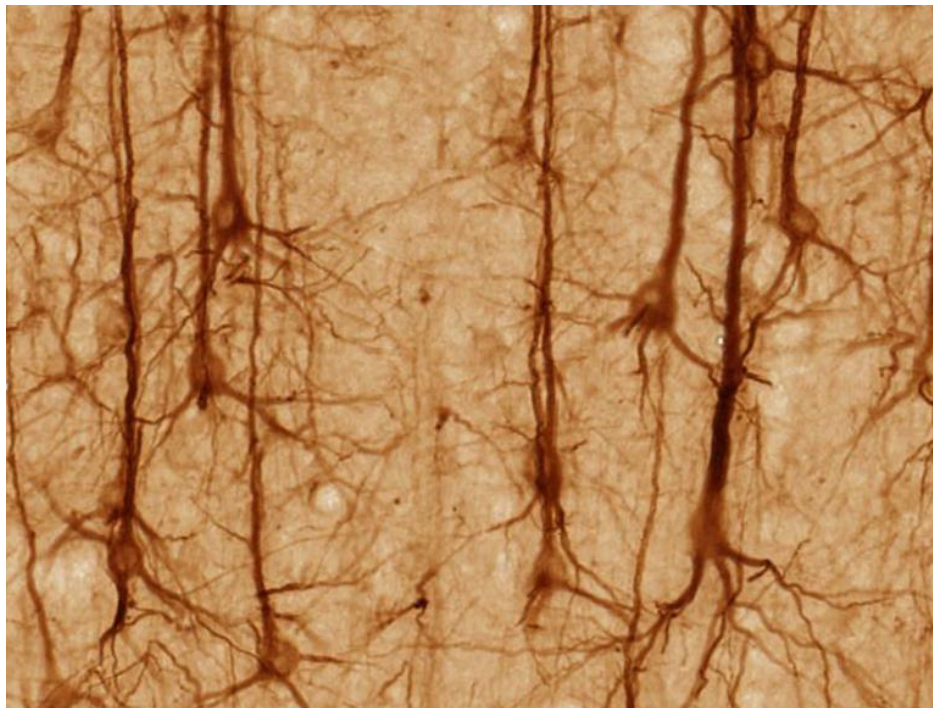


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DPTO. FARMACOLOGÍA**



**TRABAJO FIN DE GRADO JULIO 2014**

**MODELOS EXPERIMENTALES DE KINDLING  
PARA EL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA**



**Marta Delgado Jiménez  
Tutor: Prof. Luis García García**

## Índice

• Objetivos.....	1
• Epilepsia.....	2
○ Definición y causas.....	2
○ Alteraciones neuroquímicas.....	2
○ Tipos de epilepsia.....	5
○ Epilepsia del lóbulo temporal.....	6
○ Tratamiento farmacológico de la epilepsia.....	6
• Modelos experimentales de epileptogénesis.....	7
○ Modelos de status.....	7
○ Modelos de kindling.....	8
• Kindling eléctrico.....	12
• Kindling químico.....	15
○ Kindling: Cambios fisiopatológicos.....	18
○ Mecan. de activación de los sist. excitatorios.....	18
○ Creación de nuevos circuitos neuronales.....	20
○ Fallo en los sistemas de inhibición.....	21
○ Neurodegeneración y alteraciones metabólicas.....	22
• Conclusiones.....	25
• Bibliografía.....	26

## Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en describir el fenómeno denominado *kindling* (a veces llamado en castellano “fenómeno de encendido”). El *kindling* es un procedimiento empleado extensamente como modelo experimental *in vivo* de epilepsia del lóbulo temporal.

Para ello, se lleva a cabo una revisión e investigación bibliográfica de los diversos métodos existentes en la actualidad para la generación de este modelo.

Se realiza una investigación de los métodos de generación del fenómeno *kindling*, que básicamente se divide en dos grandes grupos: modelos de *kindling* eléctrico y de *kindling* químico:

- El modelo de *kindling* eléctrico, se caracteriza por la implantación quirúrgica, de forma crónica en el animal de experimentación (habitualmente rata), de uno o más electrodos intracraneales, lo que permite una estimulación eléctrica a través de ellos, que a la vez facilita el registro electroencefalográfico de los eventuales cambios eléctricos que tienen lugar.
- El *kindling* químico, se lleva a cabo por inducción mediante la administración, bien sistémica, bien intracerebral, de diversos agentes excitatorios.

Además, en el presente trabajo se comparan las características del *kindling* con la epilepsia, sobre todo en aquellas áreas en las que éste proceso se ha utilizado como una herramienta para un mejor entendimiento de la epilepsia humana.

Por último, los diversos modelos de *kindling* permiten conocer la neuropatología asociada a esta enfermedad, en cuanto a los cambios producidos tanto a nivel molecular, como cerebral.

Todo ello ha llevado a considerar este modelo experimental como un modelo adecuado y de especial valor, con el que evaluar potenciales fármacos con actividad antiepiléptica.

# Epilepsia

## **Definición y causas**

La epilepsia es un desorden neurológico crónico, que cuenta, actualmente, con una prevalencia alrededor de 50 millones de personas en el mundo, y que puede ser prevenido y tratado de forma efectiva. Es el trastorno cerebral serio más común mundialmente, no estando relacionado con la edad, la raza, la clase social o la situación geográfica. Al menos, el 50% de los casos comienza en la infancia o la adolescencia, con mayor proporción de casos en la infancia o en la tercera edad.

Las principales causas suelen ser:

1. Genéticas-hereditarias, que incluyen anomalías cromosómicas. También puede ser debido a defectos del desarrollo cerebral, como malformaciones del SNC.
2. Origen secundario, consecuencia de efectos tóxicos de drogas, anoxia cerebral aguda, traumatismo craneoencefálico, infecciones del SNC, como encefalitis virales bacterianas o micóticas, neoplasias del SNC, o enfermedades cerebrovasculares (como ictus cerebral).

A nivel clínico, la epilepsia se caracteriza por la aparición recurrente de crisis espontáneas.

## **Alteraciones neuroquímicas subyacentes en la epilepsia**

Aunque no se conoce el trasfondo subyacente, estas crisis epilépticas son el fenómeno clínico resultante de una hiperexcitabilidad neuronal, es decir, una descarga anormal e hipsincrónica de la población neuronal, debida a un desequilibrio entre los mecanismos excitatorios (mediados fundamentalmente por la transmisión glutamatérgica) e inhibitorios cerebrales (en los que está implicado el sistema GABAérgico). Básicamente, se asume que la epilepsia está asociada a una disminución de los mecanismos inhibitorios centrales y/o a un aumento en la actividad excitatoria:

1. *Disminución de los mecanismos inhibitorios centrales:* el neurotransmisor GABA tiene como función principal regular negativamente los fenómenos excitatorios cerebrales. El receptor GABA<sub>A</sub> es un receptor inhibitorio de tipo LGIC, cuya

activación por GABA origina una corriente hiperpolarizante debido a la entrada al interior neuronal del ión cloro. Estos receptores pentaméricos son estructuras complejas, presentando numerosos sitios de modulación (de benzodiazepinas, de neuroesteroides, de barbitúricos, etc.). Al unirse el GABA a su sitio, se produce la apertura del canal, ingresa  $\text{Cl}^-$  al interior celular, ocasionando finalmente, la hiperpolarización de la membrana celular, e inhibe la descarga neuronal. Los receptores  $\text{GABA}_B$  son GPCR inhibitorios localizados principalmente en médula espinal, cuya activación fundamentalmente incrementa la permeabilidad al  $\text{K}^+$ .

2. *Aumento de la actividad excitatoria glutamatérgica central*: El glutamato es el principal neurotransmisor central excitatorio. Al igual que para el GABA existen dos grandes grupos de receptores:

- a. **Metabotrópicos**, que son receptores acoplados a proteínas G (GPCR),
- b. **Ionotrópicos**, de respuesta rápida. Estos receptores son canales iónicos activados por ligando (LGIC) de estructura tetramérica. A su vez se dividen en 3 subtipos en función de ligandos específicos que activan dichos subtipos: receptores kainato, AMPA y NMDA. Cuando son activados, permiten el paso de cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de estos receptores induce la apertura del canal iónico central que da origen a una despolarización rápida y su consiguiente excitación neuronal.

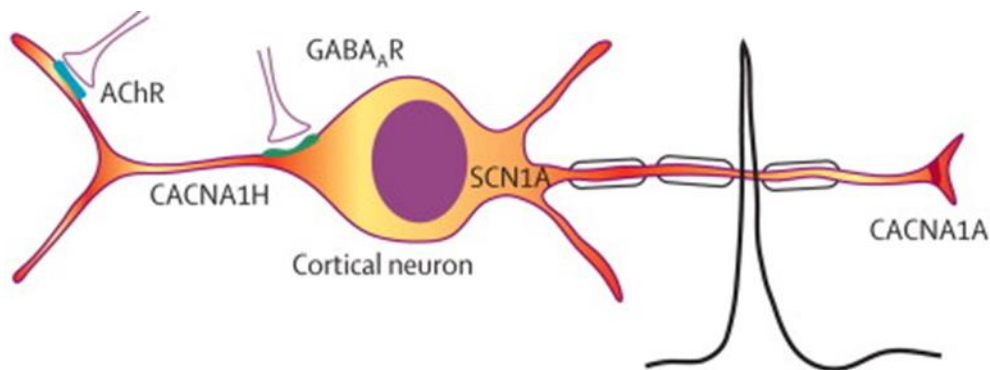


Fig 1. Representación esquemática de las diferentes aferencias excitatorias e inhibitorias de una típica neurona glutamatérgica cortical. AChR: Recept. Colinérgico,  $\text{GABA}_A$  R: Recept.  $\text{GABA}_A$ , CACNA1H: Canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, CACNA1A: Canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q, SCN1A: Canal de  $\text{Na}^+$ . Tomado de Crompton y Berkovic. Lancet Neurol. 2009, 8(4).

De estos receptores, el que ha recibido una mayor atención en la epileptogénesis son los receptores NMDA. Estructuralmente y de forma similar a los receptores GABA<sub>A</sub>, presentan una estructura compleja con diferentes sitios de modulación, que dan lugar a potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) lentos y presentan una mayor permeabilidad al ion Ca<sup>2+</sup> en relación a los otros dos subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato. Estos receptores se distribuyen ampliamente en el SNC, localizándose en las estructuras claves implicadas en la epileptogénesis, como son el hipocampo y la corteza cerebral. La activación de los mismos produce un patrón de descargas intermitentes, similares a la actividad que se observa durante la descarga de un foco epiléptico. Además, se ha implicado de manera muy activa a estos receptores NMDA en procesos de plasticidad sináptica y neurodegeneración.

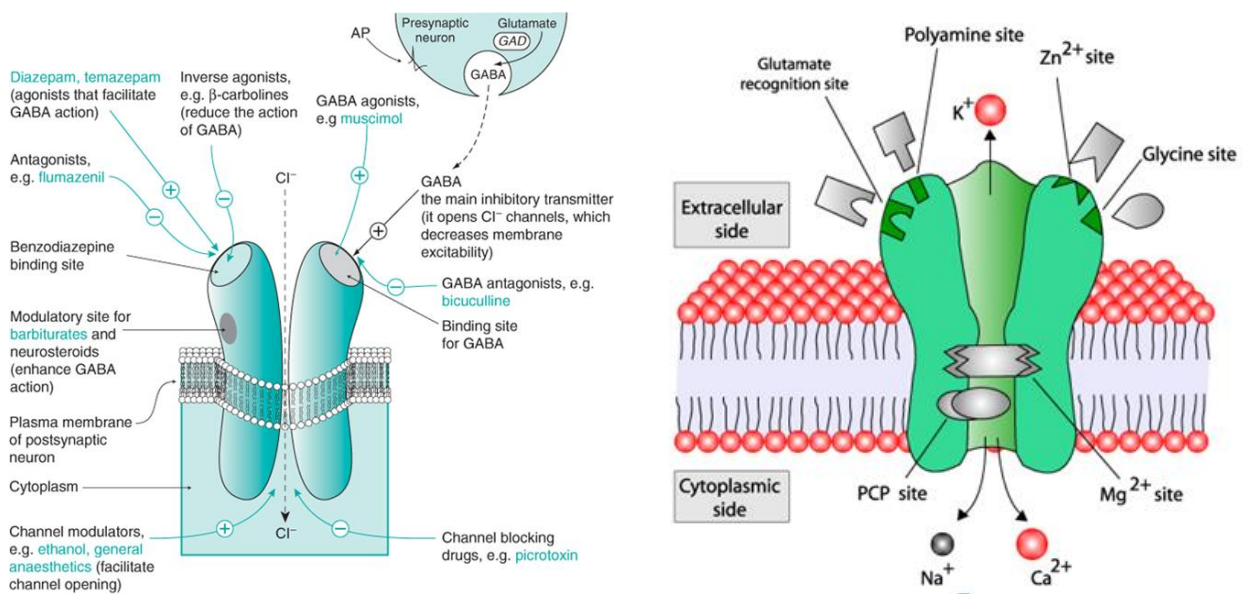


Fig. 2. Representación esquemática del receptor GABA<sub>A</sub> (izquierda) y del receptor NMDA de glutamato (derecha), mostrando los diversos moduladores de su actividad

## **Tipos de epilepsia**

La epilepsia se clasifica en dos grandes grupos, en función de las características de las crisis más que en la patología subyacente: si se originan localmente (epilepsia focal o parcial) o bien en todo el encéfalo (crisis generalizadas).

- ❖ Crisis parciales
  - Crisis parciales simples: preservación de la conciencia. Los síntomas dependen del área del cerebro involucrada.
    - Con signos motores
    - Con alucinaciones somatosensoriales o sensoriales especiales
    - Con signos y síntomas autonómicos
    - Con síntomas psíquicos
  - Crisis parciales complejas
    - De inicio como parcial simple seguida de alteración de la conciencia
    - Con trastorno de conciencia desde el inicio
  - Crisis parciales con generalización secundaria
    - Crisis parciales simples que se generalizan
    - Crisis parciales complejas que se generalizan
    - Crisis parciales simples que evolucionan a complejas y se generalizan
- ❖ Crisis generalizadas: tienen un comienzo simétrico bilateral. Pueden contar con la participación del sistema motor y normalmente van asociadas a pérdida de conciencia. Entre las crisis generalizadas destacan:
  - Ausencias, el que el individuo deja bruscamente de hacer lo que estaba haciendo, permaneciendo ausente durante unos segundos. Habitualmente no presenta ninguna alteración motora, siendo más habitual en niños.
  - Crisis tónico-clónicas, con la aparición de una fase tónica caracterizada por espasmo corporal generalizado, seguida de sacudidas violentas y sincrónicas.
  - Otras: Crisis atónica, mioclínica, etc
- ❖ Crisis no clasificables.

### **Epilepsia del lóbulo temporal**

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia focal de adulto más común y resistente a fármacos. El foco epiléptico reside en las estructuras temporales, como el hipocampo y la amígdala; las crisis son parciales complejas, acompañadas por automatismos. Aunque la etiología es heterogénea, los pacientes con este tipo de epilepsia suelen tener un pasado en el que aparecieron crisis febriles prolongadas o status epilepticus. La ELT se desarrolla ante una susceptibilidad a las convulsiones, posiblemente resultante de muerte neuronal de estas zonas cerebrales; aunque también puede asociarse a otros cambios como alteraciones en los receptores y canales.

Nos centramos en este tipo de epilepsia, ante las similitudes neurofisiológicas y morfológicas que aparecen entre un hipocampo tratado con kindling y el hipocampo de pacientes con ELT. El kindling es el modelo crónico más usado en la ELT, porque es particularmente fácil provocar convulsiones mediante estimulación hipocampal o límbica. Las características del comportamiento de las crisis generadas se parecen a las convulsiones límbicas parciales, incluyendo la generalización secundaria, como se observa en la epilepsia del lóbulo temporal humano.

### **Tratamiento farmacológico de la epilepsia**

El tratamiento farmacológico para el control de la epilepsia se basa en cuatro mecanismos:

- *Potenciación de la inhibición sináptica mediada por GABA*: Bien disminuyendo el metabolismo del GABA (valproato o vigabatrina), o activando el GABA<sub>A</sub> (barbitúricos, benzodiazepinas, felbamato, topiramato).
- *Inhibición de los canales de iones Na<sup>+</sup>*: carbamazepina, valproato, lamotrigina, felbamato, topiramato;
- *Reducción o inhibición del flujo de Ca<sup>2+</sup>*: Bloqueando los canales de calcio tipo T: valproato, etosuximida, trimetadiona, zonisamida.
- *Reducción de la actividad glutamatérgica*. Aunque existen ciertos fármacos (topiramato y felbamato) que presentan cierta capacidad de reducir la actividad glutamatérgica, en la actualidad no se han conseguido fármacos anticonvulsivantes eficaces que actúen exclusivamente por este mecanismo.



## Modelos experimentales de epileptogénesis

Existe una gran variedad de modelos animales desarrollados para investigar la epilepsia (estimulación eléctrica, por administración de agentes farmacológicos, modelos genéticos, por trauma craneal, isquemia, síndrome de retirada de alcohol, etc); de los modelos que más se utilizan se encuentran el kindling y el status epilepticus. Ambos modelos proporcionan un medio fiable para inducir una epileptogénesis persistente, aunque cada uno cuenta con sus propias características (Figura 3).

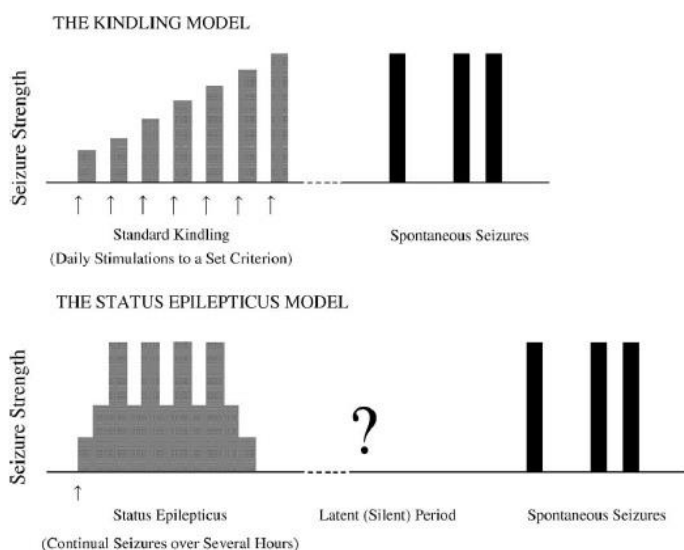


Fig. 3. Comparación del desarrollo de los modelos de kindling y status. Se observa un incremento gradual de la sensibilización en el caso de kindling hasta que aparecen crisis espontáneas, mientras que hay un periodo asintomático desde la aplicación del estímulo convulsivo hasta la aparición de crisis espontáneas en el caso de los modelos de status. Tomado de Morimoto, 2004.

### Modelos de status

Se caracteriza por convulsiones continuas y recurrentes, generadas por la administración sistémica o central de agentes convulsivantes. Entre los distintos modelos de status destacan el inducido por la administración de ácido kaínico y de pilocarpina.

El ácido kaínico o kainato es un agonista del subtipo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos que llevan su mismo nombre. Estos receptores son especialmente abundantes en estructuras límbicas, como el hipocampo. Es un agente que se emplea para generar un modelo crónico de ELT adquirida. Se puede administrar intracerebral o bien de forma sistémica y existen distintos protocolos, de administración única o repetida.

Por otro lado, la pilocarpina es un alcaloide parasimpaticomimético, que actúa a nivel de los receptores muscarínicos; cuando es administrado a dosis elevadas presenta intensos efectos convulsivantes. Existen dos variantes para este modelo: la administración

sistémica en dosis de 300-400 mg/kg y la administración a dosis de 30-60 mg/kg, precedida 24 horas antes por una inyección de cloruro de litio (3 mEq/kg), lo cual crea sensibilización frente a los efectos de la pilocarpina, reduciendo la dosis necesaria por un factor de 10. En ambos casos, previo a la inducción de status, se administra metilscopolamina (antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos), con el fin de reducir las alteraciones periféricas asociadas al incremento del tono colinérgico. En este modelo, tras la aparición del status (aprox. 30-45 min. después de la administración de pilocarpina) existe un periodo silente de 1 mes, a partir del cual los animales desarrollan crisis espontáneas.

Los cambios morfológicos que se producen en el hipocampo son bastante similares a los observados en la ELT en humanos, aunque el daño producido en el animal cabe ser más severo. Se observa muerte neuronal en hipocampo asociada a activación glial.

A diferencia de los modelos de kindling, el modelo de status epilepticus y sus resultados son más fáciles y rápidos de producir (con una única administración es suficiente). Sin embargo, presentan como inconvenientes el hecho de que son modelos difíciles de controlar, con una elevada variabilidad en su expresión, presentando además una elevada mortalidad.

### **Modelos de kindling**

El descubridor de este fenómeno fue Goddard en 1969, al estudiar los efectos que sobre el aprendizaje producía estímulos eléctricos repetidos en la amígdala. De forma inesperada, observó que la administración repetida de dichos estímulos, daba lugar a una progresiva sensibilización, generando crisis que eventualmente desembocaban en convulsiones generalizadas.

El kindling o “encendido” fue presentado inicialmente como un fenómeno que permitía generar convulsiones focales, con el fin de inducir un cambio progresivo en la respuesta, mediante la aparición de postdescargas (PD). Como ya se ha mencionado, tras la estimulación repetida, comienzan a aparecer crisis convulsivas de forma espontánea.

Tal como demostró Goddard, una estimulación eléctrica no-polarizante es capaz de causar alteraciones permanentes en la función cerebral, acompañada de convulsiones, responsables del establecimiento de actividad epileptiforme. Los umbrales para la generación de PDs pueden ser disminuidos en la amígdala y el hipocampo mediante

estimulación eléctrica repetida; lo que conlleva la posibilidad de provocar cambios físico-químicos, como variaciones en la permeabilidad de la membrana. Pero además, el kindling, no solo origina una reducción del umbral al estímulo convulsivo, sino que induce modificaciones transinápticas permanentes en la organización de la red neuronal.

Más tarde, Racine en los años 70, estudió el desarrollo de las convulsiones motoras como patológico, en el sentido que no ocurre en un animal normal. Racine observa que, en general, no hay propagación desde las estructuras primarias a las secundarias; sin embargo, de forma independiente, aparecen descargas en las estructuras secundarias, siguiendo a las de las primarias. Por el contrario, cualquier proceso que cause el desarrollo de una descarga en un foco secundario no producía un efecto recíproco.

Por otro lado, el desarrollo de crisis motoras requiere desencadenar PDs repetitivas gracias a una estimulación reiterada, con cambios permanentes en las características subcorticales. Se concluye que inicialmente, la actividad convulsiva comienza tras 30 seg de PD. Cuando la convulsión motora está ya desarrollada, la latencia disminuye hasta que las convulsiones comienzan durante la estimulación con un retraso de milisegundos.

La estimulación eléctrica diaria de la amígdala y del hipocampo mediante electrodos implantados, a intensidades suficientes para generar PDs, resulta en el desarrollo de convulsiones motoras en estas áreas. Además, se encontró que si se estimulaba más de un área, se incrementaba la velocidad de desarrollo de la convulsión, mientras que las conexiones interlímbicas interrumpidas lo reducen.

En resumen, el kindling se basa en una inducción repetida de descargas focales que producen un incremento permanente, elevado y progresivo en la respuesta epiléptica o en la susceptibilidad para inducir una estimulación. El proceso de inducción a la epilepsia por kindling se inicia mediante una aplicación periódica de un breve estímulo que provoca picos epilépticos repetitivos (PDs; figura 4), acompañadas de una breve crisis de comportamiento, aunque las respuestas de las primeras etapas suelen ser de inmovilidad, poco observables. Los eventos fisiológicos de la PD incluyen sincronización y descargas repetitivas de la red neuronal. Con estimulaciones repetidas, la respuesta comienza a ser generalizada, con crisis tónicas bilaterales. El umbral convulsivo se reduce durante el curso del kindling y una vez las crisis generalizadas se han establecido, las alteraciones persisten durante meses o años. El incremento producido en la susceptibilidad para

generar crisis adicionales es permanente, mientras que las crisis espontáneas son la manifestación del estado epiléptico crónico.

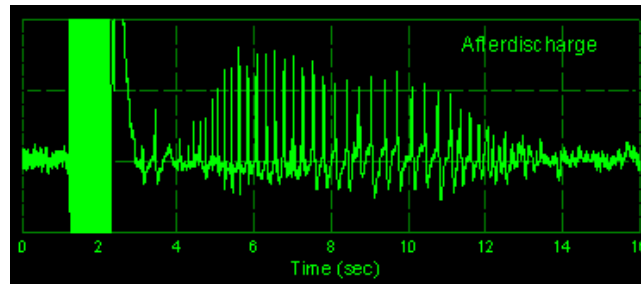
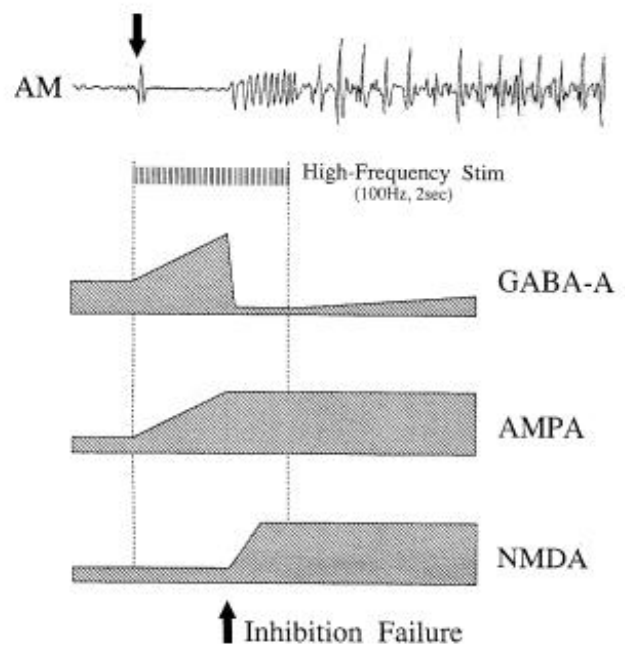


Fig. 4. Se muestra un registro EEG hipocampal, tras la aplicación de un tren de 60Hz de 1 segundo de duración (bloque sólido verde). Tras un breve aplanamiento de la respuesta (entre los segundos 2 y 4) se observa una descarga brusca de PD de 3 Hz (6 picos cada 2 segundos), para luego ir desapareciendo.

Este fenómeno puede ser considerado como un proceso de plasticidad y epileptogénesis inducida por crisis, que evoluciona gradualmente y culmina con la aparición de crisis espontáneas y el establecimiento del estado epiléptico. El desarrollo progresivo de la epileptogénesis por kindling es fácilmente observable en un registro EEG.

Al igual que en la epilepsia, el kindling induce un desequilibrio entre la excitabilidad glutamatérgica y la inhibición GABAérgica. Así que la hiperactivación de los receptores AMPA y NMDA es capaz de propagar las PDs a otros lugares remotos del cerebro (corteza motora, tálamo, ganglios basales).

Fig. 5. EEG durante una estimulación de alta frecuencia (100 Hz, 2s) de una amígdala de una rata con kindling (AM). La flecha indica el inicio de la estimulación. Durante la estimulación, se ven 3 componentes: 1- el potencial generado inicial; 2- supresión de EEG; y 3- descarga sincrónica rítmica eventual, seguida de PD. Se muestra el fracaso del sistema de inhibición GABAérgico, lo que origina una activación de los receptores AMPA y NMDA, siendo éste último causante de los cambios que sobre la plasticidad sináptica origina el proceso de kindling.



A medio y largo plazo, cuando la actividad convulsiva focal se ha prolongado y generalizado, tienen lugar los cambios en la red neuronal debido a neurogénesis, sinaptogénesis y aparición de astrogliosis.

La estimulación subumbral no parece contribuir al desarrollo de las crisis o a cambios en las características de la PD; y estimulaciones de intensidad muy elevada no son más efectivas que la estimulación de baja intensidad, siempre que se genere una PD.

En la mayoría de los estudios de kindling, las investigaciones continúan el estímulo del animal hasta desarrollar una crisis convulsiva de estadio 5. Esta clasificación se la debemos a Racine (1972) y se basa en los estadios convulsivos durante el kindling de la estimulación de la amígdala.

- Estadio 1 y 2: se asocian a actividad facial y oral, incluye cierre de ojos ipsilateral y parpadeo, seguido de agitación de cabeza y babeo.
- Estadio 3: clonus de extremidades anteriores.
- Estadio 4: las convulsiones se generalizan, presentan clonus más fuertes y comienzan a levantarse.
- Estadio 5: levantamiento dramático y caída. Aparición de convulsiones tónico-clónicas generalizadas que incluyen las 4 extremidades.

Cuando el kindling diario es repetido durante muchas semanas o meses, en función de la zona donde se realice, comienzan a aparecer crisis convulsivas adicionales, espontáneas. Pinel y Rovner mostraron la idea de que el kindling podría progresar desde el estadio 5 a estadios 6-8, al incluir respuestas más severas, características del tronco cerebral. Sin embargo, el sitio aparente de inicio de los ataques espontáneos y el estadio de las convulsiones era impredecible. La imprevisión de los ataques espontáneos y su inicio electrográfico se han recogido recientemente, usando modelos del status.

A pesar de que este proceso es generalmente inducido por estimulación eléctrica repetida, algún método experimental que provoque repetidamente breves PDs en el circuito neuronal induce las alteraciones progresivas funcionales que definen el fenómeno.

Todas las especies conocidas de animales mostradas hasta la fecha muestran el fenómeno kindling; sin embargo, sólo se van a describir las preparaciones necesarias para el kindling en la rata, dado el mayor conocimiento acerca del genoma y las características biológicas del animal.

El kindling eléctrico y químico se usan como modelos de epilepsia compleja parcial con generalización secundaria. Este tipo de epilepsia se considera como la más refractaria a la terapia antiepiléptica. El desarrollo farmacológico de estas terapias está basado en los mecanismos fundamentales del kindling y las pruebas preclínicas de detección han incorporado este modelo.

## Kindling eléctrico

El kindling eléctrico, frente al químico, conlleva que el animal debe tener quirúrgicamente implantado, de forma permanente, uno o más electrodos intracraneales. Existen multitud de métodos quirúrgicos, pero la mayoría de los aspectos del procedimiento son similares; el más comúnmente utilizado es el sistema de Molino y McIntyre. Los sitios más comunes utilizados para la inducción de este kindling incluyen amígdala, hipocampo, bulbo olfatorio y corteza perirrinal. Se ha observado que los estimulación hipocampal y amigdaloides da lugar al desarrollo de crisis motoras mucho más rápido que en aquellos sujetos que fueron estimulados en otras estructuras.

El rango de los parámetros de estimulación eléctrica que induce PDs y provoca convulsiones fue caracterizado por Goddard. Suelen utilizarse pulsos bipolares para minimizar el potencial del daño tisular que aparecería en el sitio de la estimulación como resultado de un flujo de corriente unidireccional.

El correcto emplazamiento de los electrodos en las regiones neuroanatómicas deseadas requiere un aparato estereotáxico y un atlas estereotáxico del cerebro, específico de la especie animal empleada. El punto de referencia puede ser la línea interaural o la sutura bregma (Figura 6. A) en la parte dorsal del cráneo, que debe estar completamente horizontal y paralela a la placa base del instrumental estereotáxico. Es importante posicionar la cabeza del animal con una simetría bilateral y en un correcto ángulo de inclinación. Se comienza anestesiando a la rata bien y, a continuación, se realiza una incisión en la cabeza para dejar a la vista el cráneo. De esta manera, se visualiza la bregma, la sutura media y el punto lambda, necesarios para situar correctamente los electrodos en función de las coordenadas derivadas del atlas estereotáxico. A continuación, se realizan

los agujeros para los electrodos y los tornillos, que ayudarán al mantenimiento del electrodo tras la adición de acrílico dental.

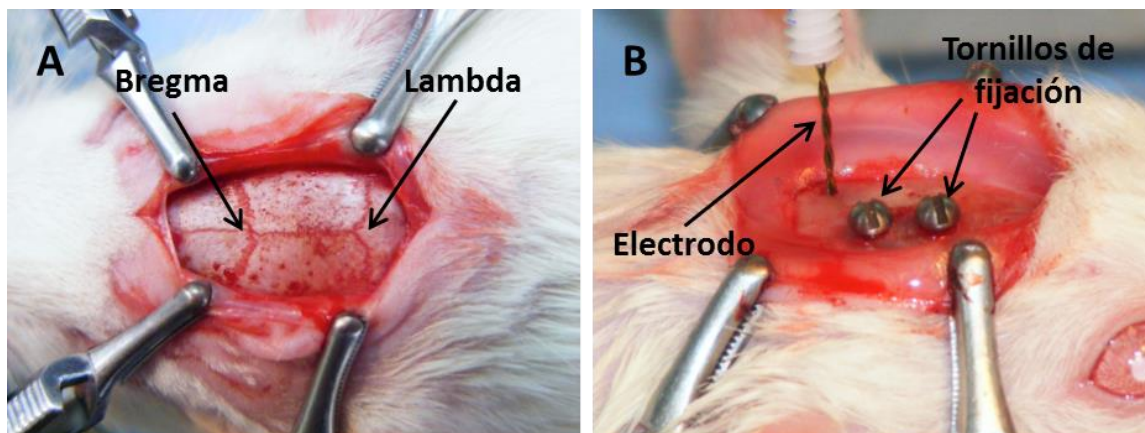


Fig. 6. **A.** Cráneo de rata en el que se observa los puntos de referencia bregma y lambda, además de la sutura media. **B.** Colocación de los electrodos y los tornillos en el cráneo. Fotografías cedidas por P. Bascañana de la Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar UCM, Madrid.

Una vez seco el cemento dental, se cose la incisión para cerrar la apertura lo máximo posible. Se administran analgésicos y antibióticos para reducir la inflamación y el dolor y minimizar el riesgo de infección, antes de someter a los animales al proceso de kindling.

Tras la implantación quirúrgica de electrodos bipolares en la estructura cerebral determinada con elevada sensibilidad, como la amígdala o el hipocampo, una descarga breve de corriente eléctrica de suficiente intensidad desencadenará una PD, que comienza el proceso de epileptogénesis. Los pulsos de onda, sinusoidales o bifásicos, son liberados a través del electrodo implantado usando un estimulador de corriente constante durante 1 segundo o más. La selección de la intensidad de los estímulos para el kindling se basa primero, en determinar el umbral de PD, que es la intensidad del estímulo que desencadenará una PD, y seguirá presente tras el estímulo durante cierto tiempo, para posteriormente aplicar los estímulos correspondientes. También se pueden emplear estímulos de intensidad mucho mayor, que generan la máxima respuesta posible. Sin embargo, una estimulación de baja frecuencia también es capaz de activar a la rata, si la intensidad de corriente es extremadamente alta y con una duración larga.

El umbral de PD es una característica muy importante para la red de convulsión focal. La técnica más común para determinar este umbral es usando un método ascendente de límites. En el procedimiento original de Racine (1972), se comienza con una baja intensidad de 10  $\mu$ A; si no desencadena una PD, la intensidad se duplica para el siguiente

ensayo. La PD real se determina como la mitad entre la intensidad que genera la PD y la anterior inmediata evaluada que no lo hizo.

Existe otro método más conveniente, que comienza con una intensidad baja de 15  $\mu\text{A}$ , y se va incrementando mediante valores predeterminados hasta que aparece la PD, que genere la convulsión.

Es importante destacar que los umbrales de PD en la mayoría de las estructuras límbicas y corticales continúan disminuyendo durante todo el proceso de kindling; por lo que, en vez de administrar una estimulación de kindling diaria en el valor del umbral, las ratas pueden ser estimuladas primero a una intensidad más baja; si ésta es insuficiente, 1 minuto después se administra el siguiente valor más alto, hasta que la PD es desencadenada.

Existen ciertos inconvenientes en el uso de este modelo, que incluyen principalmente:

- Un trabajo intensivo y laborioso, dado que los electrodos deben ser implantados en el cerebro de cada animal, además del procedimiento de estimulación para la inducción.
- Los costes asociados con el tiempo prolongado para la inducción, ya que las crisis espontáneas no se desarrollan hasta un elevado número de estimulaciones.

Estas limitaciones contribuyen a un uso poco frecuente de este modelo. La necesidad de implantar electrodos es la desventaja más significativa, debido a la fragilidad del cráneo y el crecimiento del animal; por ello, se utilizan ratas adultas, mejor que crías o ratones.

A pesar de esto, existen muchas ventajas para el estudio de la epileptogénesis:

- En comparación con los modelos de status, el proceso de inducción se controla muy fácilmente, y conlleva una mínima mortalidad.
- Permite conocer el número de crisis, como variable a relacionar con las alteraciones celulares y moleculares y para la valoración de las consecuencias de las crisis en neuronas, circuitos neuronales y funciones de orden mayor.
- Permite medir de forma precisa y reproducible la velocidad de kindling, para apreciar cómo las manipulaciones experimentales modifican este parámetro de susceptibilidad epiléptica.
- La susceptibilidad epileptogénica puede ser medida mediante el número de crisis repetidas necesarias para provocar una convulsión de clase 5.



- El desarrollo gradual y la progresión de la epileptogénesis por kindling puede ser relativamente cualificado a través de medidas electrográficas (duración y número de PDs) y de comportamiento (estadios). La activación focal es muy precisa, se realiza solamente los lugares diana del cerebro, a través de los electrodos implantados.

## Kindling químico

Este tipo de kindling es similar al kindling eléctrico en cuanto al desarrollo gradual de las crisis electrográficas y de comportamiento, que ocurre con estimulación repetida; pero en el caso del kindling químico, se utiliza la química como fuente de activación del circuito neuronal. Al igual que en el kindling eléctrico, las principales características del kindling químico son el desarrollo de convulsiones conductuales, la reducción del tamaño del umbral y una mayor sensibilidad a estímulos que inducen crisis.

El kindling químico puede ser producido por administración intracerebral directa de bajas dosis de agentes excitatorios (tabla 1), aunque lo más rutinario debido a su facilidad, es mediante la administración sistémica repetida de agentes convulsivantes a concentraciones subumbrales (tabla 2).

El modelo de kindling químico se fundamenta en la administración de dosis subconvulsivas de forma repetida administradas de dichos agentes. Las ratas activadas por kindling mediante una administración repetida de concentraciones subumbrales de fármacos convulsivantes, sistémicamente o directamente a nivel cerebral, requieren muchas estimulaciones para alcanzar las convulsiones generalizadas, posteriormente transformadas en una corriente estándar de kindling.

En un experimento de kindling químico típico, los animales son inyectados a tiempos determinados con fármacos con propiedades convulsivantes, a concentraciones por debajo del umbral. Se observa a los sujetos: sus manifestaciones de hiperexcitabilidad y su actividad convulsiva. La velocidad de desarrollo de este kindling puede ser variable, en función del fármaco, la dosis, la vía de administración, la duración del tratamiento y el intervalo entre administraciones.

<b>Agentes</b>	<b>Zona/especies</b>	<b>Intervalo</b>
Aminoácidos excitatorios: Glutamato/aspartato, NMDA	Amígdala Rata	48 horas
Opiáceos: $\beta$ -endorfina, met-enkefalina	Amígdala, hipocampo Rata	48 horas
Agonistas colinérgicos: Carbacol, acetil- $\beta$ -metilcolina, muscarina, pilocarpina, fisostigmina	Amígdala, hipocampo, ventrículo Ratas	24-48 h
Nucleótidos cíclicos: AMPc	Amígdala/ Rata	48 horas
Antagonistas GABAérgicos: Pentilentetrazol (PTZ), picrotoxina, bicuculina, $\beta$ -carbolina.	Amígdala Rata	48-96 horas

Tabla 1. Agentes usados para inducir kindling por administración intracerebral

<b>Agentes</b>	<b>Vía/Especies</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Nº tratamientos</b>
Antagonistas GABAérgicos	Intraperitoneal Rata, ratón, cerdo	24-96 h	12-127
Neurotoxinas: dieldrin, endosulfan, lindano, trimetilolpropano	Intraperitoneal, oral Rata	24-72 h	12-30
Anestésicos locales: Cocaína, lidocaína	Intraperitoneal, subcutáneo Rata, ratón	24 h	6-19

Tabla 2. Agentes usados para inducir kindling por administración sistémica

La administración sistémica de concentraciones subumbrales de agentes convulsivos es la forma más común de kindling químico. A los animales se les administra la dosis por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o por alimentación forzada, a intervalos de 24-72 horas. Se busca una aparición gradual de la activación convulsiva, a partir de ciertos indicios en el comportamiento, aunque son evaluaciones más subjetivas y menos cuantitativas que las electrográficas, pero también menos laboriosas.

Los parámetros registrados en este tipo de kindling incluyen: la severidad de la respuesta convulsiva, la frecuencia de ese comportamiento en un determinado período, la latencia

de aparición de las manifestaciones, la duración de éstas y el número de tratamientos farmacológicos que fueron necesarios administrar para inducir la respuesta.

De la gran variedad de agentes convulsivos que ejercen distintas acciones sobre el sistema nervioso central, que se utilizan para inducir el kindling químico mediante administración sistémica (Tabla 2), el más común es el pentiléntetrazol (PTZ). Es un bloqueante selectivo de los canales de cloro, acoplados a los receptores de GABA<sub>A</sub> y asociados con la reducción de la neurotransmisión mediada por GABA en el SNC. La principal ventaja de este fármaco es que su relación dosis-respuesta es muy gradual, de tal manera de una dosis permite identificar el subumbral para las convulsiones en todos los animales; proporciona una aparición gradual de la sensibilidad de convulsión fácilmente identificable, y con las repeticiones suficientes, la mayoría de los animales desarrollan las crisis clónicas.

Las ratas inyectadas con PTZ (15 mg/kg) una vez al día o 3 veces por semana mostraron convulsiones a partir de la segunda semana de tratamiento, en un 80-90%; las primeras requirieron una media de 29-35 inyecciones (diarias), mientras que las segundas solo necesitaron 13-15 inyecciones (una cada dos días). La intensidad de la convulsiones incrementaba con la administración de 30 mg/kg de PTZ.

En los animales tratados con PTZ, la susceptibilidad se mantiene durante varias semanas a pesar de administrar bajas dosis u otros inhibidores de la función central GABAérgica. No se encuentran demasiadas publicaciones de mortalidad asociada al uso del PTZ, pero las crisis severas y la muerte tienen mayor prevalencia con fármacos convulsivos con una curva dosis-respuesta con elevada pendiente.

Al contrario que la estimulación eléctrica focal, la administración sistémica de agentes químicos, como el PTZ, facilita el acceso a todas las áreas del cerebro, permitiendo la activación simultánea de todos los circuitos de convulsión.

La mayoría de los informes publicados para caracterizar la progresión motora del kindling químico se basan en la escala de 5 estadios de Racine; sin embargo, se han introducido ciertas modificaciones en este sistema para comprender mejor la progresión de las transiciones de comportamiento, que ocurren durante la exposición repetida, incluyendo estadios 6-8.

El kindling químico es un modelo muy sencillo de llevar a cabo en cualquier laboratorio. El kindling con PTZ es seguro y no requiere la implantación de electrodos permanentes. El fenómeno es altamente reproducible en laboratorios y especies, gracias a la multitud de artículos y publicaciones del modelo. La mortalidad es baja y con las repeticiones suficientes a los intervalos apropiados, la mayoría de los animales desarrollan crisis motoras generalizadas.

Sin embargo, estas ventajas tienen un coste. Comparado con el kindling eléctrico, este modelo permite un control mucho menos experimental en la sincronización de la generación de convulsiones, y la ausencia de registros electroencefalográficos no posibilita una evaluación de los parámetros que no se asocian con los signos clínicos.

Por otro lado, una competición directa en el lugar diana del cerebro, además de interacciones metabólicas periféricas directas, puede complicar la interpretación de resultados y generar diferencias entre los hallazgos del kindling químico y eléctrico.

## Kindling: Cambios fisiopatológicos

### Mecanismos de activación de los sistemas excitatorios

La mayoría de los estudios experimentales para generar epilepsia se centran en aumentar la transmisión de los sistemas de excitación neuronal, particularmente los sistemas glutamatérgicos. Estos mecanismos incluyen una variedad de elementos, como la liberación de neurotransmisores presinápticos, la sensibilidad del receptor postsináptico y el metabolismo alterado del glutamato.

✚ *Receptores de glutamato:* Como ya se ha mencionado, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y posee un elevado potencial despolarizante. La sobreexcitación de las neuronas por glutamato puede producir descargas epilépticas y una aplicación focal repetida en la amígdala puede inducir convulsiones y kindling. Los receptores AMPA median la mayoría de los PPSE más rápidos en la sinapsis del glutamato, si bien los receptores NMDA median los PPSE lentos y el flujo de  $Ca^{2+}$ , por lo que se supone que los primeros son significativos para la inducción de las descargas, mientras que los segundos son importantes para las alteraciones transinápticas de la epileptogénesis.

El desarrollo del kindling en la amígdala se puede ver retrasado si se administra un pretratamiento con antagonistas (competitivos o no competitivos) del receptor NMDA; lo que permite afirmar que la progresión de la epileptogénesis depende de la activación del receptor NMDA.

El efecto antiepileptogénico de los antagonistas, como el MK-801, previenen la aparición de crisis espontáneas en los modelos de status de pilocarpina y kainato; y además, tienen efectos neuroprotectores sobre la pérdida neuronal piramidal.

Sin embargo, el papel de los receptores de kainato en epileptogénesis no está muy claro, aunque algunas publicaciones hablan sobre la implicación de la subunidad 7 en la inducción de las convulsiones.

✚ *Potenciación sináptica*: El kindling produce un incremento sustancial en la amplitud del número de PPSE en el sistema límbico, lo que se considera un mecanismo que contribuye al desarrollo de la epileptogénesis. No obstante, el kindling también puede ser inducido en ausencia de potenciación sináptica.

✚ *Mecanismos presinápticos y de recaptación*: Tanto en la ELT humana como en el modelo de kainato, las concentraciones extracelulares de glutamato se ven extremadamente incrementadas en el hipocampo durante las crisis espontáneas.

En el modelo kindling también se observa esto, tanto en hipocampo como en amígdala. La liberación de glutamato a nivel presináptico, inducida por despolarización, se intensifica en la epileptogénesis, pero alteraciones en la activación de los receptores presinápticos podrían generar un mal funcionamiento de la regulación de la liberación de glutamato.

En el modelo de status inducido por pilocarpina, se observó una sensibilidad reducida a agonistas de receptores de glutamato, posiblemente relacionada con una regulación disminuida de liberación del neurotransmisor.

✚ *Mecanismos postsinápticos*: La inducción de la descarga de convulsiones y el desarrollo de la epileptogénesis depende en su mayoría de la activación de receptores AMPA y NMDA. La interrupción o modificación de la regulación de las subunidades que forman el receptor podrían contribuir al desequilibrio excitación-inhibición y, por consiguiente, al desarrollo de la epileptogénesis.

Aunque se sabe que el receptor NMDA juega un papel imprescindible en el desarrollo del estado de kindling, no está tan claro que la función del receptor NMDA se vea afectada por el kindling; sí se encontraron alteraciones en la zona del giro dentado, pero no en otras regiones, como el hipocampo. Es posible que la mayoría de los

cambios de excitabilidad que se muestran en las células sean transitorios y contribuyan de forma mínima y a largo plazo, incrementando la susceptibilidad a las descargas convulsivas; aunque muchos estudios negaron la detección de cambios persistentes en ambos receptores.

Los receptores GluR2 son importantes determinantes de la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores AMPA, de forma que los ratones deficientes o knockdown (genéticamente modificados) de los alelos llegan a ser epileptogénicos y mostraron neurodegeneración; por lo que, estos receptores podrían ser mediadores del retraso de la neurodegeneración tras un status, así como del desarrollo del kindling en ratones knockout (supresión de GluR2).

### **Creación de nuevos circuitos neuronales**

La mejora de las conexiones excitatorias ya existentes es una manera de alterar los patrones de activación, mediante la reorganización de los circuitos. Los cambios morfológicos se asociaron a la creación de estos circuitos asociados con epileptogénesis. De esta forma, los tratamientos que impiden la progresión del kindling también bloquean o disminuyen el desarrollo de las fibras musgosas. Estas fibras son excitadoras para los núcleos cerebelosos profundos y la corteza, utilizando como neurotransmisor el glutamato.

El crecimiento axonal y la sinaptogénesis puede producirse como respuesta al daño tisular o a los altos niveles de actividad neuronal, en ausencia de daño. Si los nuevos circuitos son funcionales, podrían contribuir a la generación de descargas epileptiformes, creando corrientes excitatorias recurrentes o ampliando la respuesta de la región afectada.

Estos procesos de sinaptogénesis y alteración de circuitos neuronales que tienen lugar durante la epileptogénesis se muestran en la figura 7.

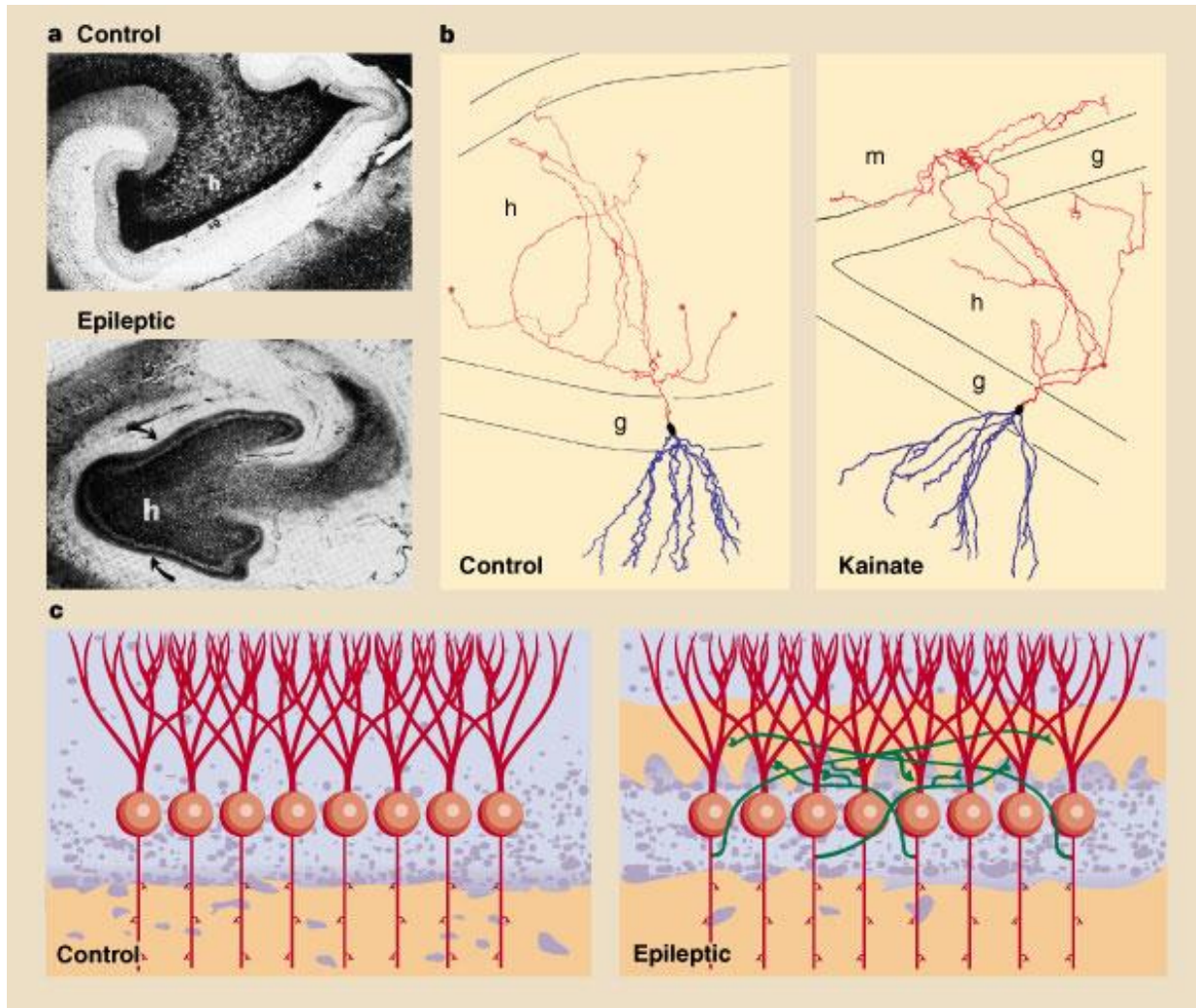


Fig. 7. **a**, Reorganización de fibras musgosas de hipocampo epiléptico frente a control. **b**, Reproducción de células granulares dentadas de control (izquierda) frente a kainato (derecha) **c**, Redes excitatorias recurrentes, sobre las que se produce una reorganización de las fibras musgosas. Representación de las células granulares dentadas del giro dentado: rata control frente a epiléptica.

### Fallo en los sistemas de inhibición

El método más fácil de desencadenar un estado de excitación es reduciendo los niveles de inhibición, de forma que el fracaso de la inhibición es un mecanismo candidato para el desarrollo de epilepsia.

- ✚ *Modificación de epileptogénesis por agentes GABAérgicos*: La desactivación GABAérgica puede producir descargas epileptiformes y si, es repetido, el efecto kindling. Los agonistas selectivos de GABA<sub>A</sub> retrasan la aparición del kindling en la

amígdala y potencian los efectos anticonvulsivantes en los animales que previamente se indujo kindling en la amígdala. Por el contrario, los agonistas de receptores GABA<sub>B</sub> presentan débiles efectos anticonvulsivantes.

En el modelo de status inducido por estimulación eléctrica de la corteza piriforme anterior, el daño de hipocampo fue completamente bloqueado por pretratamiento con agonistas GABA<sub>A</sub>, debido a sus efectos anticonvulsivantes.

A pesar de ello, la mayoría de los fármacos antiepilépticos, incluyendo los agonistas del GABA, no previenen el desarrollo de la epileptogénesis, si son administrados después del status. Tampoco tiene efecto sobre el desarrollo de las crisis espontáneas, sugiriendo que son atribuibles a un fallo gradual de la inhibición excitatoria.

- ✚ *Alteraciones en la inhibición mediada por GABA:* Hay evidencia de una gran variedad de alteraciones inducidas por las convulsiones en la función de los sistemas GABAérgicos. La inhibición de la actividad mediada por GABA en las células de la región CA1 hipocampal mostraban una disminución de los potenciales postsinápticos despolarizantes y de la inhibición, comparable a los resultados del kindling.
- ✚ *Fallo en la liberación y recaptación de GABA:* Se ha demostrado una insuficiente elevación de las concentraciones extracelulares de GABA durante las crisis de kindling. Durante las convulsiones, el GABA se eleva aproximadamente 250-350% del nivel basal, comparado con la elevación de 550-650% de los niveles de glutamato. Este aumento es comparable al medido en la ELT humana.
- ✚ *Cambios en los receptores de GABA:* La inhibición mediada por GABA pueden ser alterada por:
  - Cambios en el número de receptores GABA/BNZ: incremento en el giro dentado, que coincide con la inhibición aumentada, vista en kindling y status.
  - Cambios en la configuración de la subunidad del receptor GABA. Por ejemplo: el status de kainato aumenta la expresión de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\beta 3$  en la región CA3.

### **Neurodegeneración y alteraciones metabólicas**

- ✚ *Pérdida neuronal:* El daño y la destrucción neuronal son una característica común de la ELT y el kindling, sobre todo, si llevan a cabo una función inhibitoria. También en status puede producirse una pérdida apreciable de neuronas.



Las técnicas de escáner cerebral permiten la monitorización de los efectos degenerativos, sin el sacrificio del animal; estos signos se encontraron fundamentalmente en amígdala y corteza piriforme, junto con una correlación entre la esclerosis hipocampal y el desarrollo de crisis espontáneas.

En general, los procedimientos de kindling estándar no producen pérdidas importantes en las neuronas piramidales del hipocampo; sin embargo, es posible que un kindling más extendido (sobre-kindling o, en inglés, “overkindling”) podría generar neuropatología parecida a esclerosis hipocampal.

Por otro lado, la pérdida o disminución en el número de interneuronas GABAérgicas facilitaría una hiperexcitación neuronal en la epilepsia.

A la vez que se genera un deterioro neuronal, se produce una reorganización de los sistemas excitatorio e inhibitorio en la epileptogénesis.

✚ **Cambios metabólicos:** Las redes neuronales asociadas al kindling pueden ser visualizadas usando una variedad de marcadores metabólicos. Para ello se emplean radiotrazadores análogos de la glucosa:

- Técnicas *ex vivo*: Mediante autorradiografía empleando el emisor  $\beta$   $^{14}\text{C}$ -2-desoxiglucosa.
- Técnicas *in vivo*: La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de imagen funcional que permite la cuantificación de la actividad metabólica tisular usando el radiotrazador  $^{18}\text{F}$ -2-desoxi-glucosa (FDG). Esta técnica se basa en la inestabilidad del radioisótopo  $^{18}\text{F}$  que en su proceso de decaimiento radiactivo emite un positrón, el cual al interactuar con un electrón del medio se produce un proceso de aniquilación emitiendo un par de fotones  $\gamma$ , los cuales son detectados por el escáner, permitiendo obtener una imagen tridimensional de la actividad metabólica celular (Fig. 8).

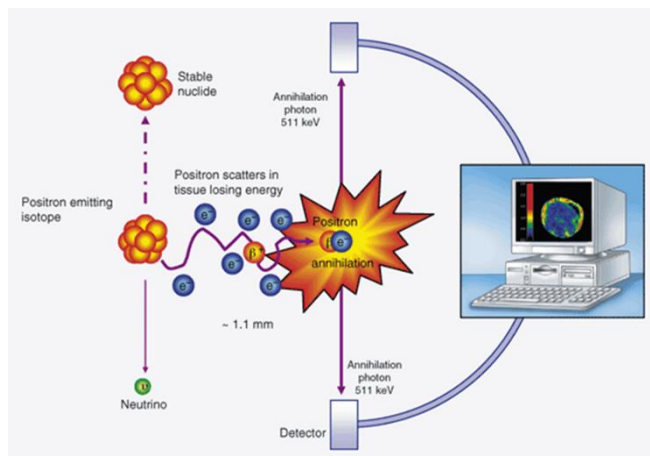


Fig. 8. Base física del funcionamiento de la PET. El radiotrazador FDG marcado con el isótopo  $^{18}\text{F}$ , emite un positrón ( $e^+$ ), que al perder la energía cinética se aniquila con un  $e^-$ , generando un par de fotones  $\gamma$  de alta energía (511 keV) que es detectado por el sistema.

Así se ha observado un incremento de la captación de FDG en la amígdala estimulada y la mayoría de sus estructuras de proyección durante convulsiones parciales (estadios 1-2) o convulsiones generalizadas (estadios 3-5). Por tanto, se observa una actividad metabólica asociada a convulsiones,

Por otra parte, está ampliamente documentado la presencia de hipometabolismo postictal asociada a esclerosi mesial en pacientes con ELT, siendo un criterio de diagnóstico de este tipo epilepsia (Fig. 9).

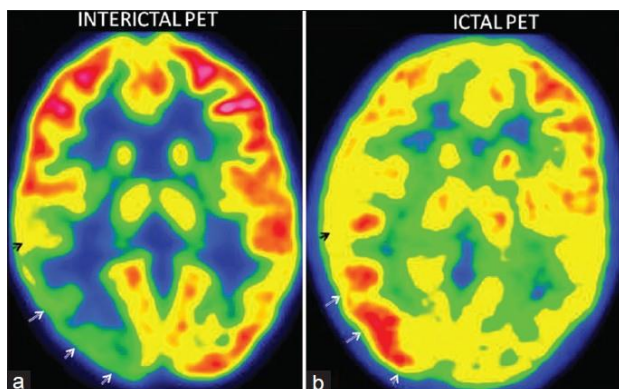


Fig. 9: Neuroimagen FDG-PET cerebral de un paciente con EL. Las flechas blancas indican el hipometabolismo de lóbulo temporo-parietal durante la fase interictal (panel a) y el hipermetabolismo durante la fase ictal (panel b). Imagen tomada de Nooraine y cols., 2013.

En la actualidad el empleo de tomógrafos PET específicos para animales de experimentación constituye una herramienta muy valiosa para el estudio no sólo de la epilepsia (Fig. 10) sino de múltiples patologías neurológicas.

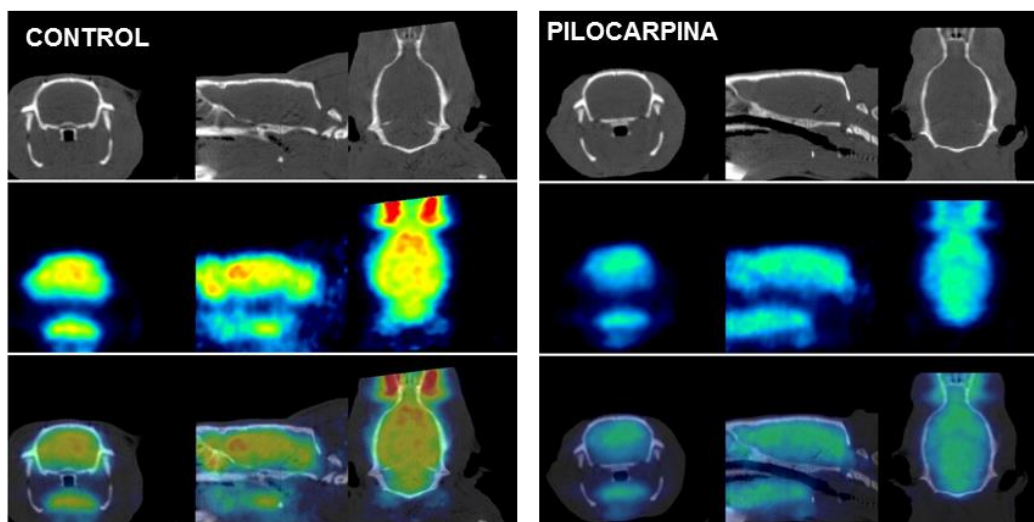


Fig. 10. Imágenes CT (fila superior), FDG-PET (fila intermedia) e imagen fusionada (fila inferior) de cerebro de rata (cortes coronales, transversales y sagitales), mostrando el hipometabolismo generalizado postictal asociado a la administración del agente convulsivante pilocarpina. Imagen cedida por Dr. L. García-García, Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, UCM, Madrid.

## Conclusiones

Aunque la relación entre el kindling y la ELT no está del todo clara, éste sigue siendo el modelo de elección para el estudio de los mecanismos de este tipo de epilepsia.

Por tanto, es aceptado como un modelo de epilepsia funcional, para su aplicación a la investigación de los mecanismos de epilepsia, y además, es empleado ampliamente para la evaluación preclínica de fármacos antiepilépticos, especialmente para aquellos que actúan sobre el sistema GABA/benzodiazepina, bloqueando la propagación del estímulo que genera la crisis. La validez del kindling es claramente aparente; su uso en los estadios finales del desarrollo de nuevos fármacos permite predecir la efectividad potencial de éstos sobre crisis parciales complejas.

## Bibliografía

- Bertram, Edward. 2007. The Relevance of Kindling for Human Epilepsy.
- Corda, M. G., Orlandi, M., Lecca, D., Carboni, G., Frau, V., Giorgi, O. 1991. Pentylentetrazol-Induced Kindling in Rats: Effect of GABA Function Inhibitors.
- Goddard, G. V., McIntyre D. C., Leech, C. K. 1969. A permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation.
- McIntyre, D. C., Poulter, M. O., Gilby K. 2002. Kindling: some old and some new.
- Morimoto, K., Fahnestock, M., Racine, R.J. 2004. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain.
- Pitkänen, A., Schwartzkroin P. A., Moshé, S. L. 2006. Models of Seizures and Epilepsy.
- Racine, Ronald J. 1971. Modification of seizure activity by electrical stimulation: After-discharge threshold.
- Racine, Ronald J. 1971. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Motor seizure.
- Racine, Ronald J. 1971. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Mechanisms.
- Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina <http://www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/forconred/neuro/epilepsia/epilepsial.htm>
- World Health Organization: neurology and public health. Epilepsy: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/epilepsy/en/](http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/en/)