the piriform cortex in kindling. *Progress in Neurobiology* 50, 427-481.
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20, 359-368.
- Losito, E., Battaglia, D., Chieffo, D., Raponi, M., Ranalli, D., Contaldo, I., Giansanti, C., De Clemente, V., Quintiliani, M., Antichi, E., Verdolotti, T., de Waure, C., Tartaglione, T., Mercuri, E. and Guzzetta, F. (2015). Sleep-potentiated epileptiform activity in early thalamic injuries: study in a large series (60 cases). *Epilepsy Res.* 109, 90-99.
- Loss, C. M., Córdova, S. D. and de Oliveira, D. L. (2012). Ketamine reduces neuronal degeneration and anxiety levels when administered during early life-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.*, 1474, 110-117.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L. and Grzanna, R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18 (2), 307- 319.
- Lüders, H., Archarya, J., Baumgartner, C., Benbadis, S., Bleasel, A., Burgess, R., Dinner, D. S., Ebner, A., Foldvary, N., Geller, E., Hamer, H., Holthausen, H., Kotagal, P., Morris, H., Meencke, H. J., Noachtar, S., Rosenow, F., Sakamoto, A., Steinhoff, B. J., Tuxhorn, I. and Wyllie, E. (1998). Semiological seizure classification. *Epilepsia* 39, 1006-1013.
- Lumani, A. and Zhang, H. (2010). Responses of neurons in the rat's dorsal cortex of the inferior colliculus to monaural tone bursts. *Brain Res.* 1351, 115-129.

M

- Ma, J. and Leung, L. S. (2016). Dual effects of limbic seizures on psychosis-relevant behaviors shown by nucleus accumbens kindling in rats. *Brain Stimul.* 9 (5), 762-769.
- Maia, G. H., Quesado, J. L., Soares, J. I., do Carmo, J. M., Andrade, P. A., Andrade, J. P. and Lukyanov, N. V. (2014). Loss of hippocampal neurons after kainite treatment correlates with behavioral deficits. *PLoS One* 9, 1-11.
- Magalhaes, L. H. M., García-Cairasco, N., Massenisini, A. R., Doretto, M. C. and Moraes, M. F. D. (2004). Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock. *Neuroscience Letters* 369, 19-23.
- Malmierca, M. S., Cristaudo, S., Perez-Gonzalez, D. and Covey, E. (2009). Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the anesthetized rat. *J. Neurosci.* 29(17), 5483-5493.
- Martínez, L. A., Levy, M. J. and Petrulis, A. (2013). Endogenous oxytocin is necessary for preferential Fos expression to male odors in the bed nucleus of the stria terminalis in female Syrian hamsters. *Horm Behav.* 64(4), 2-27.
- Masa González, R. (2016). Estudio de receptores cannabinoides en el modelo de epilepsia GASH:Sal.(Trabajo Fin de Máster). Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca.
- Mason, S. T. and Fibiger, H. C. (1979). Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 187(4), 703-724.
- Matsuda, S., Peng, H., Yoshimura, H., Wen, T. C., Fukuda, T. and Sakanaka, M. (1996). Persistent *c-fos* expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neuroscience Research* 26, 157-170.
- Matsuda, T., Murao, N., Katano, Y., Juliandi, B., Kohyama, J., Akira, S., Kawai, T. and Nakashima, K. (2015). TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Commun.* 6, 6514.
- MCCAsrthy, M. M. and Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat. Neurosci.* 14(6), 677-683.
- McCown, T. J., Greenwood, R. S. and Breesc, G. R. (1987). Inferior collicular interactions with limbic seizure activity. *Kpilepsici.* 28, 234-241.

- McCown, T. J. Duncan, G. E., Johnson, K. B. and Breese, G. R. (1995). Metabolic and functional mapping of the neural network subserving inferior collicular seizure generalization. *Brain Research* 701, 117-128.
- McIntyre, D. C. and Racine, R. J. (1986). Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Prog Neurobiology* 27, 1-12.
- McIntyre, D. C. and Gilby, K. L. (2009). Kindling as a model of human epilepsy. *Can J Neurol Sci.* 36 (2), 33–45.
- McNaughton, L. A. and Hunt, S. P. (1992). Regulation of gene expression in astrocytes by excitatory amino acids. *Mol. Brain Res.* 12, 215-223.
- Medel-Matus, J-S., Reynolds, A., Shin, D., Sankar, R. and Mazarati, A. (2017). Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal Toll-like receptors 2. *Epilepsia* 1-5.
- Mercadé Cerdá, J. M., Mauri Llerda, J. A. y López González, F. J. (2012). Métodos diagnósticos en epilepsia. *Guía oficial de práctica clínica en epilepsia. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología.*
- Merrill, M. A., Clough, R. W., Jobe P. C. and Browning, R. A. (2003). Role of the superior colliculus and the intercollicular nucleus in the brainstem seizure circuitry of the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsia* 44(3), 305-314.
- Miendlarzewska, E. A., Bavelier, D. and Schwartz, S. (2016). Influence of reward motivation on human declarative memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 61, 156-176.
- Mlsna, L. M. and Koh, S. (2013). Maturation-dependent behavioral deficits and cell injury in developing animals during the subacute postictal period. *Epilepsy Behav.* 29, 190-197.
- Mohr, M. A. and Sisk, C. L. (2013). Pubertally born neurons and glia are functionally integrated into limbic and hypothalamic circuits of the male Syrian hamster. *PNAS* 110 (12), 4792-4797.
- Moreno-Castilla, P., Pérez-Ortega, R., Violante-Soria, V., Balderas, I. and Bermudez-Rattoni, F. (2017). Hippocampal release of topamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus* 27, 547-557.
- Morgan, J. I. and Curran, T. (1989). Calcium and proto-oncogene involvement in the immediate-early response in the nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 568, 283-288.
- Morgenstern, N. A., Lombardi, G. and Schinder, A. F. (2008). Newborn granule cells in the ageing

dentate gyrus. *J. Physiol* 586, 3751-3757.

Motaghinejad, M., Motevalian, M. and Shabab, B. (2016). Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. *Neurosci. Lett.*, 619, 106-113.

Mousavi, S., Chatterji, S., Verdes, E., Tandon, A., Patel, V. and Ustun, B. (2007). Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet* 370, 851-858.

Mouton, L. J. and Holstege, G. (1994). The periaqueductal gray in the cat projects to lamina VIII and the medial part of lamina VII throughout the length of the spinal cord. *Exp. Brain Res.* 101 (2), 253-264.

Mullen, R.J., Buck, C.R. and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.

Muñoz de la Pascua, L. J. (2004). Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiogénicas. (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca.

Muñoz de la Pascua, L. J., Ludeña, D., Gedvilaite, A., Zvirbliene, A., Jandrig, B., Voronkova, T., Ulrich, R. G. and López, D. E. (2013). Lymphoma outbreak in a GASH:Sal hamster colony. *Arch. Virol.* 158, 2255-2265.

Muñoz, L. J., Carballosa-Cautam M. M., Yanowsky, K., García-Atarés, N. and López, D. E. (2017). The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behavior* 71, 181-192.

Myhrer, T., Nguyen, N. H. T., Enger, S. and Aas, P. (2006). Anticonvulsant effects of GABA_A modulators microinfused into area tempest or substantia nigra in rats exposed to soman. *Arch Toxicol.* 80, 502-507.

N

Nácher Carda, V. (1995). La microglia y su función inmunitaria en el sistema nervioso.

Nagai, T., Satoh, K., Imamoto, K. and Maeda, T. (1981). Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosci. Lett.* 23(2), 117-123.

Nakajima, T., Daval, J. L., Gleiter, C. H., Deckert, J., Post, R. M. and Marangos, P. J. (1989). *C-fos*

- mRNA expression following electrical-induced seizure and acute nociceptive stress in mouse brain. *Epilepsy Res.* 4 (2), 156-159.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron–astrocyte communication. *Neuron* 57, 883-893.
- N’Gouemo, P. and Faingold, C. L. (1998). Periaqueductal gray neurons exhibit increased responsiveness associated with audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience* 84 (2), 619-625.
- Nieto Barrera, M., Nieto Jiménez, M. y Nieto Jiménez, E. (2008). Epilepsias y síndromes epilépticos del preescolar y del escolar. *Protocolos de diagnóstico terapéuticos en la AEP. Neurología Pediátrica*, 28-38.
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J. and van Huijzen, C. (1988). The human central nervous system. Dpringer Verlag, New York.
- Nogueira, G. S., Santos, L. E. C., Rodrigues, A. M., Scorza, C. A., Scorza, F. A., Cavalheiro, E. A. and Almeida, A. C. G. (2015). Enhanced nonsynaptic epilepticform activity in the dentate gyrus after kainate-induced status epilepticus. *Neuroscience* 303, 59-72.
- Nomaru, H., Sakumi, K., Katogi, A., Ohnishi, Y. N., Kajitani, K., Tsuchimoto, D., Nestler, E. J. and Nakabeppu, Y. (2014). Fosb gene products contribute to excitotoxic microglial activation by regulating the expression of complement C5a receptors in microglia. *Glia* 62 (8), 1284-1298.
- Novakova, B., Harris, P. R. and Reuber, M. (2017). Diurnal patterns and relationships between physiological and self-reported stress in patients with epilepsy and psychogenic non-epilepsy seizures. *Epilepsy & Behavior* 70, 204-211.
- O**
- O’Callaghan, J. P. and Sriram, K. (2005). Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Review Ashley Publications* 37, 433-442.
- Ohdo, S., Yoshimura, H. and Ogawa, N. (1989). Alteration in hypnotic effect of pentobarbital following repeated agonistic confrontations in mice. *Psychopharmacology* 97, 30-34.
- O’Neill D. (1958). Stress and epilepsy. *Med World* 89(5), 425-428.
- O’Neil, E. B., Newsome, R. N., Li, I. H. N., Thavabalasingam, S., Ito, R. and Lee, A. C. H. (2015). Examining the role of the Human hippocampus in approach-avoidance decision making using a

novel conflict paradigm and multivariate functional magnetic resonance imaging. *The journal of neuroscience* 35 (45), 15039-15049.

Ottenweller, J. E., Tapp, W. N., Burke, J. M. and Natelson, B. J. (1985). Plasma cortisol and corticosterone concentrations in the golden hamster. *Life Sciences* 37, 1551-1558.

P

Pacanaro Oliveira, C. P. (2013). *Avaliação dos parâmetros ematológicos, bioquímicos e parasitológicos deocorrentes da infecção por Ancylostoma ceylanicum em hamsters (Mesocricetus auratus) submetidos à dieta hipoprotéica*. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas

Palmer, A. A., Printz, M. P. (1998). Attenuation of Fos expression to airpuff startle stimuli following tympanic membrane rupture. *Brain Res.* 787(1), 91-98.

Panday, D. R. and Rauniar, G. P. (2016). Effect of root-extracts of Ficus benghalensis (Banyan) in memory, anxiety, muscle coordination and seizure in animal models. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 429-443.

Paredes, M. F., Sorrells, S. F., García-Verdigu, J. M. and Alva-Buylla, A. (2016). Brain Size and Limits to Adult Neurogenesis. *J Comp Neurol.* 524 (3), 646-664.

Parekh, M. B., Carney, P. R., Sepulveda, H., Norman, W., King, M. and Mareci, T. H. (2010). Early MR diffusion and relaxation changes in the parahippocampal gyrus precede the onset of spontaneous seizures in an animal model of chronic limbic epilepsy. *Exp. Neurol.* 224, 258–270.

Parent, J. M. and Lowenstein, D. H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog. Brain Res.* 135, 121-131.

Pearce, P. S., Wu, Y., Rapuano, A., Kelly, K. M., de Lanerolle, N. and Pan, J. W. (2016). Metabolic injury in a variable rat model of post-status epilepticus. *Epilepsia* 57 (12), 1978-1986.

Pedersen, B. and Dam, M. (1986). Memory disturbances in epileptic patients. *Acta Neurol Scand Suppl.* 109, 11-14.

Pekny, M., Wilhelmsson, U. and Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters* 565, 30-38.

Perales Romero, S. (2005). *Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo*.

- (Tesis Doctoral). Universidad de Granada.
- Perea, G., Navarrete M. y Araque A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends neurosci.* 32, 421-431.
- Pereira Pinto, H. P., Carvalho, V. R., de Csatro Medeiros, D., Santos Almeida, A. F., Andrade Marçal Mendes, E. M. and Moraes, M. F. D. (2017). Auditory processing assessment suggests that Wistar Audiogenic Rat neural networks are prone to entrainment. *Neuroscience* 347, 48-56.
- Piatti, V. C. (2009). *Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Pierson, M. and Liebmann, S. L. (1992). Noise exposure-induced audiogenic seizure susceptibility in Sprague-Dawley rats. *Epilepsy Res.* 13(1), 35-42.
- Pierson, M. and Snyder-Keller, A. (1992). NMDA receptor-dependent epileptogenesis in developing inferior colliculus. *Molecular Neurobiology of Epilepsy* 9, 371-383.
- Pinel, J. P. J. and Rovner, L. I. (1978). Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. *Experimental Neurology* 58 (2), 190-202.
- Pla Ferrer, D. (2010). *Identificación y caracterización funcional de la interacción entre el proto-oncogen c-fos y la proteína centrosomal CEP2/C-NAPI*. Tesis Doctoral, Valencia.
- Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V. and Sierra, A. (2017). Autophagy and microglia: novel partners in neurodegeneration and aging. *International journal of molecular sciences* 18, 598-628.
- Prendergast, B. J., Stevenson, T. J. and Zucker, I. (2013). Sex differences in Siberian hamster ultradian locomotor rhythms. *Physiol. Behav.* 17, 206-212.
- Prieto-Martín, A. I., Llorens, S., Pardal-Fernandez, J. M., Muñoz, L., López, D. E., Escribano, J., Nava, E., De Cabo, C. (2012). Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sciences* 90, 531-537.
- Prieto-Martín, A. I., Llorens, S., Pardal-Fernandez, J. M., Muñoz, L. J., López, D. E., Escribano, J. and de Cabo, C. (2017). Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains. *Epilepsy Behav.* 71, 218-225.
- Prinz, M., Emy, D. and Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature immunology* 18 (4), 385-392.
- Prouy, E. W., Waterhouse, B. D. and Chandler, D. J. (2017). Corticotropin releasing factor dose-

independently modulates excitatory synaptic transmission in the noradrenergic nucleus locus coeruleus. *European Journal of Neuroscience* 45, 712-722.

Prut, L. and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463, 3-33.

Q

Quansah, H. and N'Gouemo, P. (2014). Amiloride and SN-6 suppress audiogenic seizure susceptibility in genetically epilepsy-prone rats. *CNS Neurosci. Ther.* 20 (9), 860-866.

Quincozes-Santos, A. Bobermin, L. D., Tramontina, A. C., Wartchow, K. M., Taqliari, B., Souza, D. O., Wyse, A. T. and Gonçalves, C. A. (2014). Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol In Vitro*, 28 (4), 544-551.

R

Raisinghani, M. and Faingold, C. L. (2003). Identification of the requisite brain sites in the neuronal network subserving generalized clonic audiogenic seizures. *Brain Res.* 967, 113-122.

Raisinghani, M. and Faingold, C. L. (2005a). Neurons in the amygdale play an important role in the neuronal network mediating a clonic form of audiogenic seizures both before and after audiogenic kindling. *Brain Res.* 1032, 131-140.

Raisinghani, M. and Faingold, C. L. (2005b). Evidence for the perirhinal cortex as a requisite component in the seizure network following seizure repetition in an inherited form of generalized clonic seizures. *Brain Res.* 1048, 193-201.

Raisinghani, M. and Faingold, C. L. (2005c). Pontine reticular formation neurons are implicated in the neuronal network for generalized clonic seizures wich is intensified by audiogenic kindling. *Brain Res.* 1064, 90-97.

Ramón y Cajal, S. R. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. London, Oxford University Press.

Ramos-Morales, F. R., Correa-Basurto, J., Saavedra-Vélez, M., Acosta-Hernández, M. E., Gasca-Pérez, E., Pérez-Palacios, A. y Trujillo-Ferrara, J. (2012). Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante. *Arch Neurocienc.* 17 (1), 45-48.

- Ragona, F., Matricardi, S., Castellotti, B., Patrini, M., Freri, E., Binelli, S. and Granata, T. (2014). Refractory absence epilepsy and GLUT1 deficiency syndrome: a new case report and literature review. *Neuropediatrics* 45 (5), 328-332.
- Reif, P. S., Tsai, M. H., Helbig, I., Rosenow, F. and Klein, K. M. (2017). Precision medicine in genetic epilepsies: break of dawn? *Expert Rev Neurother.* 17 (4), 381-392.
- Reilly, C., Atkinson, P., Das, K. B., Chin, R. F., Aylett, S. E., Burch, V., Gillberg, C., Scott, R. C. and Neville, B. G. (2015). Cognition in school-aged children with “active” epilepsy: A population-based study. *J. Clin Exp. Neuropsychol.* 37 (4), 429-438.
- Rendon, N. M., Rudolph, L. M., Sengelaub, D. R. and Demas, G. E. (2015). The agonistic adrenal: melatonin elicits female aggression via regulation of adrenal androgens. *Proc Biol Sci.* 282, 1-9.
- Reser, J. E. (2016). Chronic stress, cortical plasticity and neuroecology. *Behav. Processes*, 129, 105-115.
- Respondek, M. and Buszman, E. (2015). Regulation of neurogenesis: factors affecting of new neurons formation in adult mammals brain. *Postepy Hig Med Dosw* 69, 1451-1461.
- Reyes-Haro, D., Bulavina, L. y Pivneva, T. (2014). La glía, el pegamento de las ideas. *Ciencia. Comunicaciones libres.*
- Riaz, A. and Faingold, C. L. (1994). Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into the inferior colliculus and pontine reticular formation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18 (6), 1456-1462.
- Ribak, C. E., Byun, M. Y., Ruiz, G. T. and Reiffenstein, R. J. (1988). Increased levels of amino acid neurotransmitters in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res.* 2, 9-13.
- Ribak, C. E., Khurana, V. and Lien, N. T. (1994). The effect of midbrain collicular knife cuts on audiogenic seizure severity in the genetically epilepsy-prone rat. *J. Hirnforsch.* 35 (2), 303-311.
- Rigoulot, M-A., Boehrer, A. and Nehlig, A. (2003). Effects of Topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the Audiogenic Wistar AS. *Epilepsia*, 44 (1), 14-19.
- Roberts, A. J. and Keith, L. D. (1994). Sensitivity of the circadian rhythm of kainic acid-induced convulsions susceptibility to manipulations of corticosterone levels and mineralocorticoid receptor

binding. *Neuropharmacology* 33(9), 1087-1093.

Rodríguez Contreras, A. (2011). Tómese un respiro: las células gliales ayudan a la función cerebral. *Revista Digital Universitaria* 12 (3).

Ronken, E., Van Muiswinkel, F. L., Mulder, A. H. and Schoffemeer, A. N. (1993). Opioid receptor-mediated inhibition of evoked catecholamine release from cultured neurons of rat ventral mesencephalon and locus coeruleus. *Eur J. Pharmacol.* 230 (3), 349-355.

Ronkina, N., Menon, M. B., Schwermann, J., Arthur, J. S. C., Legault, H., Telliez, J. B., Kayyali, U. S., Nebreda, A. R., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (2011). Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP Kinases in transcriptional activation of immediate early genes. *Nucleic Acids Research* 39, 2503-2518.

Rossetti, F., Rodrigues, M. C. A., Oliveira, J. A. C., and Garcia-Cairasco, N. (2006). EEG wavelet analyses of the striatum -substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar Audiogenic Rats (WAR strain). *Epilepsy Res.* 72 (2), 192-208.

Rossetti, F., Rodrigues, M. C., Marroni, S. S., Fernandes, A., Foresti, M. L., Romcy-Pereira, R. N., de Araújo, D. B. and García-Cairasco, N. (2012). Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Eistar audiogenic rat (WAR) strain II: an EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. *Epilepsy Behav.* 24 (4), 391-398.

S

Salari, A-A., Bakhtiari, A. and Homberg, J. R. (2015). Activation of GABA-A receptors during postnatal brain development increases anxiety-and depression-related behaviors in a time-and dose-dependent manner in adult mice. *European Neuropsychopharmacology* 25 (8), 1260-1274.

Salari, A-A., Fatehi, L., Motayaghani, N. and Homberg, J. R. (2016). Fluoxetine normalizes the effects of prenatal maternal stress on depression-and anxiety-like behaviors in mouse dams and male offspring. *Behavioural Brain Research*. Accepted manuscript.

Sahay, A. and Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience* 10, 1110-1115.

Sato, K. (2015). Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia* 63, 1394-1405.

- Sambucetti, L. C. and Curran, T. (1986). The fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* 234, 1417-1419.
- Samineni, V. K., Premkumar, L. S., Faingold, C. L. (2010). Post-ictal analgesia in genetically epilepsy-prone rats involves cannabinoid receptors in the periaqueductal gray. *Soc. Neurosci. Abst.* 35, 779-781.
- Sampaio, N., Maua, D., Vasquez, B. and Schenber, G. (2012). Role of pulmonary stretch receptors and sympathetic system in the inhibition of reflex bradycardia produced by chemical stimulation of the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 210, 222–233.
- Samseishvili, N. T., Bilanishvili, I. G., Bekaia, G. S., Tkeshelashvili, B. D. and Nanobashvili, Z. I. (2006). Peculiarities of development of rat's audiogenic convulsive responses in period of gestation. *Georgian Med News*, 136, 129-132.
- Sánchez-Benito, D., Gómez-Nieto, R., Hernández-Noriega, S., Murashima, A. A. B., de Oliveira, J. A. C., García-Cairasco, N., López, D. E. and Hyppolito, M. A. (2017). Morphofunctional alterations in the olivocochlear efferent system of the genetic audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Epilepsy Behav.* 71, 193-206.
- Saper, C. B. (1990). "Hypothalamus". Paxinos, *The Human Nervous System*, Academic Press, San Diego, 389-413.
- Sasaki, K. and Yoshizaki, F. (2015). Investigation into hippocampal nerve cell damage through the mineralocorticoid receptor in mice. *Molecular medicine reports*, 12, 7211-7220.
- Savic, I. and Engel, J. Jr. (2014). Structural and functional correlates of epileptogenesis— does gender matter? *Neurobiol Dis* 70, 69-73.
- Scarlatelli-Lima, A. V., Magalhaes, L. H. M., Doretto, M. C. and Moraes, M. F. D. (2003). Assessment of the seizure susceptibility of wistar audiogenic rat to electroshock, pentylentetrazole and pilocarpine. *Brain Research* 960, 184-189.
- Scholl, E. A., Dudek, F. E. and Ekstrand, J. J. (2013). Neuronal degeneration is observed in multiple regions outside the hippocampus after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in the immature rat. *Neuroscience* 252, 45-59.
- Scotti, M. L., Rendon, N. M., Greives, T. J., Romeo, R. D. and Demas, G. E. (2015). Short-day aggression is independent of changes in cortisol or glucocorticoid receptors in male Siberian

- hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Exp. Zool.* 323, 331-342.
- Scoville, W. B. and Milner, B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103-113.
- Semenenka, L., Lumb, A. and Lovick, C. (1994). Projections from nucleus raphe obscurus to the periaqueductal grey matter in the rat. *Neuroscience Letters* 170, 9-12.
- Serikawa, T., Mashimo, T., Kuramoto, T., Voigt, B., Ohno, Y. and Sasa, M. (2015). Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp. Anim.* 64, 1-7.
- Sharma, P., Wright, D. K., Johnston, L. A., Powell, K. L., Wlodek, M. E., Shultz, S. R., O'Brien, T. J. and Gilby, K. L. (2017). Differences in white matter structure between seizure prone (FAST) and seizure resistant (SLOW) rat strains. *Neurobiology of Disease* 104, 33-40.
- Shen, H. Y., van Vliet, E. A., Bright, K. A., Hanthorn, M., Lytle, N. K., Gorter, J., Aronica, E. and Boison, D. (2015). Glycine transporter 1 is a target for the treatment of epilepsy. *Neuropharmacology* 99, 554–565.
- Shetty, A. K. and Upadhyya, D. (2016). GABA-ergic cell therapy for epilepsy: advances, limitations and challenges. *Neurosci Biobehav. Rev.* 62, 35-47.
- Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M. and Marescaux, C. (1994). *C-fos* expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 175, 58-62.
- Singh, P., Singh D. and Goel, R. K. (2015). Protective effect on phenytoin-induced cognition deficit in pentylenetetrazol kindled mice: a repertoire of *Glycyrrhiza glabra* flavonoid antioxidants. *Pharmaceutical Biology*, 54 (7), 256-267.
- Sirera, R., Sánchez, P. T. y Camps, C. (2006). Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Psicooncología*, 3, 35-48.
- Smeland, O. B., Hadera, M. G., McDonald, T. S., Sonnewald, U. and Borges, K. (2013). Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33(7), 1090–1097.
- Smith, A. M., Gibbons, H. M., Oldfield, R. L., Bergin, P. M., Mee, E. W., Curtis, M. A., Faull, R. L. M. and Dragunow, M. (2013). M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *Journal of Neuroinflammation* 10, 2-15.

- Smith-Swintosky, V. L., Pettigrew, L. C., Sapolsky, R. M., Phares, C., Craddock, S. D., Brooke, S. M., et al. (1996). Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16(4), 585-598.
- Sng, J. C., Taniura, H. and Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull.* 27, 606-612.
- Snyder-Keller, A. M. and Pierson, M. G. (1992). Audiogenic seizures induce *c-fos* in a model of developmental epilepsy. *Neurosci. Lett.* 135, 108-112.
- Soares Santos, A. R. and Schneider Oliveira, M. (2016). Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy & Behavior* 62, 27-34.
- Socala, K., Nieoczym, D., Kowalczyk-Vasilev, E., Wyska, E. and Wlaz, P. (2017). Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 326, 43-53.
- Solomon, M. B., Karom, M. C. and Huhman, K. L. (2007). Sex and estrous cycle differences in the display of conditioned defeat in Syrian hamsters. *Horm Behav* 52, 211-219.
- Sonnenberg, J. L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P. F., Hempstead, J., Morgan, J. I. and Curran, T. (1989). Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research* 24, 72-80.
- Steinhauser, C., and Seifert, G. (2002). Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 227-237.
- Steinhäuser, C., Seifert, G. and Bedner, P. (2012). Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K⁺ channels and gap junction coupling. *Glia* 60 (8), 1192-1202.
- Stevens, J. R. (1959). Emotional activation of the electroencephalogram in patients with convulsive disorders. *J Nerv Ment Dis* 128(4), 339-351.
- Steward, O., Torre, E. R., Tomasulo, R. and Lothman, E. (1992). Seizures and the regulation of astroglial gene expression. *Epilepsy Res Suppl.* 7, 197-209.
- Suárez Pereira, I. (2015). *Papel de la neurogénesis hipocámpal adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Suleymanova, E. M., Gulyaev, M. V. and Abbasova, K. R. (2016). Structural alterations in the rat brain and behavioral impairment after status epilepticus: and MRI Study. *Neuroscience* 315, 79-90.

- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J. and Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3), 165-186.
- Szyndler, J., Maciejak, P., Turzynska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., Taracha, E., Walkowiak, J., Skórzewska, A., Wisłowska-Stanek, A., Hamed, A., Bidzinski, A. and Ptaznik, A. (2008). Changes in the concentration of amino acids in the hippocampus of pentylentetrazole-kindled rats. *Neuroscience Lett* 439, 245-249.
- Szyndler, J., Maciejak, P., Turzynska, D., Sobolewska, A., Taracha, E., Skórzewska, A., Lehner, M., Bidzinski, A., Hamed, A., Wisłowska-Stanek, A., Krzascik, P. and Ptaznik, A. (2009). Mapping of *c-fos* expression in the rat brain during the evolution of pentylentetrazol-kindled seizures. *Epilepsy and Behavior* 16, 216-224.
- T**
- Tabatadze, N., Huang, G., May, R. M., Jain, A. and Woolley, C. S. (2015). Sex differences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 35 (32), 252-265.
- Taiwe, G. S., Tchoya, T. B., Menanga, J. R., Dabole, B. and De Waard, M. (2016). Anticonvulsivant activity of an active fraction extracted from *Crinus Jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology* 194, 421-433.
- Tan, Z. J., Ju, S. H., Huang, X., Gu, Y. K. and Su, Z. D. (2017). Glial cells function as neural stem cells and progenitor cells. *Sheng Li Xue Bao* 69 (2), 207-217.
- Tang, F-R., and Lee, W-L. (2001). Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Neurocytol.* 30, 137-143.
- Tauber, S. C., Harms, K., Falkenburger, B., Weis, J., Selhaus, B., Nau, R., Schulz, J. B. and Reich, A. (2014). Modulation of hippocampal neuroplasticity by Fas/CD95 regulatory protein 2 (Faim2) in the course of bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp neurol.* 73, 2-13.
- Temkin, N. R., Dikmen, S. S., Anderson, G. D., Wilensky, A. J., Holmes, M. D., Cohen, W., Newell, D. W., Nelson, P., Awan, A. and Winn, H. R. (1999). Valproate therapy for prevention of posttraumatic seizures: a randomized trial. *J Neurosurg.* 91(4), 593–600.

- Terranova, J. I., Song, Z., Larkin, T. E., Hardcastle, N., Norvelle, A., Riaz, A. and Albers, H. E. (2016). Serotonin and arginine-vasopressin mediate sex differences in the regulation of dominance and aggression by the social brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 46, 233-238.
- Theodore, W. H. (2017). Presurgical Focus Localization in Epilepsy: PET and SPECT. *Semin. Nucl. Med.* 47, 44-53.
- Tian, G. F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q., Peng, W., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N., Wang, X., Zielke, H. R., Kang, J., and Nedergaard, M. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11, 973-981.
- Titiz, A. S., Mahoney, J. M., Testorf, M. E., Holmes, G. L. and Scott, R. C. (2014). Cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: role of online and offline processing of single cell information. *Hippocampus* 24, 1129-1145.
- Toledo, M., Sarria-Estrada, S., Quintana, M., Maldonado, X., Martinez-Ricarte, F., Rodon, J., Auger, C., Aizpurua, M., Salas-Puig, J., Santamarina, E. and Martinez-Saez, E. (2017). Epileptic features and survival in glioblastomas presenting with seizures. *Epilepsy Research* 130, 1-6.
- Toyoda, I., Fujita, S., Thamattoor, A. K. and Buchmaster, P. S. (2015). Unit activity of hippocampal interneurons before spontaneous seizures in an animal model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 35 (16), 6600-6618.
- Tripathi, P. P, Giovannantonio, L. G., Sanguinetti, E., Acampora, D., Allegra, M., Caleo, M., Wurst, W. Simeone, A. and Bozzi, Y. (2014). Increased dopaminergic innervation in the brain of conditional mutant mice overexpressing OTX2: effects on locomotor behavior and seizure susceptibility. *Neuroscience*, 261, 173-183.
- Tronel, C., Largeu, B., Santiago Ribeiro, M. J., Guilloteau, D., Dupont, A-C and Arlicot, N. (2017). Molecular Targets for PET imaging of activated microglia: the current situation and future expectations. *International journal of molecular sciences* 18, 802-824.
- Tsai, H-L. and Chang S-J. (2015). Key proteins of activating cell death can be predicted through a kainic acid-induced excitotoxic stress. *BioMed Research International*, 35, 1-14.
- Tsutsui, J., Terra, V. C., Oliveira, J. A. and Garcia-Cairasco, N. (1992). Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus: I. Effects of midcollicular knife cuts. *Behav Brain Res.* 52, 7-17.

Tupal, S. and Faingold, C. L. (2011). Audiogenic kindling induces plastic changes in the neuronal firing patterns in periaqueductal gray. *Brain Res.* 1377, 60-66.

Tupal, S. and Faingold, C. L. (2012). The amygdala to periaqueductal gray pathway: plastic changes induced by audiogenic kindling and reversal by gabentin. *Brain Research* 1475, 71-79.

Tzeng, T. T., Tsay, H. J., Chang, L., Hsu, C. L., Lai, T. H., Huang, F. L. and Shiao, Y. J. (2013). Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *J Biomed Sci.* 20, 58-64.

U

Umeoka, E. H. L., Brito García, S., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L. K. and García-Cairasco, N. (2011). Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Research* 1381, 141-147.

V

Valentim, A. M., Di Giminiani, P., Ribeiro, P. O., Rodrigues, P., Olsson, I. A. and Antunes, L. M. (2010). Lower isoflurane concentration affects spatial learning and neurodegeneration in adult mice compared with higher concentrations. *Anesthesiology* 113 (5), 1099-1108.

Valentino, R. J. and Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol.* 583(2-3), 194-203.

Van Bockstaele, E. J., Menko, A. S. and Drolet, G. (2001). Neuroadaptive responses in brainstem noradrenergic nuclei following chronic morphine exposure. *Mol Neurobiol.* 23 (2-3), 155-171.

van Campen, J. S., Jansen, F. E., de Graan, P. N. E., Braun, J. P. J. and Joels, M. (2014). Early life stress in epilepsy: A seizure precipitant and risk factor for epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior* 38, 160-171.

van Campen, J. S., Jansen, F. E., Pet, M. A., Otte, W. M., Hillegers, M. H. J., Joels, M. and Braun, K. P. J. (2015). Relation Between stress-precipitated seizures and the stress response in childhood epilepsy. *A Journal of Neurology* 138, 2234-2248.

van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.

Vandesande, F. and Dierickx, K. (1975). Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell*

Tissue Res. 164, 53-162.

Vegas, O., Fano, E., Brain, P. F., Alonso, A. and Azpiroz, A. (2006). Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: behavioral, neuroendocrine and immunological implications. *Psychoneuroendocrinology* 31, 69-79.

Vinogradova, L. V. and Shatskova, A. B. (2012). Lateral asymmetry of early seizure manifestations in experimental generalized epilepsy. *Neuroscience* 213, 133-143.

Vinogradova, L. V. and van Rijn, C. M. (2015). Long-term disease-modifying effect of the endocannabinoid agonist WIN55,212-2 in a rat model of audiogenic epilepsy. *Pharmacological reports* 67, 501-503.

W

Wada, J. A., Terao, A., White, B. and Jung, E. (1970). Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Exp Neurol.* 28, 326-32.

Walsh, R. N. and Cummins, R. A. (1976). The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482-504.

Wang, P-F., Xu, D-Y., Zhang, Y., Liu, X-B., Xia, Y., Zhou, P-Y., Fu, Q-G. and Xu, S-G. (2017). Deletion of mammalian sterile 20-like kinase 1 attenuates neuronal loss and improves locomotor function in a mouse model of spinal cord trauma. *Mol Cell Biochem.* 431, 11-20.

Wang, Y., Hameed, M. Q., Rakhade, S. N., Iglesias, A. H., Muller, P. A., Mou, D-L. and Rotenberg, A. (2014). Hippocampal immediate early gene transcription in the rat fluid percussion traumatic brain injury model. *Cellular, molecular and developmental neuroscience* 25, 954-959.

Wennström, M., Hellsten, J., Ekstrand, J., Lindgren, H. and Tingström, A. (2006). Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures. *Biol Psychiatry*, 59 (2), 178-186.

White, J. D. and Gall, C. M. (1987). Differential regulation of neuropeptide and proto-oncogene mRNA content in the hippocampus following recurrent seizures. *Mol. Brain Res.* 3, 21-29.

Willot, J. F. and Lu, S. M. (1980). Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Exp. Neurol.* 70, 288-299.

Willoughby, J. O., Mackenzie, L., Medvedev, A. and Hiscock, J. J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: early expression in hippocampus and later widespread expression

correlated with seizure. *Neuroscience* 77 (2), 379-392.

Wilson, R. C., Thomas, V., Lanier, D. L. and Dewsbury, D. A. (1976). Open-field behavior in Muroid rodents. *Behav Biol* 17, 495-506.

Witsch, J., Golkowski, D., Hahn, T. T. G., Petrou, S. and Spors, H. (2015). Cortical alterations in a model for absence epilepsy and febrile seizures: In vivo findings in mice carrying a human GABA (A) R gamma2 subunit mutation. *Neurobiology of Disease* 77, 62-70.

Wolking, S., Becker, F., Bast, T., Wiemer-Kruel, A., Mayer, T., Lerche, H. and Weber, Y. G. (2014). Focal epilepsy in glucose transporter type 1 (Glut1) defects: case reports and a review of literature. *J. Neurol.* 261 (10), 1881-1886.

Wyrofsky, R. R., Reyes, B. A. and Van Bockstaele, E. J. (2017). Co-localization of the cannabinoid type 1 receptor with corticotropin-releasing factor-containing afferents in the noradrenergic nucleus locus coeruleus: implications for the cognitive limb of the stress response. *Brain Struct Funct.* (in press).

Y

Yamaguchi, M., Seki, T., Imayosi, I., Tamamaki, N., Hayashi, Y., Tatebayashi, Y. and Hitoshi, S. (2016). Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J. Physiol Sci.* 66 (3), 197-206.

Yang, M., Ozturk, E., Salzberg, M. R., Rees, S., Morris, M., O'Brien, T. J. and Jones, N. C. (2016). Environmental enrichment delays limbic epileptogenesis and restricts pathologic synaptic plasticity. *Epilepsia* 57 (3), 484-494.

Yang, L., Long, C. and Faingold, C. L. (2001). Audiogenic seizure susceptibility is induced by termination of continuous infusion of gamma-aminobutyric acid or an N-methyl-D-aspartic acid antagonist into the inferior colliculus. *Exp. Neurol.* 171, 147-152.

Ye, M., Bi, Y. F., Ding, L., Zhu, W. W. and Gao, W. (2016). Saikosaponin a functions as anti-epileptic effect in pentylenetetrazol induced rats through inhibiting mTOR signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 81, 281-287.

Yi, F., DeCan, E., Stoll, K., Marceau, E., Deisseroth, K. and Lawrence, J. J. (2015). Muscarinic excitation of parvalbumin-positive interneurons contributes to the severity of pilocarpine-

- induced seizures. *Epilepsia* 56 (2), 297-309.
- Yoshida, I., Akonishi, B., Nagashima, O., Saperc, Y. and Kanosue, B. (2005). Fos activation in hypothalamic neurons during cold or warm exposure: projections to periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 133, 1039-1046.
- Yoshimura, H. and Kimura, N. (1991). Ethopharmacology of copulatory disorder induced by social conflict in male mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 497-500.
- Yu, L. M. Y., Polygalov, D., Wintzer, M. E., Chiang, M-C. and McHugh, T. J. (2016). CA3 synaptic silencing attenuates kainic acid-induced seizures and hippocampal network oscillations. *ENeuro* 3 (1), 1-18.



11. ANEXOS

Anexo 1: Diccionario de comportamientos

Esp	Ing	Cód	Descripción
AF	GRB	001	Autolimpieza frontal
ALD	GRR	002	Autolimpieza lado derecho
ALI	GRL	003	Autolimpieza lado izquierdo
AL	AR	004	Alerta
AGF	GRG	005	Autolimpieza de genitales frontal
AGD	GRGR	006	Autolimpieza de genitales derecha
AGI	GRGL	007	Autolimpieza de genitales izquierda
AP	AP	008	Apnea
BO	YA	009	Bostezar
BT	TC	010	Batir los dientes
BD	BR	011	Bradipnea
RLD	SCRR	012	Rascar lado derecho
RLI	SCRL	013	Rascar lado izquierdo
CG	FR	014	Congelar
OE	SN	015	Oler exploratorio
CM	WA	016	Caminar
CR	RU	017	Correr
CRD	RUR	018	Correr hacia la derecha
CRI	RUL	019	Correr hacia la izquierda
CCG	CCVg	020	Convulsión clónica generalizada
CCP	CCVp	021	Convulsión clónica parcial
CCSA	CCV1	022	Conv. Cl. sincrónicas pata anterior
CCSP	CCV2	023	Conv. Cl. sincrónicas pata posterior
CAAD	CVR1	024	Conv. Cl. asincrónicas pata anterior derecha
CAPD	CVR2	025	Conv. Cl. asincrónicas pata posterior derecha
CAAI	CVL1	026	Conv. Cl. Asincrónicas pata anterior izquierda
CAPI	CVL2	027	Conv. Cl. asincrónicas pata posterior izquierda
CVT	TCV	028	Convulsión tónica

FTCD	TNBR	029	Flexión Tónica del cuerpo lado derecho
FTCI	TNBL	030	Flexión Tónico del cuerpo lado izquierdo
AC	LY	031	Acostarse
ACD	LYR	032	Acostarse por la derecha
ACI	LYL	033	Acostarse por la izquierda
DIS	DYS	034	Disnea
ECL	CLS	035	Espasmo clónico
EC	STR	036	Enderezamiento del Cuerpo
ER	ER	037	Erecto
GD	GR	038	Girar hacia la derecha
GI	GL	039	Girar hacia la izquierda
GLD	BRR	040	Girar sobre eje longitudinal hacia la derecha
GLI	BRL	041	Girar sobre eje longitudinal hacia la izquierda
IPI	PIM	042	Inmovilidad post-ictal
LA	LI	043	Lamer
LC	GRH	044	Lavarse la cabeza
LCD	GRHR	045	Lavarse la cabeza a la derecha
LCI	GRHL	046	Lavarse la cabeza a la izquierda
LGF	LIC	047	Limpiar las garras frontal
LGAD	LCR1	048	Limpiar la garra anterior derecha
LGPD	LCR2	049	Limpiar la garra posterior derecha
LGAI	LCL1	050	Limpiar la garra anterior izquierda
LGPI	LCL2	051	Limpiar la garra posterior izquierda
LD	RAR	052	Levantar derecha
LI	RAL	053	Levantar izquierda
LVH	GRF	054	Lavarse el hocico
LVC	GRN	055	Lavarse el cuello
MV	VI	056	Mover las vibrisas
MT	MT	057	Masticar
ED		058	Enrollar a la derecha
EI		059	Enrollar a la izquierda
OB	EFL	060	Orejas bajas

PIV1	PIV1	061	Pivotar 1 – mover la cabeza lado a lado
PIV2	PIV2	062	Pivotar 2 – mover todo el cuerpo
PL	PL	063	Pilo erección
PAR	IM	064	Parado
ST	JP	065	Saltar
CAD	AFR	066	Caída atónica a la derecha
CAI	AFL	067	Caída atónica a la izquierda
RST	CR	068	Rastrear
RTR	WI	069	Retroceder
RANC	ANR	070	Reflejo antinocioceptivo
REND	STR	071	Reflejo de enderezamiento
RCPL	ELR	072	Reflejo córneo-palpebral
RPI	RI	073	Rigidez pre-ictal
RO	GN	074	Roer
SC	SH	075	Sacudir la cabeza
EXC	EXC	076	Excretar
SOB	STA	077	Sobresalto
DSP	BS	078	Desperazar
ESC	SC	079	Escudriñar
TDD	EXT	080	Tendido
TQP	TCP	081	Taquipnea
TMB	TR	082	Temblar
VOC	VOC	083	Vocalización
ASI	ASL	084	Asimetría lado izquierdo
ASD	ASR	085	Asimetría lado derecho
CAB	NOD	086	Cabeceo
GIR	GY	087	Giro
MIO	MYO	088	Mioclónías
CT	TN	089	Cuello de tortuga
CAT	AF	090	Caída atónica
SCC	WDS	091	Sacudir el cuerpo
ESAB	AS	092	Espasmo abdominal

FLC	HFL	093	Flexión de la cabeza
HP1	HP1	094	Hiperextensión de las patas anteriores
HP2	HP2	095	Hiperextensión de las patas posteriores
MIOc	MYOh	096	Mioclónía de la cabeza
MIOt	MYOt	097	Mioclónía del tronco
MIOa	MYO1	098	Mioclónía de las patas anteriores
MIOp	MYO2	099	Mioclónías de las patas posteriores
MIOg	MYOg	100	Mioclónía generalizada
ELEV	REAR	101	Elevación
GALO	GALO	102	Galope
CAID	FALL	103	Caída
SAL	SAL	104	Salivación
GD	GRID	105	Grooming a la derecha
GI	GRIE	106	Grooming a la izquierda
GÑO	POLH	107	Guiñar el ojo
MIOo	MYOo	108	Mioclónía de oreja
OPIS		109	Opistotonus
HPS	HICC	110	Hipos

Anexo 2: Protocolo de inmunotinción para *c-fos*, GFAP y caspasa-3-activa.

1- Inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación en una dilución de H₂O₂ en agua destilada durante 5 minutos.

TB .1M @ 500ml

$$.1M = (\text{gr}/121,10)/.5 = 6,06\text{g TB}$$

$$\text{NaCl } 9\% = 4,5\text{g}$$

1-dilute 6,06g TB +4,5g NaCl in 250ml dH₂O

2-Fill to 500 ml

2- Lavado en TBS 0,1M @ pH 7,4-> 3x10min

1° lavado 10min.

2° lavado 10min.

3° lavado 10min.

3- Bloqueo unión inespecífica de anticuerpos (elegir 1)

Incubando con leche en polvo al 5% en TBS 0,1M y triton X-100 0.3% -> 30 min.

Con FCS inactivado 3% (300ul) en TBS-Tx -> 30 min. en agitación

TBS-TX

TB .05M@500ml

$$.1M = (\text{gr}/121,10)/.5 = 6,06\text{g TB}$$

$$\text{NaCl } 9\% = 4,5\text{g NaCl}$$

Triton 0.3%=

$$20\% * V = 0.3\% * 500\text{ml}$$

4 bins @2ml = 8ml

8ml TBS-TX+ .4g powdered milk

4- Incubación con anticuerpo primario- 72 horas 4°

-Preparar 1cc de la solución por pocillo

en TBS 0.05M + 10% FCS + 0.3% TX

o en TBS 0.05M + leche moliko 5% + 0.3% TX

c-fos 1/2000; alícuotas 1/100

$$1000\text{ul} * 1/2500 = V' .1/100$$

v= X ul *c-fos* en solución incubación

c-fos → 1/2000

40 µl *c-fos* 1/ 100

960 µl solución

Casp3act 1/500; alícuotas 1/20

$$1000\text{ul} * 1/500 = V' .1/20$$

v= 40ul Casp3act en solución incubación

Caspasa – 3 – activa → 1/500

40 µl Casp3act 1/ 20

960 µl solución

GFAP 1/500; alícuotas 1/100

$$1000\text{ul} * 1/500 = V' .1/100$$

v= 40µl GFAP alicuotado

GFAP → 1/500

40 µl GFAP 1/100

960 µl solución

5- Lavado en TBS 0,1M @ pH 7,4-> 3x10min

1° lavado 10min.

2° lavado 10min.

3° lavado 10min.

6- Incubar 2h (o toda la noche a 4°C) en Ac secundario en TBS 0,05M + 10% FCS + 0,3% Tritón-Tx

Biotinilated goat anti-rabbit

Ac2ª 1/200;

$1000\mu\text{l} * 1/200 = V' .l$

5 µl secundario

900 µl solución

$v = 5\mu\text{l secundario}$

7- Lavar 3 veces en Tris-HCl 0.1Mx 10 min

1° lavado 10min.

2° lavado 10min.

3° lavado 10min.

8- Incubar 90min (al menos en ABC, 5cc Tris-HCl+0,3% Tritón-Tx + 1 gota A + 1 gota de B)

9- Lavar 3 veces en Tris 0,05M pH 7.6

- 1° lavado 10min.

- 2° lavado 10min.

- 3° lavado 10min.

10- Incubar en DAB kit

11- Lavar 3 veces en Tris 0,05M pH 7.6

- 1° lavado 10min.

- 2° lavado 10min.

- 3° lavado 10min.

Soluciones stock**Solución de incubación de anticuerpos**

TBS 0.05M + 10% FCS + 0.3% TX
o en TBS 0.05M + leche moliko 5% + 0.3% TX

TBS-Tx 0,05 M (pH: 7,4)

- Tris: 6,06 gr.
- NaCl: 8,85 gr
- Tritón X-100 (0,1 %): 5 ml de Stock al 20 %
- FBS 10 %: 100 ml
- Agua destilada 1000 ml.

Solución ABC (Prepararlo al menos 30 minutos antes de utilizarlo)

- 20 ul Solución A
- 20 ul solución B
- 2 ml de solución Tampón Tris –HCl 0,05 M, pH: 7,6. Tx 0.3%

Solución de Revelado:

- Tris – HCl 0,05 M , pH :7,6. 25 ml
- DAB 1 % 800 ul
- H2O2 5 ul

Anexo 3: Protocolo de tinción de NISSL

Dejar secar portas a 37°C un noche mínimo. Dejar el violeta de cresilo también a 37°C filtrado.

Enfriar los portas y volver a filtrar el violeta sobre la cubeta.

1. Tinción. Solución de violeta de cresilo 0.1% en dH₂O (Merck 5235). Dentro de la estufa a 37°C.....10 min
2. Lavar dH₂O.....15 segundos
3. Lavar H₂O.....15 segundos
4. Alcohol 50°.....30 segundos
5. Alcohol 70°.....30 segundos
6. Alcohol 96° con ácido acético.....1 min (control visual)
(Para cada 100 ml de alcohol 96° se añaden 0.5ml de ácido acético)
7. Alcohol 100°.....30 segundos
8. Alcohol 100°.....30 segundos
9. Cloroformo (para diferenciar la sustancia blanca).....1 min
En caso de que sea necesario se puede volver al alcohol de 96° para mejorar el contraste entre la sustancia gris y blanca. También endurece la gelatina
10. Alcohol 100°.....30 segundos
11. Alcohol 100°.....30 segundos
12. Xilol.....3 minutos
13. Xilol.....3 minutos
14. Xilol.....3 minutos
15. Cubrir con entellán

Al acabar:

Volver a filtrar el violeta de cresilo. Dejar la cubeta del violeta durante al menos una noche con alcohol y limpiarla lo mejor posible para que no queden restos.

Preparación del Violeta de Cresilo:

Disolver en agitación intensa durante 1 hora a 40 o 50° C. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente. Antes de iniciar la tinción añadir 10 gotal (aprox. 0.5ml) de ácido acético por cada 100ml de solución y agitar ligeramente.

Anexo 4: Protocolo para la demostración de NeuN y Ki67

1- Lavado en TBS 0,1M @ pH 7,4-> 3x10min

- 1° lavado 10min.
- 2° lavado 10min.
- 3° lavado 10min.

TB .1M @ 500ml

.1M=(gr/121,10)/.5= 6,06g TB

NaCl 9%=4,5g

1-dilute 6,06g TB +4,5g NaCl in 250ml dH2O

2-Fill to 500 ml

2- Bloqueo unión inespecífica de anticuerpos (elegir 1)

- Con FCS inactivado 3% (300ul) en TBS-Tx -> 30 min. en agitación

TBS-TX

TB .05M@500ml

.1M=(gr/121,10)/.5= 6,06g TB

NaCl 9%= 4,5g NaCl

Triton 0.3%=

20%*V=0.3%*500ml

4 bins @2ml = 8ml

8ml TBS-TX+ .4g powdered milk

3- Incubación con anticuerpo primario anti-Ki67- 72 horas 4°C a dilución 1/1000

-Preparar 1cc de la solución por pocillo

en TBS 0.05M + 10% FCS + 0.3% TX

4- Lavado en TBS 0,1M @ pH 7,4-> 3x10min

- 1° lavado 10min.
- 2° lavado 10min.
- 3° lavado 10min.

5- Incubar 2h (o toda la noche a 4°C) en Ac secundario en TBS 0,05M + 10% FCS + 0,3% Tritón-Tx CY2 Donkey anti-Rabbit dilución 1/200

- 5 µl secundario
- 900 µl solución

Ac2ª 1/200;

1000ul * 1/200= V' .1

v= 5µl secundario

6- Lavado en TBS 0,05M @ pH 7,4-> 3x10min

- 1° lavado 10min.
- 2° lavado 10min.
- 3° lavado 10min.

7- Bloqueo unión inespecífica de anticuerpos (elegir 1)

- Con FCS inactivado 3% (300ul) en TBS-Tx -> 30 min. en agitación

TBS-TX

TB .05M@500ml

 $.1M = (\text{gr}/121,10)/.5 = 6,06\text{g TB}$

NaCl 9%= 4,5g NaCl

Triton 0.3%=

 $20\% * V = 0.3\% * 500\text{ml}$

4 bins @2ml = 8ml

8ml TBS-TX+ .4g powdered milk

8- Incubación con anticuerpo primario anti-NeuN- 72 horas 4°C a dilución 1/5000

-Preparar 1cc de la solución por pocillo

en TBS 0.05M + 10% FCS + 0.3% TX

9- Lavado en TBS 0,05M @ pH 7,4-> 3x10min

- 1° lavado 10min.
- 2° lavado 10min.
- 3° lavado 10min.

10- Incubar 2h (o toda la noche a 4°C) en Ac secundario en TBS 0,05M + 10% FCS + 0,3% Tritón-Tx CY5 Donkey anti-Mouse dilución 1/200

- 5 µl secundario
- 900 solución

Ac2^a 1/200; $1000\text{ul} * 1/200 = V' . 1$

v= 5µl secundario

11- Lavar 3 veces en Tris-HCl 0.1Mx 10 min

- 1° lavado 10min.
- 2° lavado 10min.
- 3° lavado 10min.

12- Montaje de las secciones. Al tratarse de anticuerpos secundarios fluorescentes, el montaje de las secciones sobre los portaobjetos se realiza en semi-oscuridad; se cubren con medio Vectashield y se fijan utilizando pintañas alrededor del cubreobjetos. Posteriormente, se almacenan en frío (4°C) y oscuridad.

Anexo 5: Tablas de parámetros de Campo abierto

Tabla A. Valores de los parámetros evaluados en la prueba de campo abierto el 1^{er} día de kindling en los diferentes grupos experimentales. (n=4 grupo hámster control, n=26 grupo GASH:Sal). Los datos están expresados como el valor medio \pm desviación típica de la media.

	Control NOest	Control Est	GASH no Est	GASH estim
Distancia (m)	25,25 (4,31)	26,19 (9,60)	40,91 (2,30)	24,90 (14,37)
Velocidad media (m/s)	0,060 (0,010)	0,064 (0,024)	0,099 (0,006)	0,062 (0,034)
Tiempo móvil (s)	420 (0,0)	404,97 (12,0)	420 (0,0)	323,51 (100,43)
Velocidad máxima (m/s)	0,33 (0,075)	0,36 (0,138)	0,38 (0,040)	0,71 (0,790)
Tiempo en la periferia (s)	405,83 (8,15)	402,15 (14,96)	408,63 (12,26)	393,74 (40,93)
Distancia en la periferia (m)	23,93 (3,54)	25,26(8,45)	39,91 (1,92)	24,09 (13,82)
Tiempo móvil periferia (s)	401,77 (0,87)	396,50 (16,77)	414,40 (5,05)	334,34 (74,57)
Entradas en el centro (nº)	5,25 (2,99)	2,75 (2,87)	30,50 (1,73)	2,00 (1,78)
Latencia primera entrada centro (s)	71,05 (51,17)	223,03 (134,82)	136,40 (108,73)	138,42 (101,80)
Tiempo móvil centro (s)	18,23 (0,87)	8,50 (7,79)	5,60 (5,05)	5,12 (4,61)
Tiempo inmóvil centro (s)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,20 (0,94)
Acicalamiento (nº)	2,25 (0,96)	2,25 (1,71)	5,00 (1,41)	1,26 (1,42)
Elevaciones (nº)	40,00 (10,39)	32,75 (15,13)	90,25 (8,02)	23,26 (18,11)
Escudriñar (nº)	28,50 (7,55)	23,50 (0,58)	32,25 (8,06)	15,91 (6,08)

Tabla B. Valores de los parámetros evaluados en la prueba de campo abierto durante el 5º día de kindling en los diferentes grupos experimentales. Los datos están expresados como el valor medio de los datos analizados y, entre paréntesis, desviación típica de la media (n=4 grupo hámster control, n=8 grupo GASH:Sal una estimulación, n=9 subgrupo A y n=8 subgrupo B).

	Control Kd	GASH1Est	GASHKdGrA	GASHKdGrB
Distancia (m)	30,73 (9,12)	47,26 (12,00)	4,70 (7,56)	29,43 (21,379)
Velocidad media (m/s)	0,073 (0,0217)	0,116 (0,026)	0,060 (0,053)	0,075 (0,059)
Tiempo móvil (s)	417,63 (0,15)	404,20 (37,53)	182,45 (167,72)	304,63 (157,61)
Latencia primera salida de inicio (s)	3,83 (0,46)	9,03 (5,13)	290,55 (151,57)	78,38 (167,72)
Tiempo en la periferia (s)	402,28 (10,18)	398,99 (39,38)	240,00 (212,45)	402,28 (33,11)
Distancia en la periferia (m)	29,51 (8,88)	46,04 (12,16)	4,62 (7,39)	28,46 (20,56)
Tiempo móvil periferia (s)	402,07 (11,45)	396,74 (38,66)	147,22 (156,91)	370,05 (53,92)
Acicalamiento (nº)	1,50 (1,29)	5,25 (2,12)	0,92 (1,98)	4,14 (3,31)
Elevaciones (nº)	51,50 (6,46)	87,88 (19,27)	2,92 (5,50)	40,67 (33,66)
Escudriñar (nº)	25,25 (4,35)	15,38 (7,46)	3,25 (4,33)	11,33 (6,65)

Tabla C. Valores de los parámetros evaluados en la prueba del 10º día de campo abierto en los diferentes grupos experimentales. Los datos están expresados como el valor medio y la desviación típica de la media (n=4 grupo hámster control, n=8 grupo GASH:Sal una estimulación, n=9 subgrupo A y n=8 subgrupo B).

	ControlKd	GASH1Est	GASHKdGrA	GASHKdGrB
Distancia (m)	28,63 (9,81)	45,71 (11,99)	5,11 (8,50)	52,67 (28,04)
Latencia primera salida de inicio (s)	2,80 (0,14)	7,80 (5,75)	221,90 (207,87)	57,24 (132,42)
Entradas en la periferia (nº)	4,50 (1,92)	8,50 (2,88)	1,00 (1,07)	7,10 (5,30)
Tiempo en la periferia (s)	401,20 (11,63)	401,43 (11,16)	302,00 (189,73)	369,67 (130,06)
Entradas en el centro (nº)	3,75 (2,06)	7,63 (2,72)	0,38 (0,74)	6,20 (5,16)
Acicalamiento (nº)	1,00 (1,16)	7,38 (2,72)	1,00 (1,93)	3,10 (3,76)
Elevaciones (nº)	51,50 (18,50)	107,75 (22,22)	4,88 (10,72)	96,00 (63,17)
Escudriñar (nº)	29,00 (4,76)	12,00 (4,96)	3,50 (5,07)	9,10 (7,55)

Anexo 6: Tabla de parámetros hematológicos

Tabla XXX: Parámetros hematológicos evaluados tras el kindling. Los datos se expresan como la media (\pm desviación típica de la media) (n= 4 en el grupo control kindling, n= 8 en el grupo GASH:Sal con una estimulación; n= 6 en el subgrupo A y n= 10 en el subgrupo B).

	ControlKd	GASH1Est	GASHKdGrA	GASHKdGrB
Leu_WBC (x 10 ³ /μl)	2,31 (0,65)	4,73 (2,72)	2,83 (0,39)	2,40 (0,55)
HEM (x 10 ⁶ /μl)	3,83 (1,46)	4,84 (1,72)	4,14 (1,02)	3,95 (0,56)
HB (g/dL)	7,68 (2,84)	11,45 (5,98)	8,30 (2,01)	8,40 (1,56)
HCT (%)	18,90 (7,70)	26,40 (10,34)	22,11 (5,97)	21,38 (3,11)
VCM (fL)	49,05 (1,68)	53,85 (2,26)	53,17 (1,52)	54,10 (1,41)
HCM (pg)	20,38 (1,58)	23,03 (6,39)	20,05 (0,68)	21,42 (3,99)
MCHC (g/dL)	41,58 (3,88)	42,56 (10,56)	37,71 (1,23)	39,48 (6,25)
CHCM (g/dL)	41,33 (1,26)	38,38 (2,04)	38,58 (1,46)	38,37 (1,86)
RDW (%)	16,10 (0,50)	16,54 (1,74)	15,49 (0,64)	16,62 (2,05)
HDW (g/dL)	3,02 (0,15)	3,34 (1,87)	2,73 (0,19)	3,53 (1,74)
PLQ (x 10 ³ /μl)	530,75 (182,42)	718,13 (265,21)	598,00 (80,57)	558,50 (122,15)
VPM (fL)	8,85 (0,76)	11,43 (2,62)	10,41 (0,79)	10,20 (1,32)
PDW (%)	57,05 (5,77)	63,09 (2,94)	62,88 (2,23)	64,88 (3,13)
PTC (%)	0,48 (0,19)	0,76 (0,40)	0,62 (0,09)	0,56 (0,09)
Neutrófilos (%)	13,68 (6,12)	9,55 (1,48)	21,90 (14,13)	14,28 (7,21)
Linfocitos (%)	72,63 (5,33)	78,16 (3,30)	57,54 (13,61)	61,88 (5,48)
Monocitos (%)	8,68 (1,96)	7,01 (3,38)	14,34 (9,24)	16,40 (8,99)
Eosinófilos (%)	1,53 (0,90)	2,34 (0,82)	2,45 (1,09)	3,68 (1,24)
Granulocitos (%)		2,53 (0,64)	2,30 (0,07)	2,39 (0,09)

Anexo 7: Artículo**The audiogenic kindling induces stress-related changes in the GASH-Sal model of epilepsy**

Sonia Hernández-Noriega^{1,2}, David Sánchez-Benito^{1,3}, Ricardo Gómez-Nieto^{1,3}, Orlando Castellano^{1,3}, Consuelo Sancho^{1,2}, Dolores E. López^{1,3}, Luis J. Muñoz⁴ and Inês Pereira-Figueiredo¹

¹Institute for Neuroscience of Castilla y Leon/IBSAL, University of Salamanca, Spain

²Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Spain

³Department of Cell Biology and Pathology, University of Salamanca, Spain

⁴Animal Research Service, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Abstract

Stress is among the most seizure precipitant in epilepsy, however it is not clear yet how stress interact with repeatedly induced seizures, the so-called kindling. The Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal), an animal model of reflex epilepsy developed at the University of Salamanca, exhibits generalized convulsive seizures in response to intense acoustic stimulation. In the present study, we investigated stress physiological markers after audiogenic kindling and evaluated corresponding behavioral changes in the GASH:Sal. GASH:Sal males of 3-4 months old that were subjected to audiogenic stimulations during 10 days (twice per day). For comparison, we carried out the same stimulation protocol in controls hamsters (*Mesocricetus auratus*). Also, we used naïve GASH:Sal (without acoustic stimulation) for comparison at the basal conditions. The exploratory activity performed in an open field and the changes in cortisol levels were analyzed prior to and 1, 5 or 10 days after the audiogenic stimulation. At the end of experiment, the hematological changes were determined and compared between the groups of animals. Audiogenic kindling induced changes in most of the physiological stress parameters studied. The open field test showed that naïve GASH:Sal animals differs from control hamsters. GASH:Sal animals exhibited significant behavioural changes after kindling. We found a dramatic decrease in parameters such as the inner activity, the number of rearings and grooming activity. GASH:Sal animals showed twice higher cortisol levels than control animals after 5-day acoustic stimulation. Moreover, the exposure of GASH:Sal to audiogenic kindling induced significant changes in stress-related hematological parameters such as mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet volume, lymphocytes and eosinophils.

Highlights

GASH:Sal hamsters demonstrate a distinct behavioral pattern.

The audiogenic Kindling induces hematological changes in GASH:Sal animals.

GASH:Sal present despair traits and evidence of anhedonic behavior.

GASH:Sal is a promising model for the study of behavioral disorders and epilepsy.

I. Introduction

Epilepsy affects approximately one per cent of the world population, constituting a major problem of public health. Stress or stressful events (Testa et al., 2012; Jones and O'Brien, 2013; van Campen et al., 2013; Lidster et al., 2016), sleep deprivation, depression, anxiety (Goldstein et al., 2006), and fatigue are the most frequently seizure precipitant factors, in epilepsy.

A high level of anxiety could itself act as a precipitant factor through neurophysiological and hormonal alterations related to the impact of stress hormones on neuronal excitability and thus seizure susceptibility (Eggers, 2007; Novakova et al., 2017).

Epilepsy changes the way brain reacts to stress (Narla et al., 2016). However, the existence of specific neurobiological factors underpinning emotional vulnerability remains uncertain, as well as it is not yet clear how stress interact with repeatedly induced seizures, the so-called kindling.

Audiogenic kindling (AK) is a model of naturally occurring epileptogenesis triggered by repeated sound stimulation of animal models genetically prone to audiogenic seizures (Vinogradova, 2008).

Genetic animal models for several epileptic conditions have been proposed in an attempt to mimic, if only partially, the myriad of causes, signs, and symptoms of human epilepsy.

Accumulating evidence from these animal models, show a range of striking behavioural changes relevant to the psychiatric comorbidities seen in humans with epilepsy, including interictal alterations in anxiety states, depressive-like behaviours and endophenotypes of psychosis (Mazarati et al., 2009; Jones and O'Brien, 2013; Castro et al., 2017), suggesting that there is at least some biological component to these comorbidities. The increased prevalence of psychiatric diseases in epilepsy has been variously attributed to the psychosocial consequences of living with a neurological disorder, to long term medication effects, to the repeated damaging effects of seizures on the brain, or to a common underlying neurobiological abnormality (Jones and O'Brien, 2013; Epps and Weinshenker, 2013), explanations which are not mutually exclusive.

In our laboratory, the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal), an animal model of reflex epilepsy (for review see Muñoz et al. 2017), exhibits generalized convulsive seizures in response to intense acoustic stimulation.

Previous studies with other animal models have demonstrated the facilitatory effects of individual stress hormones, such as GCs (Mazarati et al., 2009; Heinrichs, 2010) or CRH (Baram et al., 1997) on the development of kindling. At some of these experiments it was shown that corticosterone administration increased both susceptibility to seizures and their severity. These data would aim to the possibility of stress to act as a causative factor in the crisis also in our animal model. In the present study, our aim was to characterize the parallel behavioral and physiological changes induced by repeated crises after AK in the GASH:Sal hamsters. Thus, our hypothesis is that the exposition to such stressful event related to the repeated crises, can impact at both acute or chronic, behavioral and physiological levels.

Understand the nature of these changes and their implications in the susceptibility to new convulsive episodes, has a major importance in the development of new tools and guidelines for the prevention, or blockage of the risk factors for epilepsy.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

A total of 30 animals were used in this study, two lines of male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), 8 normal control hamsters (*Le Genest-Saint-Isle, France*) and 22 GASH:Sal hamsters (Muñoz et al., 2017) at 16 weeks of age, weighing approximately 60 g. The animals did not suffer any audiogenic seizure prior to the experiments. All animals were free of ear infection. To rapidly confirm normal hearing, we used the bilateral finger friction test in all cases. All procedures and experimental protocols were performed according to the guidelines of the European Community's Council Directive (2010/63/CE) for the care and use of laboratory animals. All the experiments were performed at the Neuroscience Institute of Castilla y León at the University of Salamanca.

2.2 Audiogenic kindling

The animals were exposed to 20 auditory stimulation (AS) for 10 days (twice per day: at 9:00 h and at 19:00 h), within an acrylic cylinder (50 cm high x 37 cm diameter). The acoustic stimulus was recorded using a high-pass filter (N500 Hz; microphone Bruel & Kjaer #4134 and preamplifier Bruel & Kjaer #2619), digitized above 4 kHz, and reproduced by a computer coupled to an amplifier (Fonestar MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) and a tweeter (Beyma T2010, Valencia, Spain) in the upper portion of the arena (López-López et al, 2015). The delivered sound was a semirandom acoustic stimulus of 0–18 kHz with an intensity of 115 to 120 dB. Regarding the animal's response to kindling, they were separated in those exhibiting complete crisis (GASH-Kd-crisis) or uncomplete crisis (GASH-Kd-No). For comparison, we carried out the same stimulation protocol in Controls (Control-Kd). Also, we used naïve GASH:Sal, that were exposed to one day of AS (GASH) for comparison at the basal conditions (Figure 1).

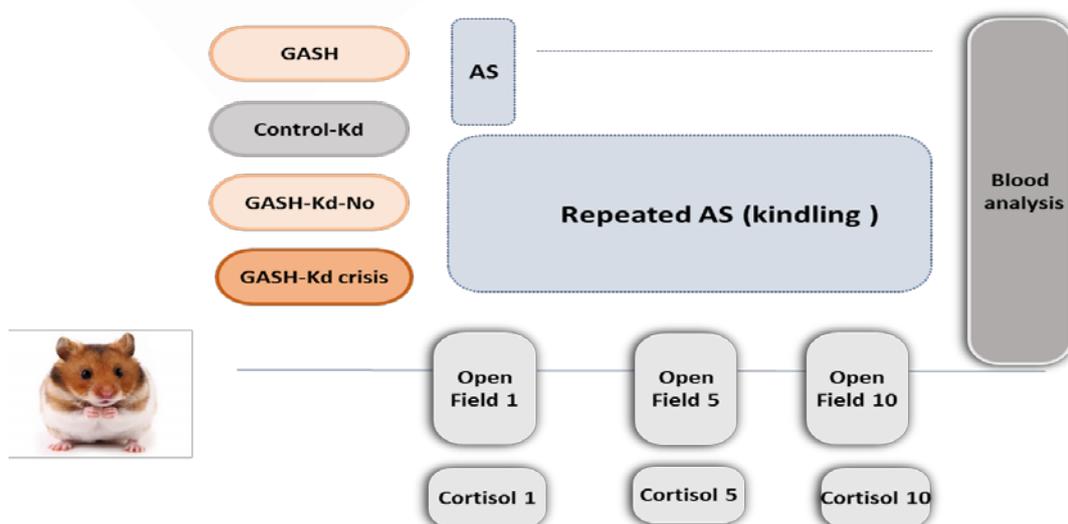


Figure 1. Study timeline. The animals from both strains (Controls or GASH:Sal) were divided in those exposed to one day of acoustic stimulation (GASH), or 10 days of audiogenic stimulation, twice a day: Controls (Control-Kd), GASH:Sal exhibiting complete crisis (GASH-Kd-crisis) or GASH:Sal exhibiting uncomplete crisis (GASH-Kd-No). In the first, fifth and tenth's day of kindling Protocol, 10 min after the audiogenic stimulation (AS), all animals were tested in the open field. Three min after the open field test ended, blood sampling for cortisol analyses was made. One day after ending kindling protocol, all animals were submitted to sampling procedure for hematological analyses.

2.3. Open field test

In the first, fifth and tenth's day of kindling Protocol, 10 min after the audiogenic stimulation (AS), we analyzed the exploratory activity in an open field arena (OF). The 3 sessions protocol follows the previous works of Pereira-Figueiredo et al., (2014) and Suleymanova et al., (2016); and the 10 mins' time between the AK and the OF test was previously determined as the necessary one for recovery from a crisis, in a pilot study (unpublished data). The apparatus consisted of a round, white wooden arena (120cm diameter, enclosed by a 50-cm-high wall), divided into three concentric circles, an outer (12 areas adjacent to the wall) and an inner zone (7 areas subdivided into a large and a small center of 6 and 1 areas respectively). The OF apparatus was illuminated by an 80W bulb, focused onto the field from a height of 190cm above the floor, in order to avoid any external reference point (Kuniishi et al., 2017). The behaviour of each animal was studied for a period of 7 min, by using the AVI-Maze software (ANY-Maze Video Tracking System Version 4.99 m). The occurrence of the following types of behaviour was recorded: the distance covered, number of crosses spent on the peripheral circle (Outer activity), time spent on central circle (inner activity), the time spent immobile, groomings (number of times) the exploratory will, and rearings (number of episodes in which the animal reared up on its back legs). Between the introductions of each animal, the surfaces were cleaned with water and 70% ethanol. All trials were performed between 10:00 and 14:00 hours.

2.4. Cortisol analyses

The sampling procedure for cortisol analyses was made in all animals, in the same days of the OF test (in the first, fifth and tenth's day of kindling Protocol), 20 min after the AS (Gebhardt-Henrich et al. (2007) and 3 min after OF test ended (see Fig. 1 for study timeline). The induction of anesthesia was made by mask inhalation of isoflurane vaporized at concentrations of up to 4% and 1 l/min O₂ in the induction phase, and of maintenance conditions of 3% isoflurane and 0.4 l/min O₂ (Ashley et al., 2013; Terranova et al., 2016). The sample of blood (0.1 ml) was collected in a heparinized syringe, and then stored for an hour at 37°C, in an Eppendorf tube. Blood was centrifuged at 4°C, and serum isolated and stored at -20 °C until assayed. Analyses of cortisol were made using a high-performance liquid chromatography (HPLC) using the electrospray-tandem mass spectrometry as detecting tool. An ionspray (pneumatically

assisted electrospray) interface was used in positive ionization mode. The instrumental limit of detection was 100 ng per deciliter. At the end, we injected subcutaneously 0.9% saline of the same amount of blood extracted, to rehydrate the animal, that was placed in an atmosphere with rich oxygen levels, over a thermal blanket to facilitate recovery from anesthesia.

2.5. Hematological analyses

On the day after the completion of the kindling protocol (12th day), all animals were submitted to sampling procedure for hematological analyses. Blood samples were taken between 09:00 and 11:00 hours by cardiac puncture following intraperitoneal anaesthesia with a mixture of ketamine (200 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Blood was collected to EDTA (K3)-containing tubes that were freshly processed on an automatic cell counter (ADVIA 120 cytometer, Bayer, Leverkusen, Germany). The hematological parameters determined were erythrocyte numbers, hemoglobin concentrations, mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCH), hematocrit values; platelet numbers and mean platelet volume (MPV); and the leukocyte cell numbers and type.

2.6 Statistics

Statistical analyses were performed using the IBM ® SPSS® software, version 21 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2011). The differences between groups were analyzed by ANOVA (one and two way), followed by the Fisher-PLSD-test for post hoc comparison if appropriate, with the Bonferroni-test (in homogeneous variables) or Games – Howell (non-homogeneous variables). Mean differences were subjected pairwise to Student's t-test, using the Levene Test for equality of variances. Differences were regarded as statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Open field

At the first day of testing in the open field (OF), the one-way ANOVAs revealed the differences across the experimental groups, in the total time at the center, $F_{3,31} = 6.71$, $p = 0.002$; in the number of groomings, $F_{3,31} = 8.1$, $p < 0.001$; in the number of rearings $F_{3,31} = 18.9$, $p < 0.001$ and in exploratory activity $F_{3,31} = 11.6$, $p < 0.001$.

When non-stimulated, the post-hoc analyses revealed a great difference between strains. The GASH:Sal animals exhibited more groomings ($p = 0.01$) and more rearings ($p = 0.01$), but spent significantly less time in the inner circle ($p = 0.02$) than Controls.

The ANOVAs indicated that in GASH:Sal animals one session of AS induced a significant decrease in the number of Rearings ($F_{3,31} = 11.7, p < 0.001$) and Groomings ($F_{3,31} = 14.1, p = 0.02$), and no differences were found among Controls.

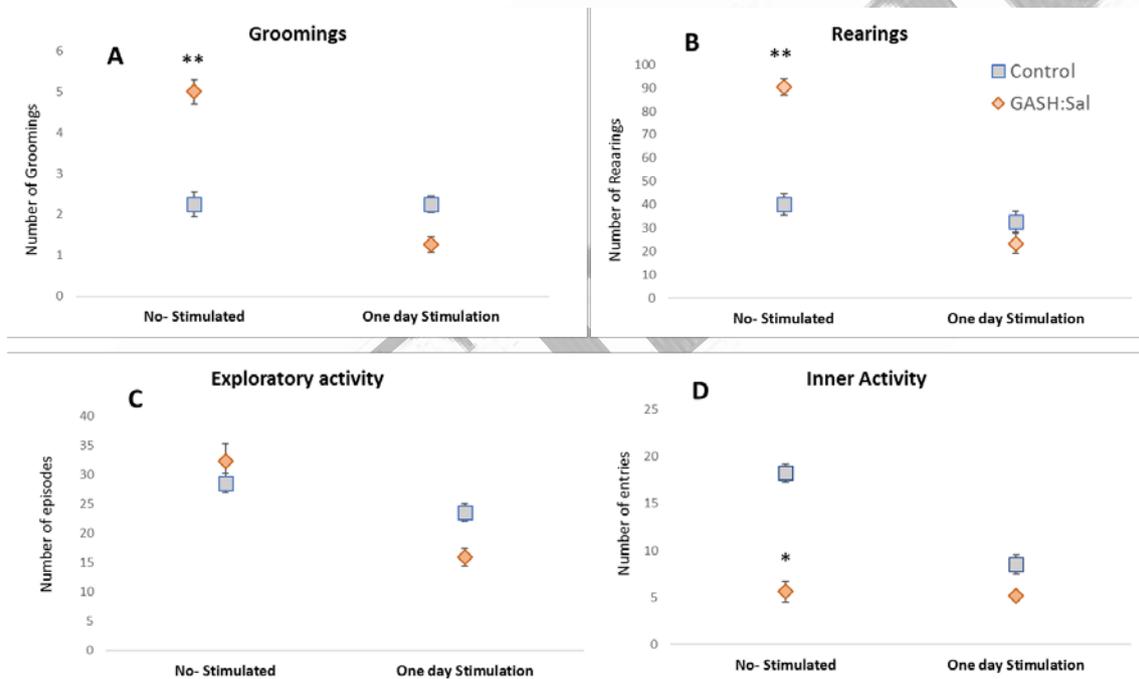


Figure 2. Spontaneous behaviors performed by GASH:Sal and Control strains expressed in open-field arena during the 7-minutes test, at the first day of Test. Panels A, B and C: Total number of grooming, rearing and exploratory episodes; **Panel D:** Number of entries in the inner areas of the open-field arena. ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$, indicate the significant differences related to Controls. two-way ANOVA–Bonferroni's post hoc test, Means \pm SEM.

At the fifth day of kindling, the GASH:Sal animals were subdivided into 2 groups, those that manifested completed (48%) and those that manifested uncompleted crisis (51%). The ANOVAs revealed significant differences, as effect of group, in outer activity $F_{3,31} = 18.7, p < 0.0001$, inner activity $F_{3,31} = 18.7, p < 0.0001$, in the time spent immobile $F_{3,31} = 6.0, p = 0.003$, in the number of rearings $F_{3,31} = 35.1, p < 0.0001$, groomings $F_{3,31} = 7.1, p = 0.001$, and in the time spent displaying exploratory activity $F_{3,31} = 16.7, p < 0.0001$. Post-hoc (Games-Howell) showed that among animals submitted to kindling the GASH:Sal with completed crisis displayed significantly less distance covered, less outer activity ($p < 0.05$), less inner activity rearings ($p < 0.001$) and less exploratory activity than Controls $p < 0.001$ (Figure 3).

Also, differences among GASH:Sal animals were found, with the animals displaying complete crisis exhibiting behavior affected in this test, and less activity in overall, when compared with GASH: one ST (see Figure 3) .

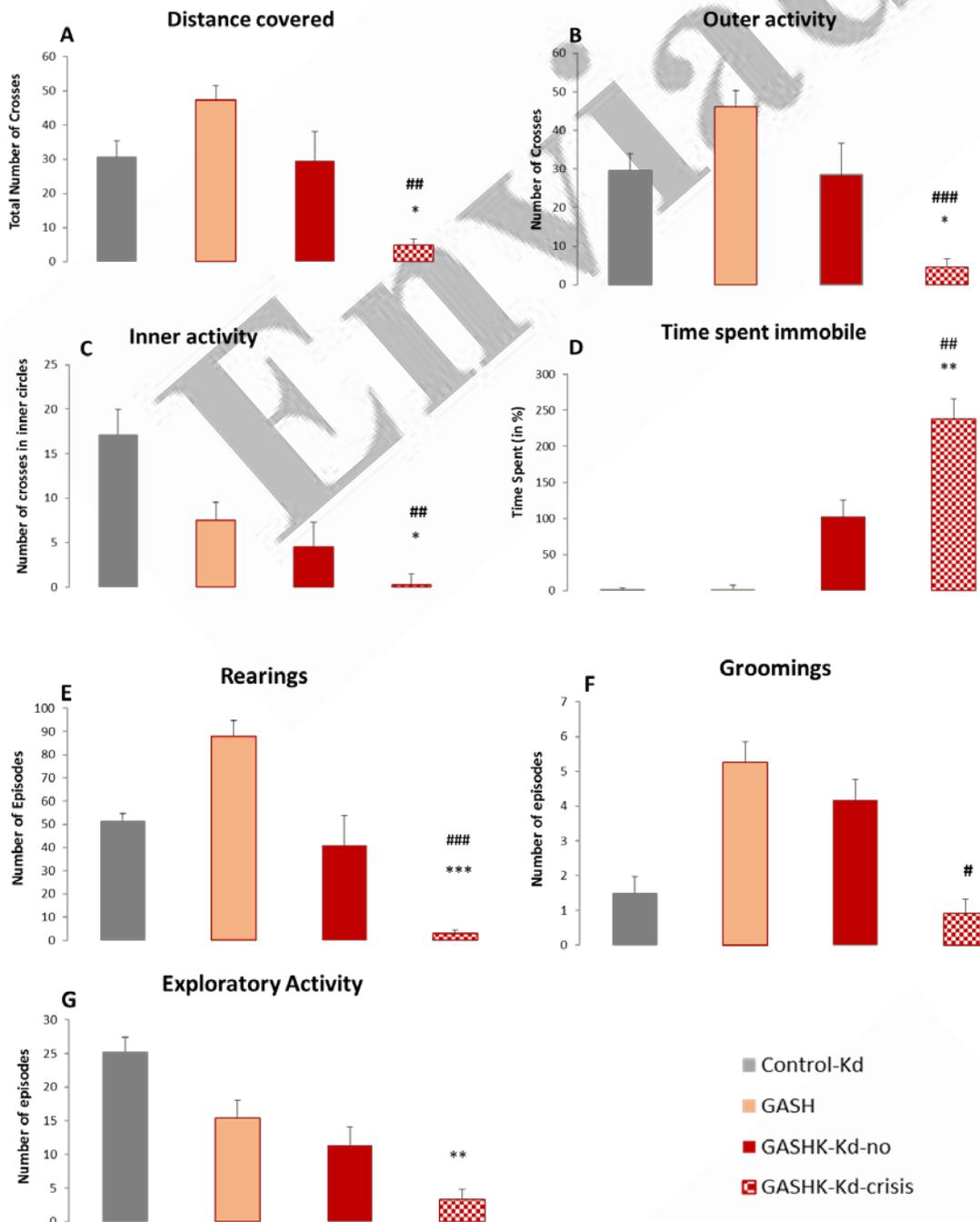


Figure 3. Spontaneous behaviors performed by GASH:Sal and Control strains expressed in open-field arena during the 7-minutes test, at the fifth day of Test. A: distance covered over each of the circular areas of

open-field arena; B and C: Number of crosses in each of the circular areas (outer or inner, respectively); D: time spent with no movement detected; E, F and G: total number of rearing, exploratory, and grooming episodes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, indicate the significant differences when related to Controls, submitted to audiogenic kindling. # $p < 0.05$. ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$, indicate the significant differences when compared to non kindled GASH:Sal. Mean \pm SEM

As depicted in Figure 4, at the 3rd test in the OF (tenth day of kindling), the differences between animal groups became more evidenced, with GASH:Sal animals exhibiting behavioural impairments, after audiogenic kindling.

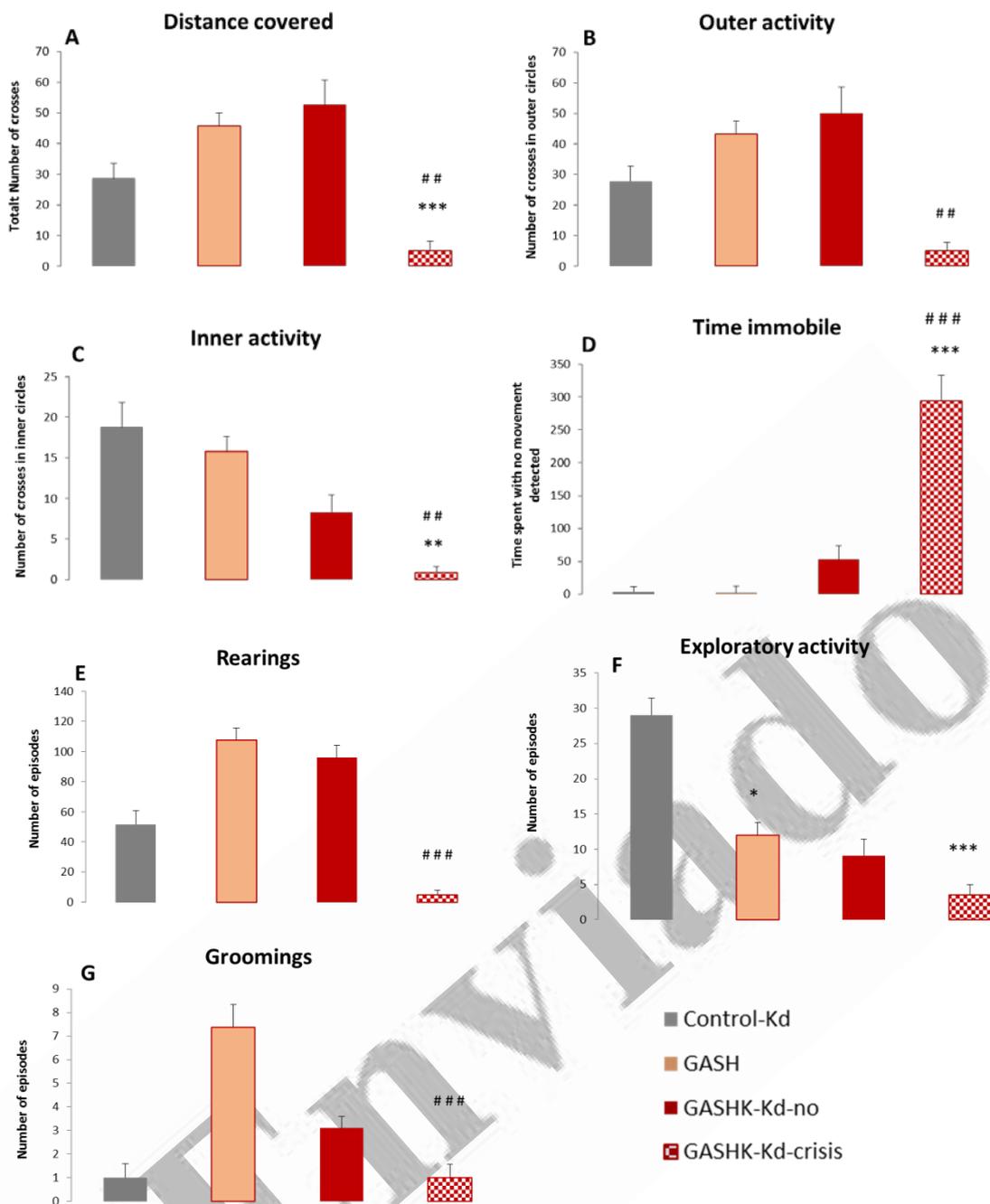


Figure 4. Spontaneous behaviors performed by GASH:Sal and Control strains expressed in open-field arena during the 7-minutes test, at the tenth day of Test. A: distance covered over each of the circular areas of open-field arena; B and C: Number of crosses in each of the circular areas (outer or inner, respectively); D: time spent with no movement detected; E, F and G: total number of rearing, exploratory, and grooming episodes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, indicate the significant differences when related to Controls, submitted to audiogenic kindling. ## $p < 0.01$, and #### $p < 0.001$, indicate the significant differences when compared to non kindled GASH:Sal. Mean \pm SEM

3.2 Cortisol

The study of the levels of cortisol in blood, showed that during the first day of AK we did not found any statistical difference between the different experimental animals, all exhibiting cortisol values considered normal for this specie, in a stress condition ($1,77 \pm 0,1 \mu\text{g/dl}$, data not shown).

After 5-day and 10-day of AK, the ANOVAs revealed differences between strains and response to kindling, with ($F_{3,28} = 4.9$, $p = 0.008$) and ($F_{3,28} = 4.7$, $p = 0.009$), respectively. As depicted in the Figure 5, differences were found according to the type of response to kindling. After kindling protocol (regardless of 5 or 10 days), Post-hoc showed the GASH:Sal strain exhibiting complete crisis the levels of Cortisol almost tripled, when compared to GASH:Sal-oneST ($p = 0.021$) and GASH:Sal with uncomplete crisis ($p = 0.024$) or Controls.

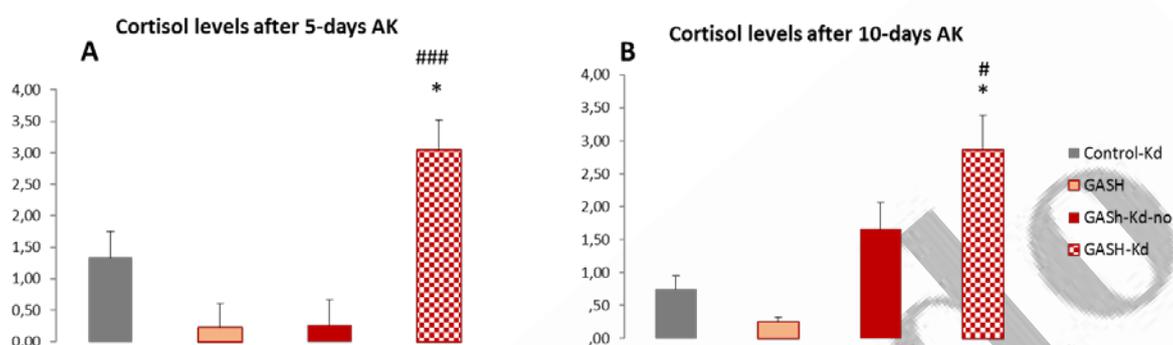


Figure 5. Effects of strain and kindling in Cortisol levels. (Means \pm SEM). * $p < 0.05$, indicates the significant differences when related to Controls, submitted to audiogenic kindling. # $p < 0.05$, and #### $p < 0.001$, indicate the significant differences when compared to non kindled GASH:Sal.

3.3 Hematological parameters

As revealed by the ANOVAs, differences were found in several hematological parameters, such as number of leukocytes ($F_{3,27} = 3.86$, $p = 0.022$), mean corpuscular volume (MCV) ($F_{3,27} = 8.12$, $p = 0.001$), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ($F_{3,27} = 3.51$, $p = 0.032$), platelet distribution width (PDW) ($F_{3,27} = 4.7$, $p = 0.01$), lymphocytes ($F_{3,27} = 8.7$, $p < 0.001$) and eosinophils ($F_{3,27} = 3.9$, $p < 0.021$) (Table I).

Post-hoc showed that exposure of the animals to AK induced changes in several parameters, regardless of strain or response to stimulation. Despite no reaching significance, a decrease in the number of leukocytes, hemoglobin and platelets was found. Among GASH:Sal strain, a significance decrease in the total number of lymphocytes was found, after kindling ($p < 0.01$).

Also, significant differences according to strain were found, and among the animals exposed to kindling, the GASH:Sal animals, exhibited an increase in (MCV) ($p < 0.01$), PDW ($p < 0.05$), and a significant decrease in MCHC ($p < 0.05$), in comparison with Controls (Table I).

	Control-Kd	GASH	GASHK-Kd-no	GASH-Kd-crisis
Hematocrit (Hct)	18.9 (7.7)	26.4 (10.3)	22.1 (5.9)	21.3 (3.1)
Patelets	530.7 (182)	718.1 (265)	598.2 (80)	558.5 (122)
Hemoglobin	3.8 (1.4)	4.8 (1.7)	4.1 (1.1)	3.9 (0.5)
MCV	49.5 (1.7)	53.85 (2.2)	53.17 (1.5)**	54.1 (1.4)**
MCHC	41.3 (1.3)	38.4 (2.0)	38.6 (1.4)*	38.4 (1.5)*
PDW	57.1 (5.7)	63.09 (2.9)**	62.8 (2.5)*	64.8 (3.1)**
MPV	8.8 (0.7)	11.4 (2.6)	10.4 (0.7)	10.2 (1.3)
Leukocytes	2.30 (0.6)	4.7 (2.1)	2.8 (0.3)	2.4 (0.5)
Lymphocytes	72.6 (5.3)	78.2 (3.3)	57.5 (13.6)** #	61.8 (5.4)
Eosinophils	1.5 (0.9)	2.3 (0.8)	2.5 (1.1)	3.7 (1.2)*
Neutrophils	13.6 (6.1)	9.5 (1.4)	21.9 (14.1)*	14.2 (7.2)

Table I. Effects of strain and kindling in hematological parameters. Means \pm SEM. Abbreviations: platelet distribution width (PDW), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean platelet volume (MPV). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, indicate the significant differences when related to Controls, submitted to audiogenic kindling. # $p < 0.05$, indicates the significant differences when compared to nonkindled GASH:Sal.

4. Discussion

For epileptic patients, stress and anxiety can exacerbate their condition, increasing the frequency and severity of seizures (van Campen et al., 2013; Lidster et al., 2016). So far, it is not clear why this happens and what can be done to avoid it.

Our data show that when no stimulated (at basal conditions), the GASH:Sal animals' behaviour already differed from Control hamsters, with this group of animals exhibiting less inner activity but more groomings and more rearings than Controls.

In our study, the repeated exposure to AK induced several stress-related behavioral and physiological changes in hamsters, regardless of strain. Nevertheless, our data showed that after being exposed to kindling the GASH:Sal hamsters exhibit a heightened susceptibility to behavioral despair traits, as they dramatically decreased mobility, exploratory will and displayed some evidence of anhedonia.

In our animal model, after kindling, stress showed up through behavioral alterations, changes at cortisol levels and changes on several hematological parameters.

4.1 The audiogenic kindling affected the behavior in the Open field

In the present work, the OF paradigm was used as a simple model to study anxiety-like behaviour and locomotor activity (Prut and Belzung, 2003). In the OF test, animals face contradictory motivations – the fear of an open enlightened environment, and the motivation to explore it (novelty preference) (Archer, 1973). An internal conflict underlies the motivation of the animals' behavior, where a high state of anxiety/emotivity would inhibit exploration (Citraro et al., 2017) and low emotivity would facilitate it, indicating a better adaptation to the new environment (Salari et al., 2015)

The time and number of entries in the inner circle of the OF (Jiang et al., 2016) the number of rearings (Pereira-Figueiredo et al., 2017) and groomings (Ducottet et al., 2004; Ennaceur, 2014) are considered important signs of anxiety in rodents, and, in all cases, a significant decrease is displayed when exposed to a stressful situation.

In our study, in one hand, we found kindling induced several stress-related behavioral changes in the hamsters. Accordingly, previously, (Mlsna y Koh, 2013) reported that repeated stimulation induced very low levels of exploratory activity, being registered animals that became hypotonic.

In the other hand, we found that most GASH:Sal animals exhibited helplessness signs, after kindling. In this strain, animals showed significantly less activity and few will to explore the field (less rearings, and exploratory activity) as well as they increased the time displayed immobile, when compared to Control submitted to the same protocol, proving to be more emotional during the OF test.

Other animal models of epilepsy, such as the Audiogenic susceptible Wistar rats (S) (Garcia-Cairasco et al., 1998), or the Wistar audiogenic rats (WAR) (Castro et al., 2017) have contributed to the understanding of the bidirectional comorbidity associations between the epileptic condition and psychiatric diseases. In agreement with Garcia-Cairasco et al. (1998), while using susceptible rats, our data show that GASH:Sal hamsters showed a decreased total exploratory activity in the novel environment .

Psychiatric disorders associated with elevated stress levels, such as depression, are present in many epilepsy patients (Jones and O'Brien, 2013). According with our data, in many of the animal models of epilepsy, the “psychiatric” phenotype manifests before the development of the epilepsy, opening up the possibility that this may confer an enhanced vulnerability to epileptogenesis. According with Castro et al. (2017) in our study, GASH:Sal animals demonstrated a distinct pattern of behaviors in the OF, apparently related to a compromised ability to evaluate emotional contingencies with different degrees of aversiveness, either not properly recognizing or over interpreting current aversiveness.

Castro et al., (2017) also reported that despite no evidence of anhedonic behavior of their WAR animals, these animal's strain presented behavioral despair traits (e.g., increased FST immobility) and lower threshold to evaluate a helplessness situation.

4.2 The effects of stress in the “epileptic” brain

Several studies point to the intimate relationship between epilepsy and stress, finding this as a trigger of seizures, as well as increasing the risk to suffer crisis more frequently (van Campen et al., 2013).

Submission to seizures and corresponding stress can affect short-term memory processes (Titiz et al, 2014), as well as spatial, episodic, and emotional memory (Dodrill, 2002) affecting hippocampus plasticity. Previously, Liu et al., (2003) have described, the cerebral damage and cell loss, resulting from the repeated crises, that were potentially affecting learning and memory.

Milliseconds after exposure to stress, several other brain areas, besides hypothalamus, are capable of producing the corticotropin releasing factor (CRF), the neurotransmitter responsible for mediating its response; for example, the amygdala hippocampus (Swanson, et al. 1983; Chen et al., 2001) and the locus coeruleus (Valentino and van Bockstaele, 2008). In addition, stress increases the level of neuroactive steroids synthesized by glial cells that determine neuronal excitability.

Our study showed that one AS did not affect Cortisol levels. However after 5-day-kindling, the GASH:Sal strain exhibiting complete crisis displayed a 300% increase in CORT, whereas Controls submitted to the same kindling protocol only displayed a slight increase in this values, being compared with the animals GASH:Sal-oneST or the GASH:Sal with uncomplete crisis.

Previously, Mazarati et al. (2009) also, observed the interictal elevation of plasma corticosterone in a rat model of co-morbidity between temporal lobe epilepsy and depression.

These results could indicate a strong correlation between the CORT levels after kindling and the presence or not of convulsive crisis. Nevertheless, these data do not give information about the cortisol increase as the cause or the consequence of the crisis.

Furthermore, the effects of the HPA axis on the brain are not only due to corticosteroids (van Campen et al., 2013). Along with various neurotransmitters, many hormones are involved in the response to stress affecting neuronal excitability.

Recently, Narla et al. (2016) reported the changes that epilepsy produces in neuronal signaling. These authors found that the occurrence of seizures increases by converting a beneficial stress response into a seizure. Examining the effects of CRF in the piriform cortex, a region of the brain that supports seizures in humans, they found that in a normal brain, the CRF decreased activity in this part of the brain, but in the diseased brain, it did exactly the opposite, and increased the activity of the piriform cortex.

4.2 Changes in physiological parameters with stress

Audiogenic kindling changed the hematological parameters stress-related. In our laboratory (Pereira-Figueiredo et al., 2014, 2015), we previously found a straight correlation between stress and long-term changes in the hematological parameters and immune systems functioning.

When animals are exposed to an acute stressor blood coagulation accelerates, eliciting hemoconcentration (von Kanel et al., 2009) the catabolic characteristics of GCs produces a rapid mobilization of amino acids and lipids (Swaab et al., 2005) and the immune response is faster, enhanced

by catecholamines (increasing pro-inflammatory cytokine production) but soon suppressed if GCs remain at high levels (Bierhaus et al., 2006).

In the present study, VCM, PDW and VPM significantly increased in GASH: Sal animals when compared to Controls submitted to repeated audiogenic stimulations.

Moreover, we found kindling decreased the leukocyte count in all the animals. Such immunosuppressive effect has already been associated to a long-term stress condition (Anacker et al., 2010; Pereira-Figueiredo et al., 2014). However, the effects are dramatic in GASH:Sal animals, which displayed a significant decrease in the number of lymphocytes, regardless of their response to kindling.

Previously, Jones et al. (2013) hypothesized that neural networks become permanently hyperexcitable after suffering repeated stimulations, with changes in the amygdala and other limbic regions. The selective activation of such neuronal circuits, as a result of the repeated seizures, can generate a sequence of behaviors held by permanent memory events, which are essential for the expression of chronic aspects of epilepsy.

Conclusions

Animal models of epilepsy are an important tool for further understanding the basic cellular mechanisms underlying epileptogenesis and for developing novel antiepileptic drugs.

Our study shed light into the relationship between epilepsy and psychiatric comorbidities.

The present data show that audiogenic kindling induce stress-related changes at behavioural and physiological levels, that heightened in our GASH:Sal animal model.

We hope our results open the door into the study of new strategies that can prevent seizures induced by stress

Acknowledgements: Sponsored by the University of Salamanca Support Grant for the GIRs 2017 (IP-DE López) and for the Research projects (IP- C Sancho). This work has been funded by a fellowship from Spanish Junta de Castilla y León (Consejería de Educación, Programa ERIDI 2007-2013), using funds from European Social Fund (Operational Programme ESF Castilla y León 2007-2013).

References

- Archer, J. (1973). Test for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21, 205-235.
- Ashley, N. T., Walton, J. C., Haim, A., Zhang, N., Prince, L.A., Fruchey, A. M., et al. (2013). Sleep deprivation attenuates endotoxin-induced cytokine gene expression independent of day length and

circulating cortisol in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *The Journal of Experimental Biology*, 216, 2581-2586.

Baram, T.Z., Yi, S., Avishai-Eliner, S., Schultz, L. (1997). Development neurobiology of the stress response: multilevel regulation of corticotropin-releasing hormone function. *Ann N Y Acad Sci*, 814 pp. 252-265

Bierhaus, A., Humpert, P.M., Nawroth, P.P. (2006). Linking Stress to Inflammation. *Anesthesiology Clinics of North America*; 24(2): 325-40. doi:10.1016/j.atc.2006.01.001

Bowman E.S. (2000). Relationship of remote and recent life events to the onset and course of non-epileptic seizures J.R. Gates, A.J. Rowan (Eds.), *Non-epileptic seizures*, Butterworth-Heinemann, Boston (2000), pp. 269-283

Castro, G.P., Medeiros, D.C., Guarnieri, L.O., Mourão, F.A.G., Pinto, H. P.P., Pereira, G.S, et al. (2017). Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy & Behavior*. Volume 71, Part B, June 2017, Pages 243-249 <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.08.039>

Chen, Y., Bender, R. A., Frotscher, M. and Baram TZ. (2001). Novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: a quantitative spatiotemporal analysis. *J. Neurosci*. 21(18), 7171-7181.

Citraro, R., Leo, A., Franco, V., Marchiselli, R., Perucca, E., De Sarro, G. and Russo, E. (2017). Perampanel effects in the WAG/Rij rat model of epileptogenesis, absence epilepsy, and comorbid depressive-like behavior. *Epilepsia* 58 (2), 231-238.

Dodrill, C.B. (2002). Progressive cognitive decline in adolescents and adults with epilepsy. *Prog Brain Res.*, 135, 399-407.

Ducottet C, Aubert A, Belzung C. (2004). Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. *Behav Brain Res.*, 155, 291–299.

Eggers, A.E. (2007). Temporal lobe epilepsy is a disease of faulty neuronal resonators rather than oscillators, and all seizures are provoked, usually by stress. *Medical Hypotheses* 69(6): 1284-1289.

Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety – Pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior*, 135, 55-71.

Epps S. A., Weinschenker D. (2013). Rhythm and blues: Animal models of epilepsy and depression comorbidity. *Biochemical Pharmacology* 85, 135–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.016>

Garcia-Cairasco, N., Oliveira, J.A.C., Wakamatsu, H., Bueno, S.T.B., Guimarães, F.S. (1998). Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. *Physiology & Behavior* 64(5): 671-674.

Gebhardt-Henrich, S.G., Fischer, K., Hauzenberg, A.R., Keller, P. and Steiger, A. (2007). The duration of capture and restraint during anesthesia and euthanasia influences glucocorticoid levels in male golden hamsters. *Lab Animal* 36, 41-46.

Goldstein, L.H., Mellers, J.D.C. (2006). Ictal symptoms of anxiety, avoidance behaviour, and dissociation in patients with dissociative seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;77: 616–21.

Heinrichs, S.C. (2010). Neurobehavioral consequences of stressor exposure in rodent models of epilepsy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34(5): 808-815.

Jiang, Y., Lu, Y., Jia, M., Wang, X., Zhang, Z., Hou, Q. and Wang, B. (2016). Ketogenic diet attenuates spatial and item memory impairment in pentylenetetrazol-kindled rats. *Brain Research* 1646, 451-458.

Jones N.C., O'Brien T.J. (2013) Stress, epilepsy, and psychiatric comorbidity: How can animal models inform the clinic? *Epilepsy & Behavior* 26 363–369

Jones, N.C., Lee H.E., Yang, M., Rees, S.M., Morris, M.J., et al. (2013). Repeatedly stressed rats have enhanced vulnerability to amygdala kindling epileptogenesis. *Psychoneuroendocrinology* 38(2): 263-270.

Kanner, A.M. (2009). Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. *Neurol Clin*, 27 pp. 865-880

Kuniishi, H., Ichisaka, S., Yamamoto, M., Ikubo, N., Matsuda, S., Futora, E., Harada, R., Ishihara, K. and Hata, Y. (2017). Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. *Neuroscience Research*, in press.

Lidster, K., Jefferys J. G., Blümcke, V., Crunellid, Paul Flecknelle, Bruno G. Freguelli (2015) Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *Journal of Neuroscience Methods* 260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.09.007>

Liu, R. S., Lemieux, L., Bell, G. S., Hammers, A., Sisodiya, S. M., Bartlett, P. A., et al. (2003). Progressive neocortical damage in epilepsy. *Ann Neurol.*, 53, 312-324.

López-López, D., Gómez-Nieto, R., Herrero-Turrión, M J., García-Cairasco, N., Sánchez-Benito, D., Ludeña, M.D., et al. (2015). Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior* 71: 226-237.

Mazarati, A.M., Shin, D., Kwon, Y.S., Bragin, A., Pineda, E., Tio, D. et al. (2009). Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy." *Neurobiology of Disease* 34(3): 457-461.

Mlsna, L. M. and Koh, S. (2013). Maturation-dependent behavioral deficits and cell injury in developing animals during the subacute postictal period. *Epilepsy Behav.* 29, 190-197.

- Muñoz, L.J., Carballosa-Gautam, M.M., Yanowsky, K., García-Atarés, N., López, D.E. (2017). The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy & Behavior* 71: 181-192. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>
- Narla C., Scidmore T., Jeong J., Everest M., Chidiac P., Poulter M.O. (2016). A switch in G protein coupling for type I corticotropin-releasing factor receptors promotes excitability in epileptic brains. *Sci Signal.* 14; 9 (432). doi: 10.1126/scisignal.aad8676.
- Novakova, B., Harris P.R., Reuber M. (2017). Diurnal patterns and relationships between physiological and self-reported stress in patients with epilepsy and psychogenic non-epileptic seizures *Epilepsy & Behavior* 70 (2017) 204–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.03.006>
- Pereira-Figueiredo, I., Sancho, C., Carro, J., Castellano, O., López, D.E. (2014). The Effects of Sertraline Administration from Adolescence to Adulthood on Physiological and Emotional Development in Prenatally Stressed Rats of both Sexes. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 260. doi:10.3389/fnbeh.2014.00260
- Pereira-Figueiredo, I., Carro, J., Muñoz, L.J., Sancho, C., Castellano, O., Gómez-Nieto, R., et al. (2015). Sex Differences in the Effects of Sertraline and Stressors in Rats Previously Exposed to Restraint Stress. *J. Biomed Sci. Eng.* 8, 399-419. doi:10.4236/jbise.2015.87038
- Pereira-Figueiredo, I., Castellano, O., Riobos, A.S., Ferreira-Dias, G., López, D.E., et al. (2017). Long-Term Sertraline Intake Reverses the Behavioral Changes Induced by Prenatal Stress in Rats in a Sex-Dependent Way. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00099>
- Prut, L. and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463, 3-33.
- Salari, A-A., Bakhtiari, A. and Homberg, J. R. (2015). Activation of GABA-A receptors during postnatal brain development increases anxiety-and depression-related behaviors in a time-and dose-dependent manner in adult mice. *European Neuropsychopharmacology* 1k.
- Suleymanova, E.M., Gulyaev, M.V. and Abbasova, K.R. (2016). Structural alterations in the rat brain and behavioral impairment after status epilepticus: and MRI Study. *Neuroscience*, 315, 79-90.
- Swaab D.F., Bao, A.-M., Lucassen P.J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews* 4(2): 141-94. doi: 10.1016/j.arr.2005.03.003
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J. and Vale, W.W. (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3), 165-186.

Terranova, J.I., Song, Z., Larkin, T.E., Hardcastle, N., Norvelle, A., Riaz, A. and Albers, H.E. (2016). Serotonin and arginine-vasopressin mediate sex differences in the regulation of dominance and aggression by the social brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 46, 233-238.

Testa, S.M., Krauss, G.L., Lesser, R.P., Brandt, J. (2012) Stressful life event appraisal and coping in patients with psychogenic seizures and those with epilepsy. *Seizure-Eur J Epilepsy*; 21:282–7.

Titiz, A. S., Mahoney, J. M., Testorf, M. E., Holmes, G. L. and Scott, R. C. (2014). Cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: role of online and offline processing of single cell information. *Hippocampus*, 24, 1129-1145.

Valentino, R.J. and Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 2008, 583(2–3), 194-203.

van Campen, J.S., Jansen, F.E., de Graan, P.N.E., Braun, J.P.J. and Joels, M. (2014). Early life stress in epilepsy: A seizure precipitant and risk factor for epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior*, 38, 160-171.

Vinogradova L.V. (2008) Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: Kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia*, 49(10):1665–1674, doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01617.x

von Kanel, R., Kudielka, B.M., Haerberli, A., Stutz, M., Fischer, J.E., Patterson S.M. (2009). Prothrombotic changes with acute psychological stress: Combined effect of hemoconcentration and genuine coagulation activation. *Thrombosis Research*; 123(4): 622-30. doi:10.1016/j.thromres.2008.05.014

