

INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA RÁPIDA DE AMÍGDALA
(*kindling*) SOBRE EL COMPORTAMIENTO EXPLORATORIO Y LA ANSIEDAD DE
RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

ASTRID TORRES JAIMES

NORBERTO GARCIA CAIRASCO

PhD. FISILOGIA



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE CIENCIAS SOCIALES

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

BUCARAMANGA

Nota de Aceptación _____

Presidente del Jurado _____

Jurado 1 _____

Jurado 2 _____

Floridablanca, _____

Tabla de Contenido

Pág.	
	Resumen 8
	Abstract 9
	Justificación 10
	Planteamiento del Problema 12
	Objetivos 14
	Referente Conceptual 15
	Lóbulo Temporal 15
	Epilepsia del Lóbulo Temporal 16
	Ansiedad 19
	Electroencefalograma 26
	Estimulación eléctrica rápida 28
	Método 32
	Sujetos 32
	Aparatos 33
	Procedimiento 33
	Resultados 40
	Discusión 51
	Conclusiones 57
	Recomendaciones 58
	Referencias 59
	Anexos 70

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Localización anatómica de los electrodos	40
Figura 2. Evolución de las crisis comportamentales	41
Figura 3. Evolución de las crisis comportamentales	42
Figura 4. Laberinto en cruz elevado	43
Figura 5. Laberinto en cruz elevado	43
Figura 6. Laberinto en cruz elevado	44
Figura 7. Localización anatómica de los electrodos	46
Figura 8. Localización anatómica de los electrodos	46
Figura 9. Localización anatómica de los electrodos	47
Figura 10. Localización anatómica de los electrodos	48
Figura 11. Laberinto en cruz elevado	49
Figura 12. Laberinto en cruz elevado	49
Figura 13. Localización anatómica de los electrodos	50

Índice de Anexos

	Pág.
Anexo 1. Diseño esquemático: laberinto en cruz elevado	70
Anexo 2. Diseño esquemático: electrodos implantados en la amígdala	71
Anexo 3. Diseño esquemático: instrumentos de estimulación y registros eléctricos	72

Glosario de Siglas

ABL: Núcleo basolateral de amígdala

ABLI: Núcleo basolateral izquierdo de amígdala

ANOVA: Análisis de varianza

AP: Antero-posterior

Br: Brasil

°C: Grados centígrados

CA1: Cuerno de Amón del hipocampo

cm: Centímetro

CON: Control

DV: Dorsoventral

EEG: Electroencefalograma

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal

EXP: Experimental

FET: Transistor de efecto de campo

G: Gramo

Hz: Hercio

KINDLING

Kg: Kilogramo

LCE: Laberinto en cruz elevado

MIN: Minuto

Mg: Miligramo

ML: Mediolateral

ml: Mililitro

ms: Milisegundo

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

PLA: Potencialización a largo plazo

PD: Pos-descarga

SBNEC: Sociedad Brasileira de Neurociencias y Comportamiento

SE: Estado Epiléptico

SEC: Segundo

μ A: Microamperios

μ m: Micrómetro

SGP: Substancia gris periacueductal

SHAM

USP: Universidad de Sao Paulo

Volt: Voltio

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: Influencia de la estimulación eléctrica rápida de amígdala (*electrical kindling*) sobre el comportamiento exploratorio y la ansiedad de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.

AUTOR(ES): Astrid Torres Jaimes.

FACULTAD: FACULTAD DE PSICOLOGIA.

DIRECTOR: Norberto Garcia Cairasco.

RESUMEN: Una de las principales estructuras comprometidas en la patogénesis y sintomatología de la epilepsia del lóbulo temporal es la amígdala. Dado que alteraciones patofisiológicas en la excitabilidad neural de la amígdala han sido descritas en disturbios de ansiedad, se estudió si la estimulación eléctrica rápida de amígdala (*kindling*) afecta el comportamiento exploratorio y la ansiedad, de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado. Ratas Wistar estimuladas (500 μ A en 10sec 60 Hz cada 30 min, 10 estímulos por día, durante dos días) en el núcleo basolateral izquierdo de la amígdala fueron evaluadas en el laberinto en cruz elevado. Animales estimulados disminuyeron la frecuencia de entradas ($P=0,043$) y el tiempo en las extremidades ($P=0,023$) de los brazos abiertos, así como la distancia recorrida en los brazos abiertos ($P=0,036$), comparados con el grupo de animales no estimulados (*sham*). No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de entradas ($p=0,263$) y la distancia recorrida en los brazos cerrados ($P=0,281$). La estimulación eléctrica rápida de la amígdala basolateral izquierda aumentó los niveles de ansiedad, sin alterar la actividad locomotora, sugiriendo que las crisis epilépticas generadas en este núcleo, afectarían el comportamiento emocional en el laberinto en cruz elevado, modelo animal de ansiedad.

PALABRAS CLAVE: Epilepsia, estimulación eléctrica rápida, núcleo basolateral de amígdala, ansiedad, laberinto en cruz elevado.

ABSTRACT

TITLE: Influence of electrical stimulation fast amygdala in the exploratory behavior and anxiety of rats exposed to the elevated plus maze.

AUTHOR: Astrid Torres Jaimes.

FACULTY: FACULTY OF PSYCHOLOGY.

DIRECTOR: Norberto Garcia Cairasco.

SUMMARY: The Amygdala is a main structure involved in the pathogenesis and sintomatology of temporal lobe epilepsy. Since physiopathological alterations in the neural excitability of amygdala have been described in anxiety disturbances, we currently studied if fast amygdale kindling affects the exploratory behavior and anxiety of rats exposed to the elevated plus maze. Stimulated Wistar rats (500 μ A at 10sc 60 Hz once each 30 min, ten times per day, for two days) in the left basolateral amygdala (BLA) were evaluated one day after in the elevated plus maze. Kindled animals decreased the frequency of entries ($P=0,043$) and time spent in the open extremities ($P=0,023$), as well as distance run in the open arms ($P=0,036$), compared with the sham group. These findings show that the fast electrical kindling of left BLA increases the levels of anxiety, suggesting that epileptic seizures generated in this nucleus, may affect the emotional behavior in the elevated plus maze, an experimental model of anxiety.

KEY WORDS: Epylepsy, kindling , left basolateral amygdala, anxiety, elevated plus maze.

Justificación

Desde el punto de vista de la práctica clínica y experimental, la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es actualmente la condición neurológica más ampliamente estudiada, dada su alta prevalencia en la población y resistencia a los diferentes tratamientos. Se responsabiliza por lo menos por 40% de los casos de epilepsia parcial en adultos, respondiendo con mejor pronóstico a la intervención quirúrgica (Guerreiro C.A.M, Guerreiro M.M, Cendes & Lopes-Cendes, 2000).

La ansiedad y la depresión son las formas más comunes de psicopatología afectiva acompañando las crisis epilépticas (Adamec, 1990a; Hermann & Whitman, 1984). Dado que múltiples factores como elementos psicosociales, tratamiento farmacológico, condiciones psiquiátricas pre-mórbidas, historia familiar y patofisiología del desorden, interactúan en el estado emocional de pacientes epilépticos, es difícil estimar cuanto determina la patofisiología de la epilepsia a las alteraciones en el comportamiento emocional. Si las crisis epilépticas conducen al desarrollo de un disturbio emocional, alteraciones en la expresión emocional pueden ser inducidas y evaluadas a través de modelos animales de epilepsia (Adamec, Shallow & Burton, 2005).

El presente trabajo permitió analizar la influencia de las crisis epilépticas inducidas por el modelo de estimulación eléctrica rápida de amígdala sobre el comportamiento exploratorio de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado. El desarrollo de las crisis comportamentales y electroencefalográficas progresivas en el modelo también fue abordado en este trabajo. Más que esto,

se evaluó específicamente, el efecto de la estimulación del núcleo basolateral de la amígdala sobre el comportamiento exploratorio y la ansiedad de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado, modelo animal de ansiedad.

Planteamiento del Problema

La estimulación eléctrica en ratas es considerada un buen modelo animal para el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal (Ebert & Löscher, 1995; Goddard, 1967; McNamara, 1984 & Racine, 1972). La gran mayoría de estudios realizados intentando comprender la influencia de las crisis epilépticas en las alteraciones del comportamiento emocional, han evaluado los efectos de las crisis inducidas mediante el modelo de estimulación eléctrica convencional en el comportamiento de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.

Adamec et al. (2005), demostraron cómo diferentes factores influyen el efecto de la estimulación sobre el comportamiento de tipo ansioso estudiado en ratas. El hemisferio estimulado, la estimulación de diferentes núcleos en un mismo hemisferio y los niveles basales de ansiedad generan respuestas comportamentales diferentes. La estimulación eléctrica de las mismas áreas en la amígdala basolateral derecha produce efectos comportamentales opuestos, dependiendo de niveles basales de ansiedad. Ratas con altos niveles de ansiedad basal manifiestan un comportamiento de tipo ansiolítico siguiente a la estimulación eléctrica; y ratas con niveles basales inferiores, manifiestan un comportamiento de tipo ansiogénico en el laberinto en cruz elevado. El mismo procedimiento realizado en el núcleo basolateral izquierdo de ratas menos ansiosas, incrementa el nivel de ansiedad en el laberinto.

Comparado con el protocolo de estimulación convencional, la estimulación eléctrica rápida (*kindling*) presenta la ventaja de

disminuir de dos semanas para dos días el tiempo necesario para estimular el animal, controlar la producción de infecciones y otras alteraciones fisiológicas producidas por el implante crónico de electrodos (Ebert & Löscher, 1995; Löscher, Wahnschaffe, Hönack & Rundfeldt, 1995)

De acuerdo con lo anterior el interrogante propuesto en este presente proyecto de investigación fue: ¿Las crisis epilépticas inducidas por el modelo de estimulación eléctrica rápida, afectan el comportamiento exploratorio y la ansiedad de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado?.

Objetivos

Dentro de los objetivos de este trabajo, se destacan:

Objetivo General

Analizar la influencia de la estimulación eléctrica rápida de amígdala (*kindling*) sobre el comportamiento exploratorio y la ansiedad de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.

Objetivos Específicos

1. Investigar el desarrollo de las crisis comportamentales y electroencefalográficas progresivas en el modelo de estimulación eléctrica rápida de amígdala (*kindling*).
2. Analizar la influencia de las crisis epilépticas inducidas por la estimulación eléctrica rápida de amígdala sobre el comportamiento exploratorio de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.
3. Analizar la influencia de las crisis epilépticas inducidas por la estimulación eléctrica rápida del núcleo basolateral izquierdo (BLAI) de amígdala, sobre el comportamiento exploratorio de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.

Referente Conceptual

Lóbulo Temporal

El lóbulo temporal es morfológicamente el más heterogéneo de todos los lóbulos cerebrales. Además de la isocorteza (isocórtex), está constituido por componentes límbicos en su porción medial, como el hipocampo, la región temporal del cortex prepiriforme, el giro parahipocampal y más anteriormente la amígdala, rodeada por la corteza periamigdaloides y entorrinal. De esta manera, reúne estructuras involucradas en diversas funciones, como auditivas, visuales, emocionales y de memoria (Gloor, 1997).

La amígdala es una estructura subcortical formada por una colección heterogénea de grupos nucleares que ha sido identificado como complejo amigdaloides. Se han atribuido importantes funciones al complejo amigdaloides, incluyendo procesos de memoria, atención, interpretación del significado emocional del estímulo sensorial y producción de respuestas emocionales apropiadas (Pitkänen, Savander & LeDoux, 1997). La interacción establecida por la amígdala con el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal (SGP) en el denominado sistema cerebral de defensa, en acción conjunta con el sistema de inhibición comportamental compuesto por el septo y el hipocampo, constituyen uno de los substratos neurales asociados a la respuesta de ansiedad (Graeff, Guimarães & Zuardi, 1999).

La información sensorial del mundo externo alcanza la amígdala principalmente a través del núcleo lateral. El núcleo lateral envía proyecciones para la mayoría de otros núcleos amigdaloides. Las informaciones son asociadas e integradas vía

conexiones establecidas entre núcleos inter e intra-amigdaloides. El núcleo central es el mayor centro de salida de las proyecciones amigdaloides hacia el tallo (tronco) encefálico y el hipotálamo (Pitkänen et al., 1997).

La amígdala basolateral (ABL) envía proyecciones a un gran número de regiones cerebrales, incluyendo varias áreas corticales, el hipocampo, núcleo acumbens y el estriado. Dichas conexiones son indispensables en las modulaciones reguladas por la ABL en la consolidación de diferentes tipos de memoria. Algunas de las regiones cerebrales más próximas influenciadas por la actividad de la ABL, como el hipocampo y posiblemente la corteza entorrinal, pueden regular la consolidación de la memoria duradera en otros circuitos cerebrales, mientras otras, como el núcleo caudado y el núcleo basal magnocelular, pueden constituir lugares de memorias permanentes (McGaugh, 2002).

Epilepsia del Lóbulo Temporal

La epilepsia constituye un conjunto de alteraciones neurológicas caracterizadas por crisis epilépticas recurrentes que se originan en ausencia de respuesta tóxico-metabólica o febril. La disfunción temporaria restringida a un grupo específico de neuronas conduce al desarrollo de crisis focales, y a la aparición de crisis generalizadas en el caso de comprometer áreas más extensas del encéfalo. Los síntomas de la crisis dependen de las partes del cerebro comprometidas en la disfunción (Guerreiro et al., 2000).

Las crisis epilépticas son generadas a partir de descargas eléctricas anormales excesivas, hipersincrónicas y transitorias de

neuronas, resultantes de corrientes eléctricas producto del flujo iónico a través de la membrana celular (Guerreiro et al., 2000).

Desde el punto de vista de la práctica clínica y experimental, la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es actualmente la condición neurológica más ampliamente estudiada, dada su alta prevalencia en la población y resistencia a los diferentes tratamientos. Se responsabiliza por lo menos por 40% de los casos de epilepsia parcial en adultos, respondiendo con mejor pronóstico a la intervención quirúrgica (Guerreiro et al., 2000).

Las crisis que se originan en el lóbulo temporal, en estructuras que incluyen la amígdala, el hipocampo, giro parahipocampal y otras estructuras límbicas mediales, constituyen la epilepsia del lóbulo temporal mesial (Guerreiro et al., 2000). En la mayoría de los casos, tiene inicio al final de la infancia o principio de la adolescencia, acompañada generalmente con historia de crisis febriles. Predominan las crisis parciales complejas (con alteración de conciencia). Salvo algunas variaciones, la semiología ictal en la mayoría de los pacientes comprende un aura (frecuentemente sensaciones epigástricas, miedo, fenómenos autonómicos y/o psíquicos, sensaciones olfativas o gustativas) seguida por mirada fija no responsiva, automatismos oroalimentares y/o manuales estereotipados, posturas distónicas de mano y en algunos casos generalización secundaria. Posterior a la crisis, se presenta generalmente un período de confusión (Kotagal, 1999).

Una de las principales estructuras comprometidas en la patogénesis y sintomatología de la epilepsia del lóbulo temporal es la amígdala, específicamente el núcleo basolateral de la amígdala (ABL). Además, alteraciones fisiopatológicas en la excitabilidad neural de la amígdala también han sido descritas en trastornos psiquiátricos como ansiedad y depresión, constituyendo una importante estructura del lóbulo temporal implicada en las emociones y en el comportamiento emocional (Aroniadou-Anderjaska, Qashu & Braga 2007).

Ansiedad

La ansiedad es definida como un estado emocional percibido subjetivamente como desagradable y amenazante que produce alteraciones del humor y de la cognición; generalmente acompañadas por cambios comportamentales y fisiológicos como palpitaciones, transpiraciones e hipervigilancia (Pratt, 1992). Un aspecto verdaderamente interesante de la respuesta de ansiedad radica en su valor adaptativo. Diferente de cualquier otra emoción, la ansiedad favorece la supervivencia del organismo, preparándolo para responder a estímulos amenazantes y eventos estresores de su medio. Sin embargo, esta respuesta llega a ser patológica cuando la reacción al estímulo percibido es sobre exagerada, irracional e interfiere con la habilidad de la persona para funcionar normalmente (Pratt, 1992).

Con la intención de reproducir artificialmente el estado de ansiedad y conducir aproximaciones cada vez más similares a las

descritas en humanos, algunas de sus características han sido reproducidas y manipuladas artificialmente a través de los llamados modelos animales de ansiedad. El laberinto en cruz elevado (LCE) es un modelo extensamente empleado en el estudio de drogas ansiolíticas y en el estudio de la neurobiología de la ansiedad (Cruz, Freif & Graeff, 1994). Este modelo se basa, entre otros factores, en el miedo natural de los roedores a los espacios no protegidos. Trabajos pioneros realizados por Montgomery (1955), demostraron que el comportamiento del animal es resultado de un impulso para explorar y de un impulso para protegerse. Esa relación entre el comportamiento exploratorio y miedo lo llevó a concluir que la novedad estimula ambos impulsos, generando un conflicto de tipo aproximación-esquiva. En condiciones normales, ratas expuestas al laberinto exploran todo el laberinto pero evitan las entradas en el brazo abierto y permanecen la mayor parte del tiempo en el brazo cerrado. La frecuencia de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos, así como la preferencia por cada uno de los brazos, son tomados como índices de ansiedad. Al ser confinados en los brazos abiertos, los animales manifiestan respuestas de miedo como congelamiento, defecación y un incremento de glucocorticoides en el plasma (Treit, Menard & Royan, 1993).

Dado que la ansiedad y la depresión son las formas más comunes de psicopatología afectiva acompañando las crisis epilépticas (Adamec, 1990a; Hermann & Whitman, 1984) es necesario ampliar la comprensión alrededor de cómo las crisis podrían alterar el funcionamiento emocional interictal. Una variedad de

estudios realizados en humanos y animales, implican alteraciones en la amígdala con disturbios afectivos presentes en epilepsia (Adamec, 1990a, 1991,1993, 1998; Adamec & Morgan, 1994; Helfer, Deransart, Marescaux & Depaulis , 1996; Kalynchuk, Pinel, Treit & Kippin, 1997). Estudios con gatos demuestran que el *kindling* de amígdala genera un incremento de receptores benzodiazepínicos (Adamec, 1990a, 1991,1993). Cambios en la excitabilidad de la amígdala como la potencialización a largo plazo (PLA) dependiente del N-Metil-D-Aspartato (NMDA) en la vía amígdala-sustancia gris periacueductal, también han sido mencionados como mediadores críticos en el comportamiento de ansiedad (Adamec, 1993, 1997).

Se ha sugerido que los cambios en el afecto asociados a la epilepsia límbica en humanos, pueden atribuirse a una hiperexcitación de las vías que procesan el miedo. En este mismo sentido, se ha propuesto que la repetida actividad de crisis en el sistema límbico, provoca cambios en vías que generan la manifestación de síntomas de ansiedad (Adamec, 1990a; Hermann & Whitman, 1984).

La repetida evocación de crisis en áreas límbicas (*kindling límbico*) genera cambios posteriores en el comportamiento animal, incluyendo la cognición (Feasey-Truger, Kargl & Ten Bruggencate, 1993; Leung & Shen, 1991; Peele & Gilbert, 1992 citados en Adamec & Shallow, 2000) y el afecto (Adamec, 1990; Adamec, 1993; Kalynchuk & cols., 1997 citados en Adamec & Shallow, 2000).

Los efectos de la estimulación eléctrica han sido evaluados principalmente, a través de dos protocolos: de corta y de prolongada duración. La estimulación de corta duración, conduce al

desarrollo de tres a cuatro crisis clase 5 (Adamec, 1998), según la escala de Racine (1972). La gran mayoría de estudios realizados empleando este protocolo, han evaluado las alteraciones en el afecto a través del laberinto en cruz elevado y el campo abierto (Adamec, Shallow & Burton, 2005).

Los efectos de este protocolo en el sobresalto acústico, también han sido evaluados. En esta línea Helfer et al. (1996, citados en Adamec, Shallow & Burton 2005) en un estudio que consideró 15 crisis clase 5 en el núcleo ABL posterior derecho, revelan que la estimulación incrementa los niveles de ansiedad en el laberinto y en el campo abierto, sin ningún efecto sobre el consumo de sacarosa y la prueba de nado forzado. La estimulación de larga duración, está determinado por el desarrollo de 60 a 90 crisis clase 5; diversos trabajos han señalado un incremento en el comportamiento defensivo empleando este modelo (Kalynchuk, Pinel & Treit, 1999 citados en Adamec, 2005).

Diferentes estudios reportan que la estimulación eléctrica puede incrementar o disminuir la ansiedad en roedores (Adamec, Blundell & Burton, 2004). Los estudios de Adamec (1990b, 1991) fueron pioneros en demostrar que la estimulación eléctrica de la amígdala medial y basolateral derecha, incrementa el comportamiento de tipo ansioso en el laberinto en cruz elevado. El efecto opuesto, ha sido reportado para la estimulación rápida de la amígdala basolateral izquierda, generando una disminución en los niveles de ansiedad (Adamec & Morgan 1994).

Una variedad de factores determinan los efectos de la estimulación sobre la ansiedad (Adamec, Shallow & Burton 2005). El hemisferio del electrodo de estimulación es uno. La estimulación de los núcleos central y basolateral izquierdo de la amígdala provoca un efecto ansiolítico (Adamec & Morgan, 1994; Kalynchuk et al., 1997). El mismo protocolo en la amígdala basolateral derecha, provoca un efecto ansiogénico (Adamec, 1998; Adamec & Morgan, 1994; Helfer et al., 1996). Sin embargo, también se han reportado efectos ansiolíticos de la estimulación en áreas mediales de la ABL derecha (Adamec, Blundell & Burton, 2004). Este último aspecto, resalta la importancia de la localización del electrodo dentro de un núcleo en el mismo hemisferio sobre el efecto comportamental.

La localización del foco de estimulación en el plano antero-posterior (AP), dentro de un mismo hemisferio, es también un factor determinante sobre los efectos comportamentales de la estimulación eléctrica de amígdala. La estimulación del núcleo cortical anterior derecho, produce un efecto ansiogénico, mientras que en el núcleo posterior provoca un efecto ansiolítico en el laberinto (Adamec & McKay, 1993; Adamec & Morgan, 1994). Un efecto similar se observa en el núcleo basomedial. La estimulación de áreas más anteriores produce un efecto ansiogénico en el laberinto en cruz elevado, en cuanto que en áreas más posteriores, el efecto ansiogénico disminuye o no es significativo (Adamec & Shallow, 2000).

A pesar de estas diferencias, no todos los núcleos mantienen esta dependencia con el plano AP en la respuesta comportamental.

La estimulación eléctrica sobre el plano AP en el núcleo basolateral derecho produce ansiedad en el laberinto en cruz elevado (Adamec & Morgan, 1996; Herlfer et al., 1996).

Finalmente, otro factor que determina los efectos de la estimulación en el comportamiento emocional es el estado afectivo pre-mórbido. Para Adamec y Shallow (2000), este factor de gran relevancia clínica, podría contribuir a la comprensión de las discrepancias en los hallazgos reportados sobre los efectos de la estimulación en el comportamiento emocional de los roedores. Los mismos autores, propusieron una re-exposición al laberinto en cruz elevado para evaluar niveles de ansiedad previos a la estimulación eléctrica de amígdala medial. Fue demostrado, que ratas evaluadas en diferentes espacios novedosos con intervalo de tres semanas entre prueba, no manifestaban incremento en los niveles de ansiedad tras la repetida evaluación en el laberinto. En este estudio, la ansiedad fue determinada a partir de una medida farmacológica denominada razón de tiempo. Esto es, la razón del tiempo de espera en los brazos abiertos sobre el tiempo de espera en todos los brazos. A más baja razón, "más ansiosa" la rata. Se agruparon las ratas con mayor o menor ansiedad en la primera de dos pruebas antes de la estimulación, pero posterior a la implantación del electrodo. Se halló un efecto ansiogénico sólo en ratas con mayor razón de tiempo basal.

Citando diferentes estudios, Adamec y Shallow (2000) señalan que las diferencias basales en el comportamiento defensivo, son generadas por variaciones en la excitabilidad de la amígdala y su significativa proyección eferente al hipotálamo medial y la

sustancia gris periacueductal. Así, diferencias fisiológicas, que determinan las comportamentales, podrían interactuar con la extensión de las crisis del hipocampo dentro del substrato defensivo; alterando también allí, los efectos fisiológicos y comportamentales de las crisis.

Evidencia de esto, se encuentra en trabajos que han empleado la aplicación consecutiva de posdescargas sin inducción de crisis motoras, en el modelo de estimulación eléctrica parcial. La estimulación parcial del hipotálamo ventral incrementa o decrementa la respuesta defensiva de acuerdo a las características de la especie. Gatos menos reactivos, manifiestan conductas más agresivas tras la estimulación del hipocampo ventral; en gatos más reactivos se observan efectos comportamentales opuestos (Adamec, 1975, 1978 citado en Adamec & Shallow, 2000). Otros de los efectos comportamentales de la estimulación parcial, incluyen: incremento de respuestas defensivas frente a roedores y gatos de la misma especie, a estímulos provocados por humanos (Adamec, 1978; Adamec & Stark-Adamec, 1983 citados en Adamec, 1997); a la estimulación eléctrica del hipotálamo ventromedial (Griffin, Engel & Blander, 1987 citado en Adamec, 1997) y la sustancia gris periacueductal (Hiyoshi, 1990 citado en Adamec, 1997).

Estos datos sugieren, que el estado de ansiedad premórbido podría interactuar con la estimulación eléctrica de amígdala para determinar un efecto en el comportamiento emocional, que puede ser ambos, ansiogénico, ansiolítico o no producir ningún efecto, dependiendo del nivel de ansiedad en el momento de la estimulación (Adamec, Shallow & Burton, 2005).

Electroencefalograma (EEG)

La actividad eléctrica espontánea del cerebro fue observada inicialmente por Caton en 1875, de manera experimental, con registros de la superficie de encéfalos expuestos de monos, y sólo hasta 1929 el EEG del ser humano fue demostrado por Hans Berger (Ragazzo, 2000).

Aún en ausencia de estimulación sensorial, la actividad espontánea del cerebro no es aleatoria. Eventos poblacionales rítmicos, medidos en el espacio extracelular como corrientes, surgen de complejas interacciones entre propiedades intrínsecas de neuronas y propiedades de la red en la cual la neurona está contenida. Operaciones integrativas en el encéfalo involucran características del disparo neural coordinadas en una red neural de larga escala. Ritmos de varias frecuencias tienen lugar en diferentes regiones cerebrales y esas oscilaciones cambian de acuerdo al estado comportamental (Paré, Collins & Pelletier, 2002; Wang, 2003).

Aunque la exacta banda de frecuencia sea definida con cierta controversia, algunos ritmos se asocian con la actividad neuronal humana. Durante la vigilia atenta predomina el ritmo beta, 14 a 60 Hz, originado por actividad de áreas de amplia acción sobre los sistemas talámico y cortical, como el núcleo pedúnculo-pontino, el área tegmental latero-dorsal, la rafe dorsal y el locus cerúleos. En la vigilia relajada con los ojos cerrados aparece el ritmo alfa, 8 a 13 Hz, prominente en la región occipital. Ya durante el sueño sincronizado es posible detectar el ritmo teta, 4 a 7 Hz,

relacionado a la actividad hipocampal y sistema septo-hipocampal y el ritmo delta, 0,5 a 4 Hz, originado por actividad tálamo-cortical (Steriade, 1993).

En ratas, la serie de frecuencia teta puede ser extendida de 4 a 14 Hz, mientras que el ritmo alfa no es claramente detectable. El ritmo teta puede ser subdividido en dos tipos: la actividad teta tipo 1 (8 a 14 Hz) puede ser observada durante exploración y la actividad teta tipo 2 (4 a 8 Hz) puede ocurrir en períodos de inmovilidad (Bland, 1986; Buzsaki, 2002).

En la ELT, se observan puntas, ondas agudas o paroxismos lentos sobre una o ambas regiones temporales. En la fase inicial de la crisis (aura o crisis parcial simple) el EEG puede ser normal o revelar apenas atenuación más o menos difusa de los ritmos de base. En la fase de mirada fija, automatismos y pérdida de conciencia (crisis parcial compleja o psicomotora) se observa crisis electrográfica caracterizada por actividad rítmica de frecuencia teta y enseguida alfa, unilateral o bilateral. Durante la generalización secundaria que eventualmente ocurre, la crisis electrográfica se puede difundir a través de todo el hemisferio, aunque en algunos casos la superposición de artefactos de origen muscular pueda obscurecer el registro. El final de la crisis es caracterizado por una atenuación pos-crítica que parece ser proporcional a la duración de la crisis (Cockerell & Shorvon, 1997; Sakamoto, Garzon & Fernandes, 2000).

Estimulación eléctrica rápida (kindling)

La estimulación eléctrica (*kindling*) en ratas es uno de los modelos experimentales más empleado para el estudio de la

epilepsia (Goddard, 1967; McNamara, 1984, Morimoto, Fahnestock & Racine, 2004; Racine, 1972;). Presenta la ventaja de no producir los efectos tóxicos de las drogas y no causar *Status Epilepticus* (SE), evitando pérdida neuronal difusa (Timofeeva & Peterson, 1999).

La estimulación eléctrica rápida de amígdala es caracterizada por el desarrollo progresivo de crisis comportamentales y electrográficas en respuesta a estimulaciones eléctricas repetitivas, inicialmente subconvulsivas del sistema límbico (Ebert & Löscher, 1995; Goddard, 1967; Goddard, McIntyre & Leech, 1969).

Este modelo de epilepsia ha sido empleado desde 1967, cuando Goddard descubrió que la estimulación eléctrica diaria de la amígdala provocaría el desarrollo progresivo de crisis convulsivas. A partir de este planteamiento, distintas características del modelo han sido estudiadas. Las alteraciones resultantes de la estimulación eléctrica repetitiva son de carácter permanente, y responden de manera específica conforme a la región estimulada, siendo la amígdala una de las principales áreas que responden mejor a la estimulación (Goddard, 1967; Goddard et al., 1969). La estimulación de una determinada estructura, lleva a la transferencia positiva de ese efecto para otras regiones cerebrales (Goddard et al., 1969; Racine, 1972).

Dentro de las alteraciones en patrones estructurales, electrofisiológicos y comportamentales descritas, se destacan la reducción del umbral de pos-descarga (primera descarga neuronal

posterior al estímulo eléctrico), la disminución del tiempo de aparición de la crisis, el aumento de la duración de la crisis y de la pos-descarga (Goddard, 1967; Goddard et al., 1969). También se ha señalado que con la aplicación de los estímulos por un período de tiempo mucho más prolongado, el animal comienza a presentar crisis convulsivas espontáneas (Michael, Holsinger, Ikeda-Douglas, Cammisuli, Ferbinteanu, DeSouza C., DeSouza S., Fecteau, Racine & Milgram, 1998; Pinel & Rovner, 1978; Sayin, Osting, Hagen, Rutecki & Sutula, 2003). Para analizar la severidad de las crisis, se ha empleado el índice comportamental elaborado por Racine (1972), modificado posteriormente por Pinel y Rovner (1978).

Diversos parámetros de la estimulación se pueden modificar permitiendo evocar múltiples respuestas para abordar el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal. Un factor de gran importancia es el intervalo entre cada estimulación. En el modelo convencional, los estímulos se realizan una o dos veces por día, requiriendo aproximadamente 2 semanas para el desarrollo del experimento (Goddard, 1967; Goddard et al., 1969; Represa, Le Gall La Salle & Ben-Ari, 1989), entretanto, intervalos cortos parecen ser una alternativa rápida para ese modelo (Ebert & Löscher, 1995; Jibiki, Ohtani, Kubota & Yamaguchi, 1981; Lothman, Hatlelid & Zorumski, 1985; Racine, Burnham, Gartner & Levitan, 1973; Timofeeva & Peterson, 1999). En modelos de estimulación rápida, con intervalo entre estímulos de 30 minutos o menos, un número significativamente mayor de estímulos es necesario para evocar la primera crisis generalizada, pero el tiempo necesario para la

estimulación disminuye de semanas a horas (Goddard et al., 1969; Racine et al., 1973).

Lothman et al. (1985) demostraron que para permitir el desarrollo de la estimulación y superar el fenómeno de adaptación en el modelo de estimulación eléctrica rápida, la intensidad de la corriente de los estímulos necesitaría ser más alta (supra-umbral) y la duración de los estímulos ser mayor (10 segundos).

Al igual que la estimulación convencional, la estimulación rápida permite el control preciso de las áreas de estimulación, de los parámetros y del tiempo de las crisis (Lothman et al., 1985). Por otro lado, la estimulación rápida presenta ventajas adicionales sobre el modelo convencional, como: prevención de infección u otras alteraciones fisiológicas causadas por el implante crónico de electrodos (Ebert & Löscher, 1995; Löscher et al., 1995), reducción de costos con la manipulación del animal, ya que hay una abreviación de tiempo de los experimentos, investigación de alteraciones en diferentes etapas del desarrollo de la estimulación (Armitage, Mohapel, Jenkins, Hannesson & Corcoran, 1998) y el desarrollo de crisis espontáneas en pocos días (Timofeeva & Peterson, 1999).

Método

Sujetos

Fueron utilizadas 35 ratas Wistar machos adultos (± 250 g) provenientes del Bioterio Central del Campus de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo (USP). Durante el desarrollo de los experimentos, los animales fueron alojados en cajas con cinco animales cada una, en el Bioterio del Laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología Experimental del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la USP. Después de la cirugía, los animales fueron alojados en cajas individuales y tuvieron libre acceso a alimento y agua, con ciclo claro/oscuro de 12 horas y temperatura controlada de 21 °C. Todo el esfuerzo fue realizado para disminuir o evitar sufrimientos innecesarios a los animales. Todos los protocolos fueron realizados de acuerdo con las normas de la Sociedad Brasileira de Neurociencias y Comportamiento (SBNeC).

Durante la ejecución del experimento, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos, nueve animales en cada grupo: grupo control (Con), animales que no fueron implantados esterotáxicamente ni pasaron por el protocolo de estimulación pero permanecieron en cajas individuales; durante el mismo período de recuperación de los animales que fueron implantados. El grupo Sham (Sham), animales implantados esterotáxicamente en la amígdala, que fueron conectados a los instrumentos de estimulación pero no pasaron por el protocolo de estimulación; y el grupo experimental (Exp), animales implantados esterotáxicamente en la amígdala y

recibieron el protocolo de estimulación eléctrica rápida de amígdala.

Aparatos

Laberinto en cruz elevado

Fue utilizado un laberinto en cruz elevado constituido por dos brazos abiertos (50 x 10 cm) cruzados por dos brazos cerrados por paredes (40 cm), conectados por una área central (10 x 10 cm) y elevado a 50 cm del piso (Anexo 1). Para los registros, una cámara fue posicionada verticalmente encima del laberinto y acoplada a un monitor en una sala adyacente a la sala del test. Durante el registro, la imagen en la pantalla del aparato de televisión fue dividida en cuadrados iguales (10 cm de lado), permitiendo el registro de localización precisa del animal en cualquier espacio del laberinto y la cantidad de cuadrados atravesados por el animal. El registro fue realizado con la ayuda del programa *X-Plo-Rat*, un software construido en el laboratorio del Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho. Departamento de Psicobiología - FFCLRP - Universidad de São Paulo.

Procedimiento

Cirugía esterotóxica

Después de la llegada de los animales al laboratorio (± 250 g), los animales de los grupos sham y experimental, fueron anestesiados profundamente con Quetamina (1,0 mg/ Kg; Unión Química Farmacéutica Nacional, Embu-Guaçu, Br) y Xilazina (0,7 mg/ Kg; Bayer, São Paulo, Br) y antes de la sección quirúrgica, recibieron anestésico local con clorhidrato de lidocaína 2%

conteniendo epinefrina 1:100.000 (AstraZeneca, Cotia, Br). Como tratamiento para la prevención de infecciones, cada animal recibió 0,15 ml de pentabiotico veterinario (*Fort Dodge Saúde Animal*, Campinas, Br). A través de la cirugía esterotáxica, fue implantado un electrodo bipolar de acero inoxidable, revestido con teflón (400 μm ; *A-M Systems*, Carlsborg, EUA). El electrodo fue posicionado con base en las coordenadas del Atlas esterotáxico de Paxinos y Watson (1997): amígdala basolateral izquierda (ABLI) - AP: 2,3 mm; ML: 4,7 mm; DV: 7,1 mm en relación a Bregma. Además del electrodo, fue implantado en el hueso frontal del animal, un tornillo de acero inoxidable soldado a un pequeño cable que fue utilizado para aterramiento del animal al sistema. Adicionalmente, otros tres tornillos fueron implantados para fortalecer la fijación del conector. El electrodo y el cable tierra fueron soldados a un conector telefónico macho de 4 pines fijado con cemento de fosfato de zinc y acrílico autopolimerizable (Anexo 2). Después de la cirugía los animales pasaron por un período de cinco días de reposo y recuperación antes del inicio del protocolo de estimulación.

Estimulación y registros eléctricos

Después del período de recuperación, los animales del grupo experimental, pasaron por un protocolo de estimulación eléctrica en el núcleo ABLI, a través de un sistema de estimulación GRASS S88 (West Warwick, EUA) conectado a un osciloscopio (Hewlett-Packard 130C HP, Palo Alto, EUA) para monitoreo de las señales enviadas a los cerebros de los animales. Las estimulaciones eléctricas siguieron los siguientes parámetros: estímulo eléctrico

monopolar, trenes de ondas cuadradas bifásicas, corriente constante con frecuencia de 60 Hz y pulsos con 1 ms de duración.

El primer paso fue determinar el umbral de pos-descarga (PD). Las señales electroencefalográficas de los animales fueron registradas durante 5 minutos, a partir de ahí fue aplicada inicialmente una corriente de 100 μ A durante dos segundos. Si el animal presentaba PD, la prueba era interrumpida y se consideró que el animal tenía un umbral PD de 100 μ A. Caso contrario, el animal era posteriormente re-estimulado en intervalos de 5 minutos, incrementando 100 μ A a cada estimulación, hasta que alguna PD fuera manifestada, o hasta alcanzar el máximo de 600 μ A (Foresti, 2005; Foresti, Arisi, Fernandes, Tilelli & Garcia-Cairasco, 2008).

La PD es definida como la actividad epileptiforme que ocurre inmediatamente después del estímulo con por lo menos 1 Hz de frecuencia y amplitud 2 veces mayor que la línea de base del EEG (Ebert e Löscher, 1995).

En los dos días siguientes, los animales recibieron una serie de 10 estímulos por día con intensidad de corriente constante de 500 μ A, durante 10 segundos y separadas por intervalo de 30 minutos. La línea de base del EEG fue registrada 1 minuto antes y 5 minutos posterior al primer y último estímulo (Foresti, 2005).

La señal electrofisiológica de la ABLI fue registrada pasando por una placa electrónica conteniendo 2 canales sin interrupción de señal (estímulo y tierra) y 2 canales conectados a un transistor de efecto de campo (FET), para registros monopolares. Los FETs funcionan conectados a una batería de 3 volts (Dutra-

Moraes, Galvis-Alonso & Garcia-Cairasco, 2000). La señal fue transmitida a través de un cable conectado a un *swivel* de 4 canales para una caja de distribución de señales. El *swivel* permitió la movilidad del animal en la caja con artefactos de movimiento reducidos o ausentes. La señal fue conducida a un sistema de amplificación y filtraje (CyberAmp 320, Axon Instruments, Foster City, EUA) y a un conversor Analógico/Digital (Biopac Systems mod. MP100, Santa Barbara, EUA), acoplado a un computador (PC Pentium MMX, 233 Mhz) (Anexo 3).

Registro y análisis comportamental

Simultáneamente a la estimulación y al registro EEGráfico, los animales fueron filmados (cámara VHS, Gradiente, GCP-180CR) y las imágenes enviadas a través de una tarjeta conversora de captura y salida de vídeo (ATI *All-in-Wonder* Pro, Markham, Canadá) para la pantalla del computador. Esa imagen compuesta de registro de EEG y comportamiento, vídeo-EEG, fue grabada en cinta VHS. El comportamiento de los animales fue analizado de acuerdo al índice de gravedad para crisis epilépticas de Racine (1972) modificado por Pinel y Rovner (1978). Los comportamientos fueron evaluados, y se consideró totalmente estimulado el animal que presentara por lo menos 2 crisis clase 4.

Tabla 1

Índice de gravedad para crisis epilépticas

Clase	Respuesta Comportamental
1	Automatismos faciales
2	Mioclónías de la cabeza
3	Mioclónía de patas anteriores
4	Elevación del cuerpo sobre las patas posteriores
5	Elevación seguida por caída (cayéndose)
6	Mas de una crisis clase 5
7	Corridas y saltos
8	Convulsión tónico-clónica generalizada

Test comportamentales

Siguiente al 20° estímulo, 24 horas después, los animales de todos los grupos fueron puestos individualmente en el área central del laberinto en cruz elevado, con una iluminación de 40 lux y el hocico inclinado para uno de los brazos cerrados. Fue permitido que el animal explorara el laberinto libremente por 5 minutos. Fueron registradas durante cinco minutos la frecuencia de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos y en sus extremidades, así como la distancia recorrida en cada área.

*Histología**Perfusión, crioprotección, congelamiento y corte*

Un día después de ser expuestos al laberinto en cruz elevado, los animales de los grupos sham y experimental fueron sacrificados con una sobredosis de tionembutal (Abbott, North Chicago, EUA) y perfundidos transcardíacamente, por medio de una bomba de perfusión (Masterflex, Midland, Canadá), con 80 ml de salina 0,9%

y 300 ml de formol 40%. Los animales fueron decapitados, sus cerebros retirados de la caja craneana y conservados en solución crioprotectora (sacarosa 20% en salina) por aproximadamente 48 horas y después congelados en isopentano 99% y hielo seco. Los cerebros congelados fueron almacenados en congelador a - 20 °C hasta ser cortados en criostato (ZEISS, Microm, HM-505- E, Walldorf, Alemania) con secciones de 40 µm en el plano coronal. Los cortes conteniendo las lesiones de la punta del electrodo eran colocados en láminas gelatinizadas (gelatina 0,5% y sulfato de cromo-aluminio 0,05%). Las láminas fueron almacenadas en congelador a - 20 °C hasta que la técnica histológica fuese procesada.

Histoquímica de Nissl

Usando como referencia planchas del Atlas esterotáxico de Paxinos y Watson (1997), se identificó el posicionamiento del electrodo. Las láminas eran hidratadas, introducidas por 1 minuto en baño de acetato de cresil violeta 0,25% y posteriormente lavadas en agua por 10 minutos. En seguida las láminas eran deshidratadas y montadas con lamínulas usando *Entellan* como medio de montaje.

Análisis de Datos

Los registros comportamentales fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova) de una o dos vías seguido, siempre que necesario por el test *post hoc* de Dunnet para comparaciones de los promedios de los grupos experimentales con el grupo control.

Resultados

Confirmación Histológica

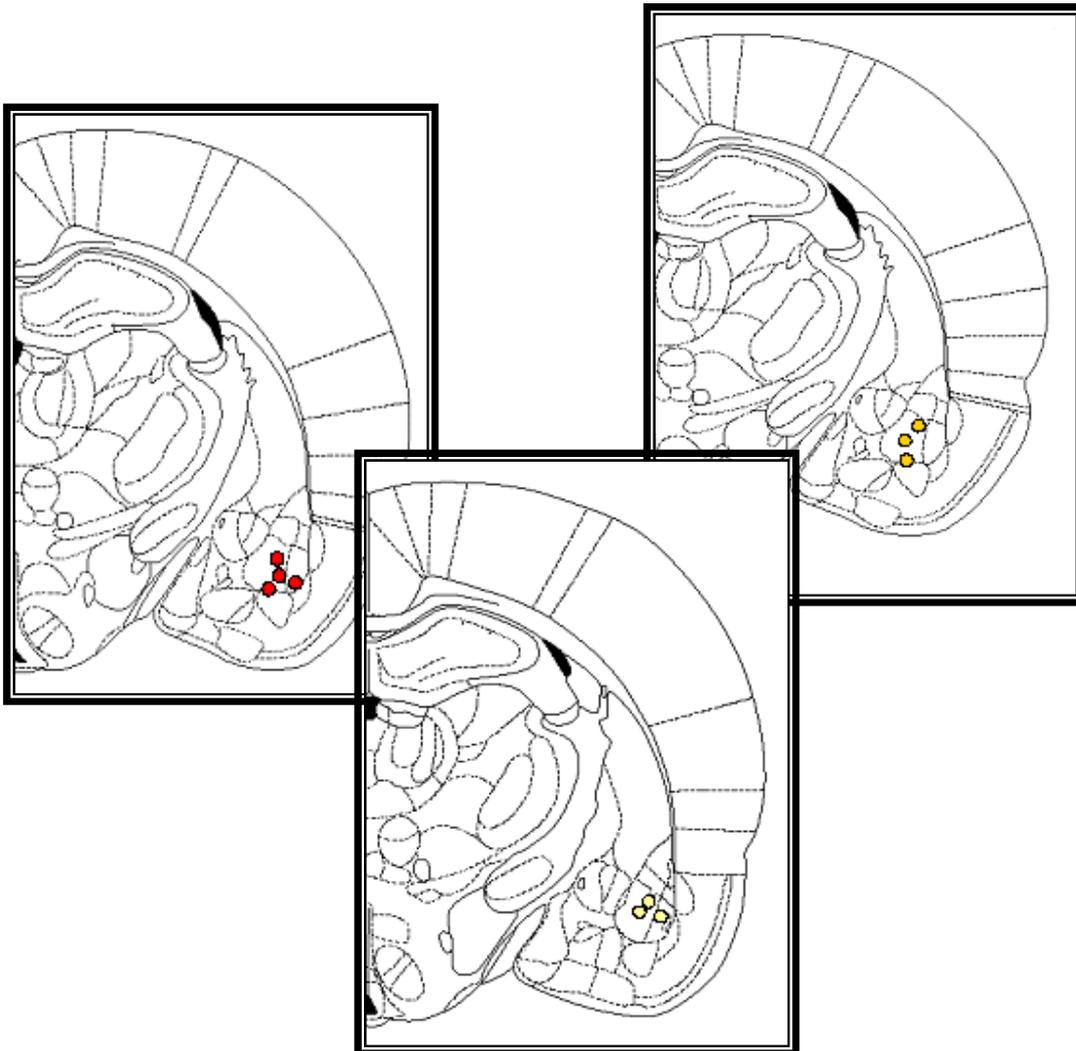


Figura 1. Localización de los electrodos en la ABLI. Círculos rojos: animales totalmente estimulados; círculos amarillos oscuro: animales no totalmente estimulados; amarillos claro: animales sham.

El análisis histológico permitió confirmar que diez animales tuvieron el electrodo de estimulación posicionado en la amígdala basolateral (ABL), de los cuales cuatro animales fueron totalmente estimulados, esto es, animales que presentaron dos o más crisis clase cuatro de acuerdo al índice de gravedad para crisis epilépticas de Racine. Otros tres animales no fueron totalmente

estimulados, presentando sólo crisis clase uno (n=1) y 2 (n=2); tres animales hacen parte del grupo sham (Figura 1).

Gravedad de las crisis

Durante la prueba de umbral de PD, los animales presentaron un umbral de 100 a 200 μ A. La gravedad de las crisis aumentó durante el desarrollo de la estimulación.

Cuatro animales totalmente estimulados en el núcleo ABLI, desarrollaron crisis comportamentales de gravedad media, esto es, clase uno o dos durante el primer día de estimulación. Más de dos crisis límbicas severas clase cuatro, fueron manifestadas a partir del 12^o estímulo, durante el segundo día de estimulación, de acuerdo al índice de gravedad para crisis epilépticas de Racine (Figura 2).

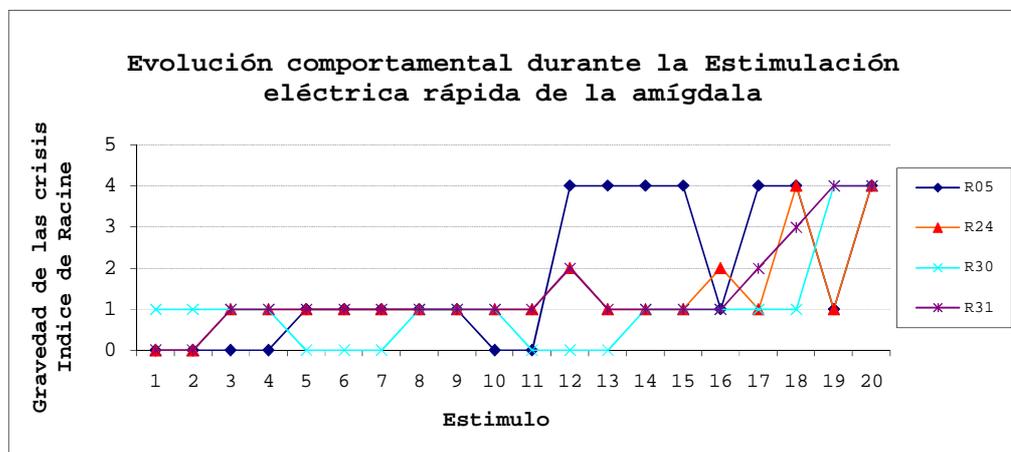


Figura 2. Evolución de las crisis comportamentales de animales totalmente estimulados en la amígdala basolateral izquierda.

Animales con electrodo de estimulación en la ABLI, no totalmente estimulados

Tres animales que tuvieron el electrodo de estimulación localizado en la ABLI no respondieron a la estimulación eléctrica (Figura 3). El análisis de los datos de esos animales indica que:

Durante el primer y segundo día de estimulación, dos animales (R19, R20) desarrollaron crisis comportamentales de gravedad media, esto es clase uno.

Un animal (R01) no presento crisis comportamentales durante los dos días de la estimulación.

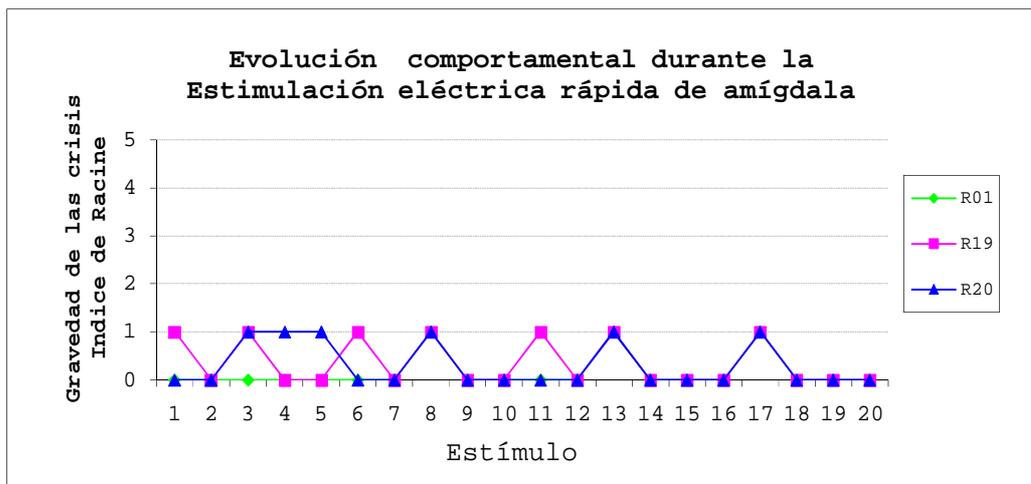
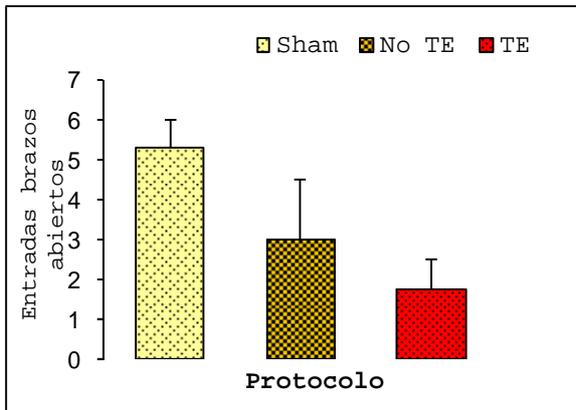
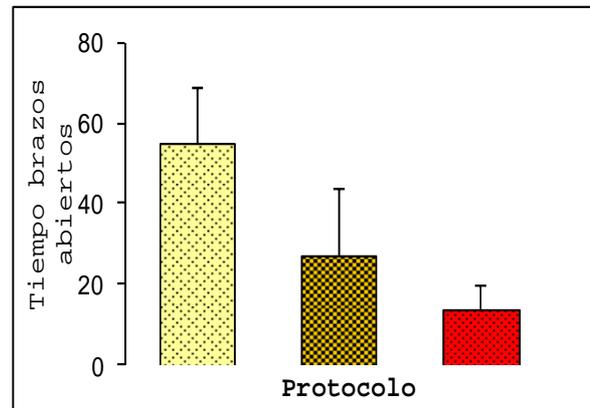


Figura 3. Evolución de las crisis comportamentales de animales no totalmente estimulados en la amígdala basolateral izquierda.

Análisis comportamental

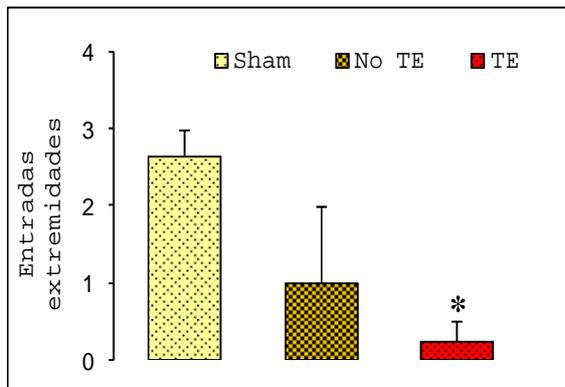


(a)

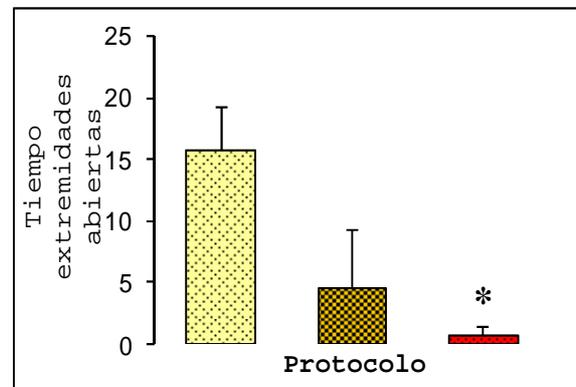


(b)

Figura 4. Laberinto en cruz elevado. Sham (n=3), No totalmente estimulados, No TE (n=3), totalmente estimulados, TE (n=4). Análisis estadístico Anova de una vía, seguido por la prueba de Dunnet. (a) Entradas en los brazos abiertos; (b) Tiempo en los brazos abiertos. No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en estas medidas comportamentales.

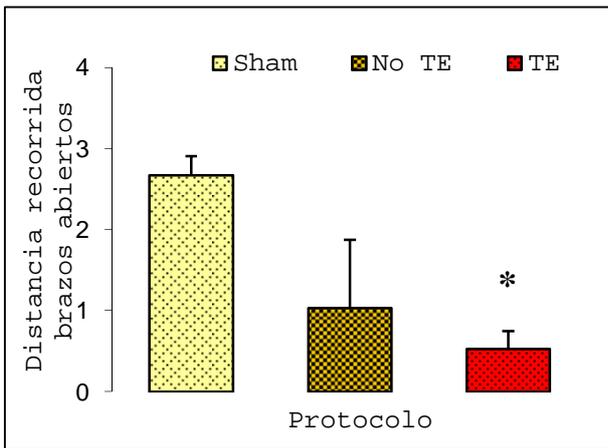


(c)



(d)

Figura 5. (c) Entradas y tiempo (d) en las extremidades abiertas del laberinto en cruz elevado. Análisis de varianza (Anova) indica que la frecuencia de entradas ($p=0.043$) y el tiempo en las extremidades abiertas ($p=0.023$) es alterado por la estimulación eléctrica rápida de amígdala. El test post hoc de Dunnet, indica que ratas totalmente estimuladas en la amígdala basolateral disminuyen la frecuencia de entradas y el tiempo de permanencia en las mismas.



(e)

Figura 6. (e) Distancia recorrida en los brazos abiertos. El análisis de varianza (Anova) indicó que la distancia recorrida ($p=0.036$) es alterada por la estimulación eléctrica rápida de la amígdala. El test post hoc de Dunnett, indica que ratas totalmente estimuladas en la amígdala basolateral disminuyen la distancia recorrida en los brazos abiertos.

Animales con electrodo de estimulación localizado en el complejo amigdaloides

Nueve animales que tuvieron el electrodo de estimulación, posicionado en diferentes núcleos del complejo amigdaloides fueron totalmente estimulados. El análisis de los datos de esos animales indica que:

Cinco animales totalmente estimulados en diferentes núcleos del complejo amigdaloides, desarrollaron crisis comportamentales de gravedad media, clase 1 y crisis límbicas severas, clase 4, durante el primer día de estimulación, (Figura 7).

Tres animales (R02) con electrodo localizado en el núcleo lateral, (R04) con electrodo localizado en el núcleo medial y (R08) con electrodo localizado en el núcleo central, presentaron más de cinco crisis comportamentales clase 4 a partir del 8^o estímulo (Figura 7).

Dos animales, (R05) con electrodo en el núcleo basolateral anterior y (R06) con electrodo entre la división medial de la amígdala central y la división capsular, presentaron crisis comportamentales clase 4 a partir del 11^o estímulo (Figura 7).

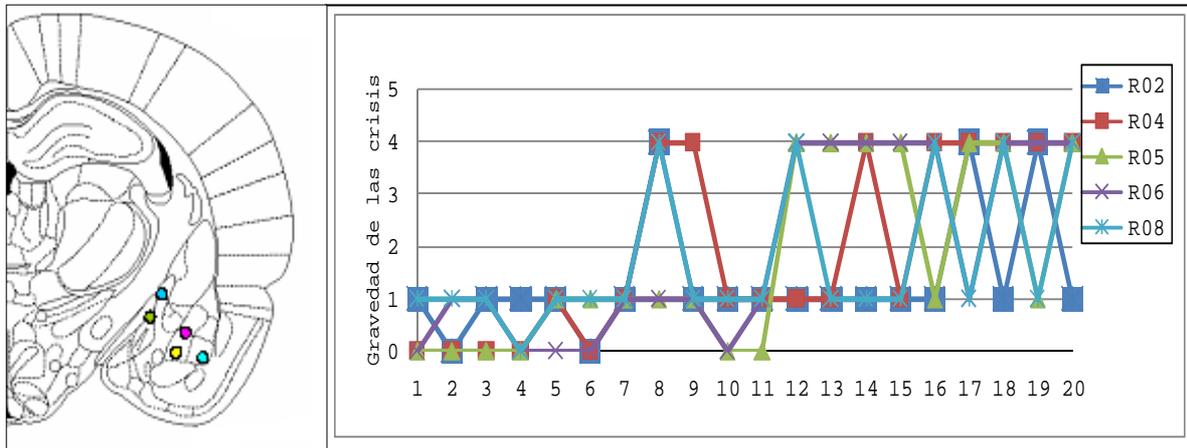


Figura 7. Animales con electrodo de estimulación en el complejo amigdalóide. Localización del electrodo de estimulación en el complejo amigdalóide (izquierda). Evolución de las crisis comportamentales (derecha).

Cuatro animales totalmente estimulados en el núcleo ABLI, durante el primer día de estimulación, desarrollaron crisis comportamentales de gravedad media, esto es clase 1 y 2. Más de 2 crisis límbicas severas, clase 4 fueron manifestadas a partir del 17^o estímulo, durante el segundo día de estimulación (Figura 8).

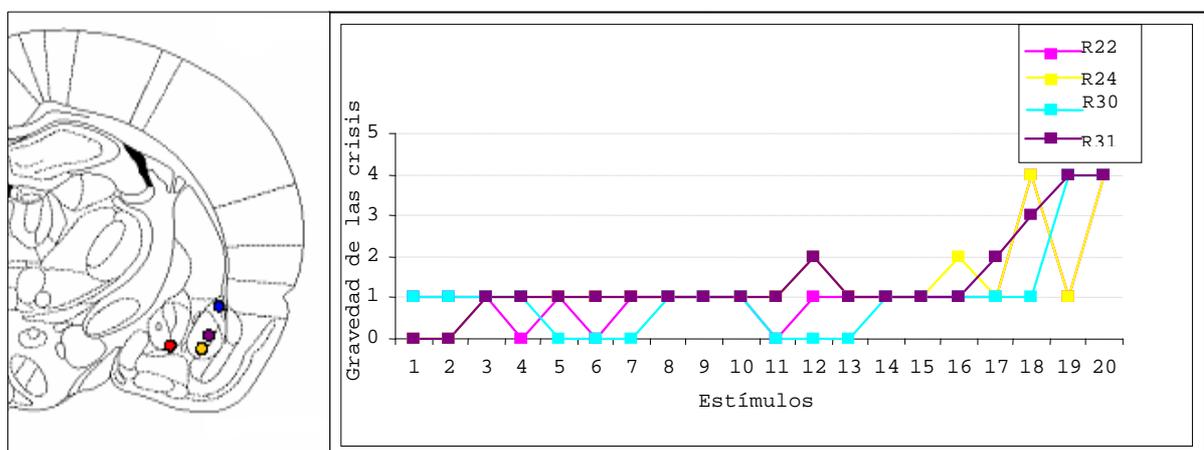


Figura 8. Animales con electrodo de estimulación en el complejo amigdalóide. Localización del electrodo de estimulación en el complejo amigdalóide (izquierda). Evolución de las crisis comportamentales (derecha).

Nueve animales con electrodos posicionados en diferentes núcleos del complejo amigdalóide no se consideraron totalmente estimulados, por no presentar crisis comportamentales clase 4 durante el desarrollo de la estimulación; razón por la que se excluyen del análisis estadístico (Figura 9). Núcleo medial (n=1); núcleo lateral (n=4); núcleo basomedial (n=1); núcleo basolateral (n=3).

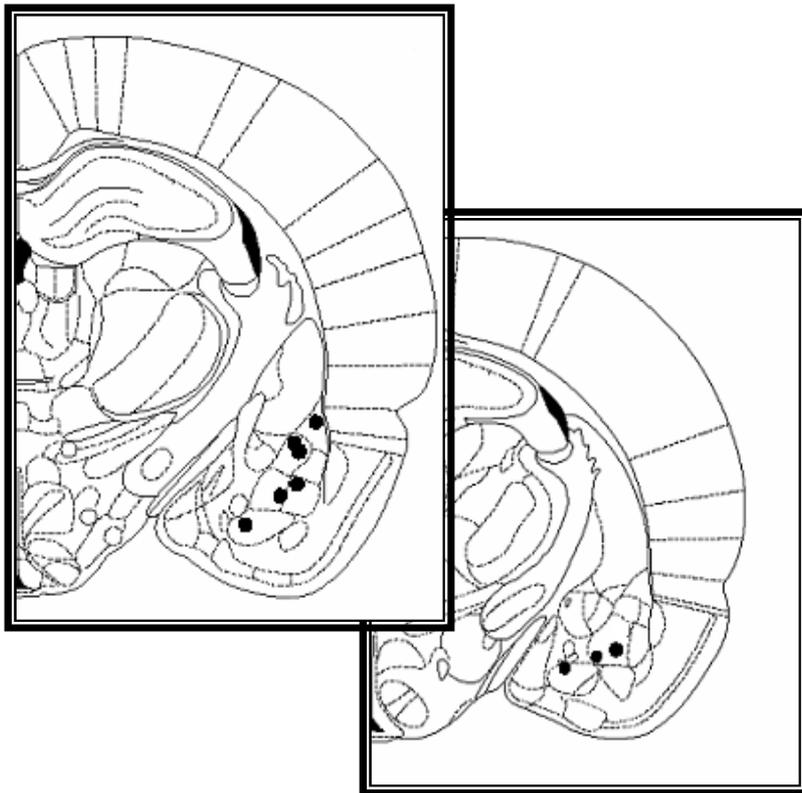


Figura 9. Localización de los electrodos en el complejo amigdalóide (izquierdo). Animales no totalmente estimulados

Nueve animales fueron implantados en diferentes núcleos del complejo amigdalóide, llevados a los instrumentos de estimulación,

pero no estimulados: animales del grupo sham (Figura 10). Núcleo basolateral (n=3); núcleo lateral (n=1); núcleo medial (n=1); núcleo intercalado de amígdala (n=1); división intraamigdalóide (n=3).



Figura 10. Localización de los electrodos en el complejo amigdalóide izquierdo. Grupo sham: animales no estimulados.

Análisis comportamental: Animales con electrodo de estimulación localizado en el complejo amigdaloides

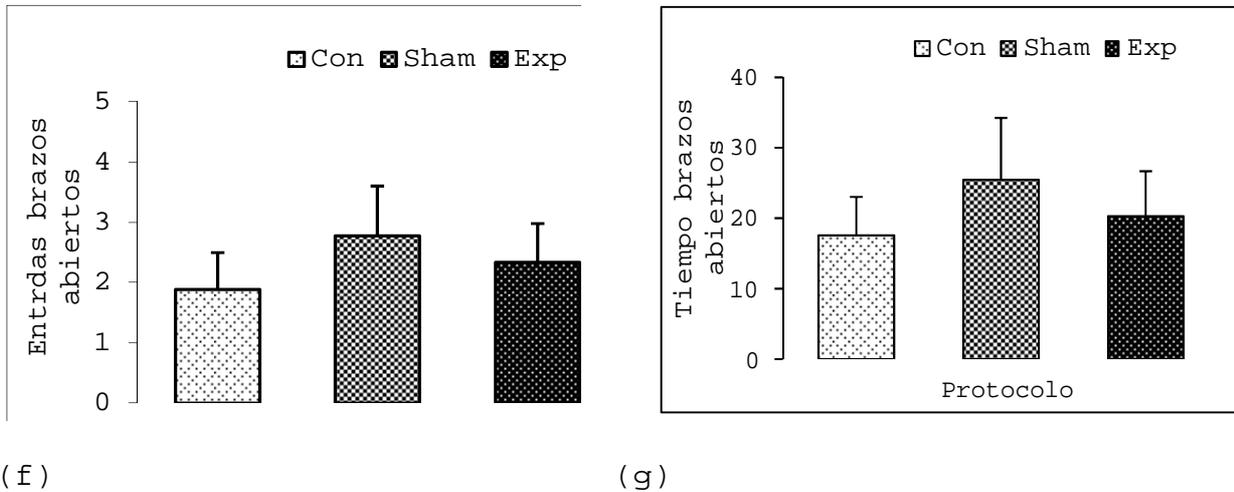


Figura 11. Laberinto en cruz elevado. Con (n=9), Sham (n=9), Exp (n=9) animales totalmente estimulados. Análisis estadístico Anova de una vía. (f) Entradas en los brazos abiertos; (g) Tiempo en los brazos abiertos. No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en estas medidas comportamentales.

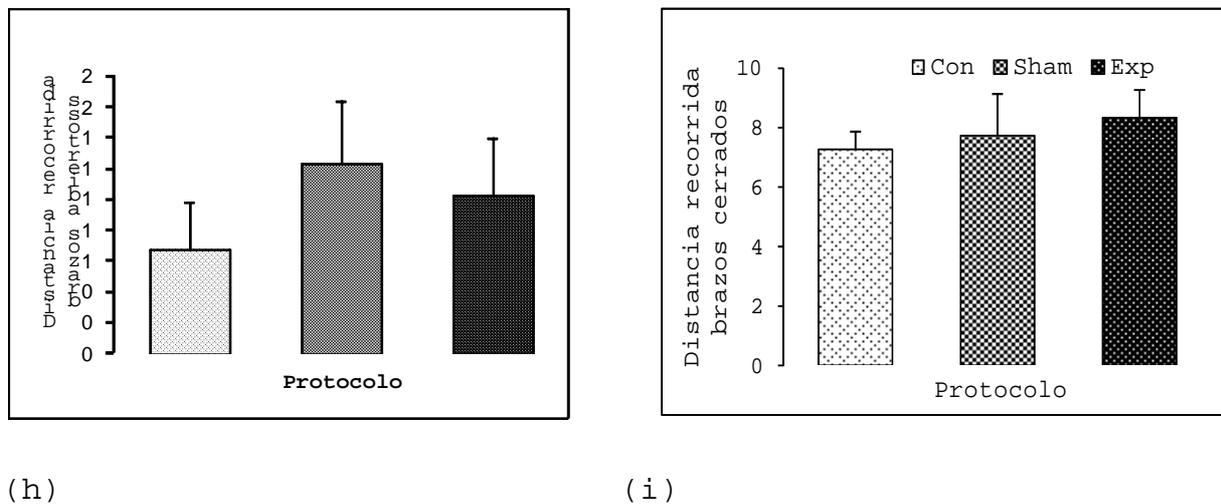


Figura 12. (h) Distancia recorrida en los brazos abiertos y (i) cerrados. Análisis estadístico Anova de una vía. No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en estas medidas comportamentales.

Animales con electrodo de estimulación localizado fuera del complejo amigdaloides

Cinco animales fueron implantados fuera del área de la amígdala (Figura 13). Ninguno de los animales fue totalmente estimulado.

Un animal (R03) con electrodo localizado en el CA1 del hipocampo, expreso crisis comportamentales clase 1 a partir del 7^o estímulo. En el 20^o estímulo tuvo una crisis clase 4.

Cuatro animales con electrodo localizado en núcleos basales sólo expresaron crisis comportamentales clase 1.

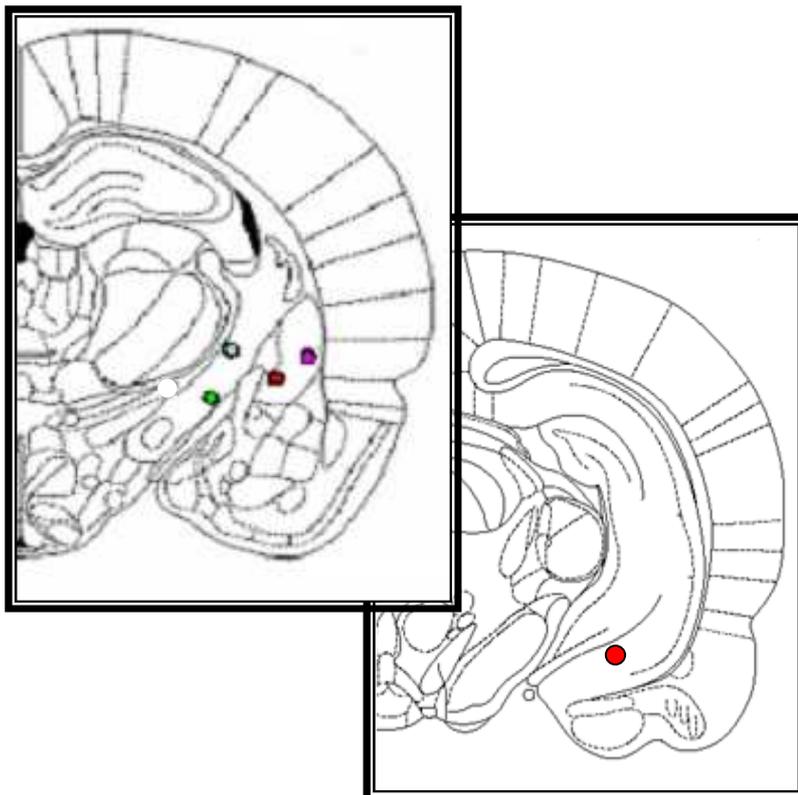


Figura 13. Localización de los electrodos fuera del complejo amigdaloides izquierdo.

Discusión

La estimulación eléctrica rápida de amígdala demostró ser un modelo práctico para el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal, provocando el desarrollo de crisis comportamentales progresivas durante los dos días de la estimulación. Para aclarar si la presencia de crisis más graves en el segundo día de estimulación es consecuencia del proceso de estimulación por sí solo, o si es dependiente del intervalo más prolongado sin estimulaciones entre los dos días del experimento, nuevas investigaciones deben ser realizadas (Foresti, 2005).

La estimulación eléctrica rápida de la ABL permitió inducir y evaluar alteraciones en el comportamiento emocional de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado, demostrando que es un buen modelo animal para el estudio de disturbios emocionales implicados en las crisis epilépticas. Animales totalmente estimulados, tienden a disminuir la frecuencia de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, respecto al grupo de animales no totalmente estimulados y el grupo sham. La frecuencia de entradas ($p=0.043$) y el tiempo de permanencia en las extremidades abiertas ($p=0.023$), disminuyó significativamente en animales totalmente estimulados respecto al grupo sham. También fue observada una disminución significativa en la distancia recorrida en los brazos abiertos en el grupo de animales completamente estimulados ($p=0.036$), comparado con el grupo sham.

Estos resultados no pueden atribuirse a una alteración en la actividad locomotora; ya que no fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de entradas ($p=0,263$)

y la distancia recorrida en los brazos cerrados ($P=0.281$). La estimulación eléctrica rápida de ABL izquierda aumentó los niveles de ansiedad, sin alterar la actividad locomotora, sugiriendo que las crisis epilépticas generadas en este núcleo, afectarían el comportamiento emocional en el laberinto en cruz elevado, modelo animal de ansiedad.

Adamec (1990,1991) demostró el mismo efecto ansiogénico en el laberinto en cruz elevado para la estimulación de ABL derecha, en el modelo de estimulación convencional. Empleando este mismo modelo, en contraste a los hallazgos del presente trabajo, Witkin (1988, citado en Adamec & Shallow, 2000) reportó un efecto ansiolítico para la estimulación de la amígdala basolateral izquierda, similar al descrito por Adamec y Morgan (1994, citados en Adamec & Shallow, 2000).

Sin embargo, destacando la importancia de niveles basales de ansiedad previos a la estimulación Adamec, Shallow & Burton (2005), cuestionan la conclusión sobre el efecto ansiolítico *per se*, de la estimulación de ABL izquierda. En su estudio, los autores identifican un efecto ansiogénico en ratas con bajos niveles de ansiedad previos a la estimulación; señalando de esta manera, que los efectos ansiolíticos de la estimulación de ABL izquierda ya reportados, no reflejarían una característica diferencial de ABL izquierda respecto a ABL derecha. La estimulación de las mismas áreas dentro de ABL derecha, produce efectos comportamentales opuestos, dependiendo de niveles basales de ansiedad; lo que también ocurriría para ABL izquierda. Otras investigaciones deben ser realizadas para abordar la contribución

relativa de la localización del electrodo y la ansiedad basal, en la determinación de la respuesta comportamental.

Considerados en conjunto, los hallazgos sobre los efectos de la estimulación de ABL izquierda y derecha, sustentan que niveles premórbidos de ansiedad interactúan con la estimulación, para posteriores resultados comportamentales. Este factor repercutiría incluso en la respuesta comportamental esperada, atendiendo a la localización del electrodo en núcleos específicos. Por esta razón, se requiere que nuevos estudios en esta línea, consideren la evaluación del estado premórbido de ansiedad.

Destacando una vez más las características de la amígdala en cada uno de los hemisferios, en acuerdo con trabajos previos de reconocimiento facial en humanos, Hardee, Thompson y Puce (2008), informan que la amígdala derecha e izquierda funcionan diferenciadamente en el procesamiento de la información emocional. Usando imágenes de resonancia magnética, los autores muestran que la amígdala derecha responde tanto a estímulos de miedo como de felicidad, sin diferencias significativas en la intensidad de respuesta. Distintamente, la amígdala izquierda responde selectivamente y con mayor activación a estímulos de miedo.

Trasladando al presente trabajo, los resultados del estudio que se reporta, y considerando la proyección de amígdala basolateral a otras áreas cerebrales relacionadas con el comportamiento defensivo, se sugiere que la estimulación de ABL izquierda, podría intensificar la activación de la amígdala durante la exposición al laberinto en cruz elevado, afectando el comportamiento exploratorio y la ansiedad.

La discrepancia entre los efectos comportamentales encontrados en el presente estudio y los trabajos ya publicados, también puede ser comprendida por las características del protocolo de estimulación empleado. Un factor de gran importancia es el intervalo entre cada estimulación. En el modelo de estimulación convencional, los estímulos se realizan una o dos veces por día, requiriendo aproximadamente 2 semanas para el desarrollo del experimento; entretanto, en modelos de estimulación rápida, con intervalo entre estímulos de 30 minutos o menos, un número significativamente mayor de estímulos es necesario para evocar la primera crisis generalizada, pero el tiempo necesario para la estimulación disminuye de semanas a horas (Goddard et al., 1969; Racine et al., 1973). Ambos protocolos también difieren en intensidad y duración: en el modelo convencional, son aplicados estímulos de 400 μ A durante 1 o 2 segundos; en el modelo de estimulación rápida, la intensidad de la corriente de los estímulos es más alta (supralimiar) y la duración también es mayor, 500 μ A durante 10 segundos.

Animales con el electrodo de estimulación localizado en el complejo amigdaloides, y no específicamente en la ABL, también presentan evolución durante la estimulación, desarrollando crisis clase 2 y 4. Estos datos indican que otros núcleos amigdaloides, también son susceptibles a la estimulación eléctrica rápida. Sin embargo, la estimulación de otros núcleos en el mismo hemisferio, provocó respuestas comportamentales menos homogéneas, como ya ha sido reportado en la literatura. La estimulación del núcleo medial, produjo ambos, un efecto ansiolítico y ansiogénico en el

laberinto en cruz elevado. Animales totalmente estimulados en el núcleo lateral, expresaron un efecto ansiolítico. Al ser analizados en conjunto, no se hallaron diferencias estadísticas significativas en el comportamiento de ratas totalmente estimuladas en el complejo amigdaloides, respecto al grupo sham y control.

En contraste, el análisis individual y en conjunto, de ratas totalmente estimuladas en la ABL izquierda, revela un efecto ansiogénico en el laberinto en cruz elevado. A pesar de no constituir un grupo representativo, por fines del presente estudio a los efectos de la estimulación en ABL izquierda; el análisis comportamental individual de animales totalmente estimulados en otros núcleos del complejo amigdaloides, considerando la localización anatómica, sustenta la idea del comprometimiento de la amígdala en la patogénesis y sintomatología de la epilepsia del lóbulo temporal y la participación específica del núcleo basolateral de amígdala.

Los hallazgos reportados, son de gran relevancia clínica en la medida que aproximan hacia la comprensión del tipo de alteración afectiva acompañando la epilepsia de acuerdo a características individuales y el foco de la crisis. El tratamiento de los disturbios afectivos presentes en esta condición neurológica, podría considerar estos parámetros.

Conclusiones

La estimulación eléctrica rápida de amígdala provocó el desarrollo de crisis epilépticas progresivas, demostrando ser eficaz para el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal. Estructuras del complejo amigdaloides, distintas al núcleo basolateral, también son susceptibles al abramiento rápido.

La estimulación eléctrica de la ABL permitió inducir y evaluar alteraciones en el comportamiento emocional de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado, indicando que es un buen modelo animal para el estudio de disturbios emocionales implicados en las crisis epilépticas.

La estimulación de amígdala basolateral izquierda provocó un efecto ansiogénico en el laberinto en cruz elevado. La estimulación de otros núcleos, produjo ambos, un efecto ansiogénico y ansiolítico.

La estimulación del núcleo basolateral de amígdala en el hemisferio izquierdo no es siempre ansiolítico; en el presente trabajo se halló un efecto de tipo ansiogénico.

Referencias

- Adamec, R. (1978). Normal and abnormal limbic system mechanisms of emotive biasing. En Livingston KE, Hornykiewicz, O. *Limbic Mechanisms*. New York: Plenum Press. 405-55.
- Adamec, R. (1990a). Does kindling model anything clinically relevant? *Biol Psychiatry*, 27, 249-79.
- Adamec, R. (1990b). Amygdala Kindling and Anxiety in the Rat. *Neuroreport*, 1, 255-8.
- Adamec, R. (1990c). Kindling, anxiety and limbic epilepsy: human and animal perspectives, En: J.A. Wada Ed. *Kindling 4*, Plenum, New York, 329-341.
- Adamec, R. (1991). Partial kindling of the ventral hippocampus: Identification of changes in limbic physiology which accompany changes in feline aggression and defense. *Physiol Behav*, 49, 443-53.
- Adamec, R. (1993). Partial limbic kindling—brain, behavior, and the benzodiazepine receptor. *Physiol Behav*, 54, 531-45.
- Adamec, R. (1997). Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense—implications for understanding anxiety following traumatic stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 755-65.
- Adamec, R. (1998). Amygdala kindling and rodent anxiety. En: Corcoran ME, Moshe SL. *Kindling 5*. New York: Plenum Press, 327-48.
- Adamec, R., Blundell, J., & Burton, P. (2004) Anxiolytic effects of kindling role of anatomical location of the kindling

electrode in response to kindling of the right basolateral amygdala. Brain Research, 1024, 44-58.

Adamec, RE. & McKay, D.(1993). Amygdala kindling, anxiety and corticotrophin releasing factor (CRF). Physiol Behav, 54, 423-31.

Adamec, R. & Morgan, H. (1994).The effect of kindling of different nuclei of the amygdala on anxiety in the rat. Physiol Behav, 55, 1-12.

Adamec, R. & Shallow, T.(2000). Effects of baseline anxiety on response to kindling of the right medial amygdala. Physiology & Behavior,70, 67-80.

Adamec, R. & Stark-Adamec, C. (1983). Partial kindling and emotional bias in the cat: Lasting after-effects of partial kindling of ventral hippocampus.I: behavioral changes. Behav. Neur. Biol, 38, 205-222.

Adamec, R., Shallow, T. & Burton, P. (2005). Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. Behav Brain Res, 159(1): 73-88.

Armitage, LL., Mohapel, P., Jenkins, EM., Hannesson, DK. & Corcoran, ME. (1998). Dissociation between mossy fiber sprouting and rapid kindling with low-frequency stimulation of the amygdala. Brain Res, 781, 37-44.

Aroniadou-Anderjaska, V., Qashu, F. & Braga, MF . (2007). Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in

the basolateral amygdala: Implications for epilepsy and anxiety disorders. *Amino Acids* 32, 305-15.

Bland, BH. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol*, 26 (1), 1-54.

B.P, Hermann. & S, Whitman. (1984). Behavioral and personality correlates of epilepsy: A review, methodological critique, and conceptual model, *Psychiatr. Bull*, 95, 451-497.

Buzsaki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, (3), 325-340.

Carobrez, AP. & Bertoglio, LJ.(2005).Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(8),1193-205.

Cockerell, OC., Shorvon, SD., (1997). IX Elettrencefalografia. En: *Epilepsia: conceitos atuais*. Eds: Cockerell OC, Shorvon SD. Current Medical Literature. Pág:94.

Crusio, W. E., Schwegler, H. & van Abeelen, J. H. F. (1989). Behavioral responses to novelty and structural variation of hippocampus in mice. I. Quantitative genetic analysis of behavior in the open-field. *Behavioural Brain Research*, 32, 81-88.

Cruz, AP., Frei, F. & Graeff, FG. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 49(1), 171-6.

Dutra-Moraes, MF., Galvis-Alonso, OY. & Garcia-Cairasco, N. (2000). Audiogenic kindling in the Wistar rat: A potential

model for recruitment of limbic structures. Epilepsy Res, 39, 251-259.

Ebert, U. & Loscher, W. (1995). Differences in mossy fibre sprouting during conventional and rapid amygdala kindling of the rat. Neurosci Lett,(3), 199-202.

Feasey-Truger, KL., Kargl, L. & Ten Bruggencate, G. (1993). Differential effects of dentate kindling on working and reference spatial memory in the rat. Neurosci Lett.

Foresti, ML.(2005).Correlatos comportamentais, eletrencefalográficos e morfológicos no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal por abrasamento elétrico rápido da amígdala. Tesis de Doctorado. Programa de Posgraduación en Neurología, subdivisión Neurociencias, FMRP, USP.

Foresti, ML., Arisi, GM., Fernandes, A., Tilelli, CQ & Garcia-Cairasco, N. (2008). Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. Epilepsy Research, 79, 166-72.

Gloor, P. (1997). The temporal lobe and limbic system. Oxford University Press, Pag: 865.

Goddard, GV. (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. Nature 214, 1020-1021.

Goddard, GV., McIntyre, DC. & Leech, CK. (1969).A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp Neurol, 25, 295-330.

- Graeff, F.G., Guimarães, F.S. & Zuardi, W. (1999). V Medicamentos Ansiolíticos. En: Fundamentos de Psicofarmacologia. Eds: Graeff F.G, Guimarães F.S. Atheneu. 123 p.
- Griffin, N., Engel, J. & Bandler, R. (1987). Ictal and enduring interictal disturbances in emotional behavior in an animal model of temporal lobe epilepsy. Brain Res, 400, 360-364.
- Guerreiro, C.A.M., Guerreiro, M.M., Cendes, F. & Lopes-Cendes, I. (2000). Considerações Gerais. En: Epilepsia. Eds:Guerreiro, CAM.; Guerreiro, MM.; Cendes. F.; & Lopes-Cendes I. Lemos Editorial & Gráficos (3 edición). 419.
- Handley, S.L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 327, 1-5.
- Hardee, E., Thompson, C. & Pucel, A.(2008).The left amygdala knows fear: Laterality in the amygdala response to fearful eyes, SCAN, 3, 47-54.
- Helfer, V., Deransart, C., Marescaux, C. & Depaulis, A. (1996). Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences. Neuroscience,73,971-8.
- Hermann, B.P. & Whitman, S.(1984).Behavioral and personality correlates of epilepsy: A review, methodological critique, and conceptual model. Psych Bull, 95, 451-497.
- Hiyoshi, T., Matsuda, M. & Wada, J.A.(1990).Centrally induced feline emotional behavior and limbic kindling. Epilepsia, 31, 259-269.

- Jibiki, I., Ohtani, T., Kubota, T. & Yamaguchi, N. (1981). Development of kindling in acute experiments and serial changes of field excitatory and inhibitory post-synaptic potentials during the "acute kindling". Brain Res, 209, 210-215.
- Kalynchuk, LE., Pinel, JPJ., Treit, D. & Kippin, TE. (1997). Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. Biol Psychiatry, 41, 438-451.
- Kalynchuk, LE., Pinel, JPJ., Treit, D. & Kippin, TE. (1997). Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. Biol Psychiatry, 41, 438-51.
- Kotagal, P. (1999). Seizure semiology of mesial temporal lobe epilepsy. En: The epilepsies, etiologies and prevention. Eds: Kotagal P and Lüders HO. Academic Press. Pág.:587.
- Leung, L.S. & Shen, B. (1991). Hippocampal CA1 evoked response and radial 8-arm maze performance after hippocampal kindling. Brain Res, 555, 353-357.
- Lothman, E.W., Hatlelid, JM. & Zorumski, CF. (1985). Functional mapping of limbic seizures originating in the hippocampus: a combined 2-Deoxyglucose and electrophysiologic study. Brain Res, 360, 92-100.
- Löscher, W., Wahnschaffe, U., Hönack, D. & Rundfeldt, C. (1995). Does prolonged implantation of depth electrodes predispose the brain to kindling?. Brain Res, 697, 197-204.
- McGaugh, J.L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. Trends Neurosci, 25 (9), 456-461.

- McNamara, J.O. (1984). Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. *Ann Neurol*, 16, S72-S76.
- Michael, M., Holsinger, D., Ikeda-Douglas, C., Cammisuli, S., Ferbinteanu, J., DeSouza, C., DeSouza, S., Fecteau, J., Racine, R.J. & Milgram, N.W. (1998). Development of spontaneous seizures over extended electrical kindling I. Electrographic, behavioral, and transfer kindling correlates. *Brain Res*, 793, 197-211.
- Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Comp Physiol Psychol.*, 48(4), 254-60.
- Morimoto, K., Fahnestock, M. & Racine, R.J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: Rewiring the brain. *Prog Neurobiol*, 73, 1-60.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997). En: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (4 edición), Paxinos, G. Watson C, eds, San Diego: Academic Press.
- Paré, D., Collins, D.R. & Pelletier, J.G. (2002). Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. *Trends Cogn Sci*, 6 (7), 306-314.
- Peele, D.B. & Gilbert, M.E. (1992). Functional dissociation of acute and persistent cognitive deficits accompanying amygdala-kindled seizures. *Behav Brain Res*, 48, 65-76.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. & Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a

measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods, 14, 149-167.

Pinel, J.P.J. & Rovner, L.I. (1978). Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. Exp Neurol, 58, 190-202.

Pitkänen, A., Savander, V. & LeDoux, JE. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. Trends Neurosci, 20, 517-523.

Pratt, J.A. (1992). The neuroanatomical basis of anxiety. Pharmacol Ther, 55, 149-81.

Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. Electroenceph Clin Neurophysiol, 32, 281-294.

Racine, R.J., Burnham, WM., Gartner, JG. & Levitan, D. (1973). Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: Strain and inter-stimulation interval effects. Electroenceph Clin Neurophysiol, 35, 553-556.

Ragazzo, P.C. (2000) VII Eletrencefalografia: Conceitos básicos. En: Epilepsia. Eds: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Lemos Editorial & Gráficos (3 edición). Pág.:419.

Represa, A., Le Gall La Salle, G. & Ben-Ari, Y. (1989). Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. Neurosci Lett, 99 (3), 345-50.

- Sakamoto, A.C., Garzon, E. & Fernandes, RMF. (2000) VIII EEG nas epilepsias e síndromes epilépticas. En: Epilepsia. Eds: Guerreiro, CAM.; Guerreiro, MM.; Cendes, F.; & Lopes-Cendes, I. Lemos Editorial & Gráficos (3 edición). Pág.: 419.
- Sayin, U., Osting, S., Hagen, J., Rutecki, P. & Sutula, T. (2003). Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axosomatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. J Neurosci, 23(7), 27-59.
- Steriade, M. (1993). Cellular substrates of Brain Rhythms. En: Niedemeyer E e Lopes da Silva F (eds). Electroencephalography: Basic principles, clinical applications, and related fields. Williams and Wilkins. Baltimore. Pág: 27-62.
- Timofeeva, O.A. & Peterson, G.M.(1999).Dissociation of mossy fiber sprouting and electrically-induced seizure sensitivity: Rapid kindling versus adaptation. Epilepsy Res,33, 99-115.
- Treit, D., Menard, J. & Royan, C.(1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, 44(2), 463-9.
- Wang, X. (2003). Neural oscillations. En: Encyclopedia of Cognitive Science, MacMillan Reference Ltd ,<http://wanglab.ccs.brandeis.edu/>

Anexos

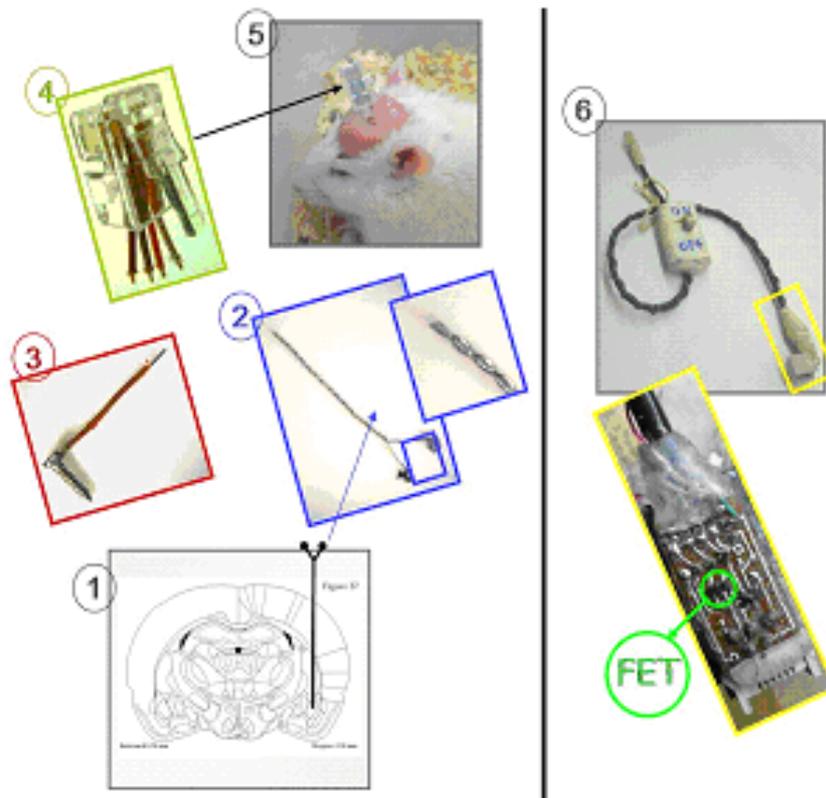
Anexo 1

Laberinto en cruz elevado



Anexo 2

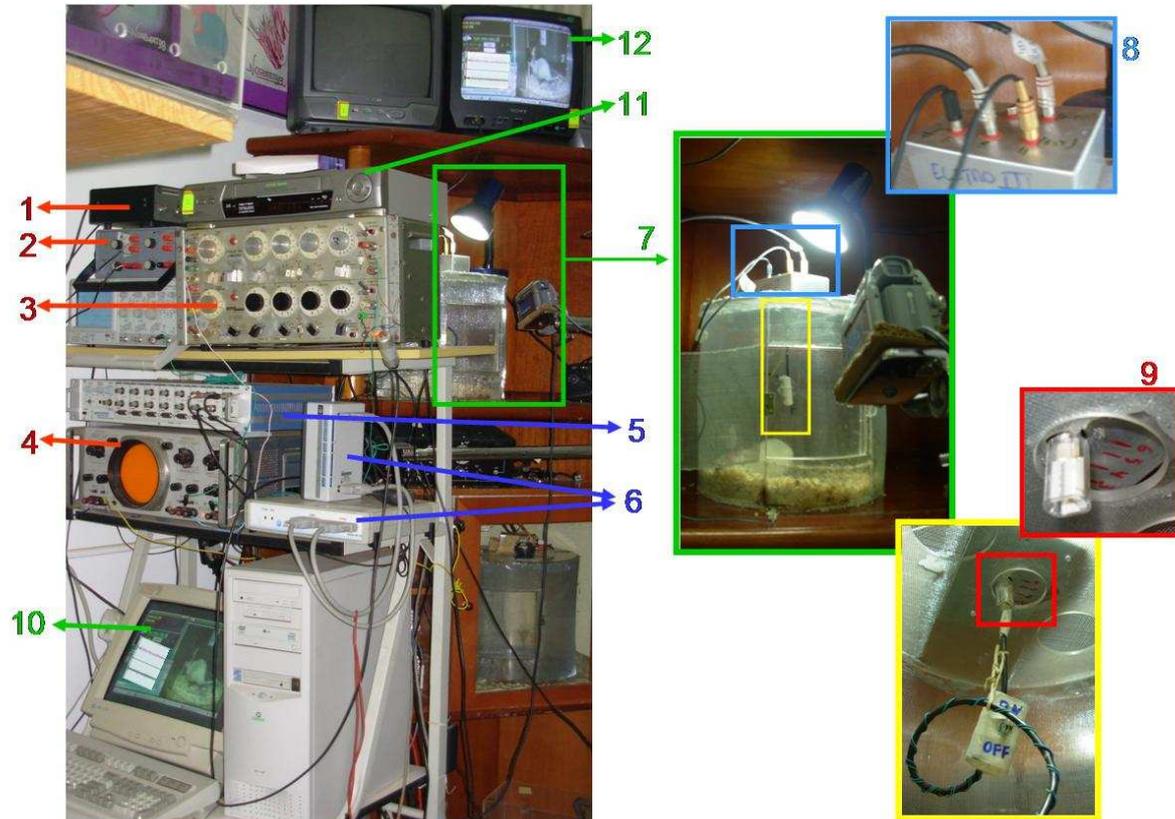
Diseño esquemático de los electrodos implantados en la amígdala



- 1- Diseño esquemático de los electrodos implantados en la amígdala
- 2- Fotografía del tipo de electrodo implantado, el detalle destaca la punta del electrodo bipolar
- 3- Cable soldado al tornillo implantado en el hueso frontal que sirve como referencia para el registro monopolar del electroencefalograma
- 4- Conector telefónico macho de 4 cables, en el cual es soldado el electrodo localizado en la amígdala
- 5- Conector fijado por el acrílico
- 6- Imagen del cable que conecta el animal al sistema de registro EEGráfico y estímulo.

Anexo 3

Estimulación y registros eléctricos



- 1- Controlador del tiempo de estímulo y disparador del mismo.
- 2- Control de la intensidad del estímulo.
- 3- Estimulador GRASS S88 que controla otros parámetros del estímulo como el tipo de onda y la frecuencia. Los equipamientos 1 y 2 están conectados a ese estimulador.
- 4- Osciloscopio.
- 5- Amplificador y filtro de las señales EEGráficas (CyberAmp).
- 6- Conversor A/D de la señal del EEG.
- 7- Filmadora y caja de Faraday donde es realizado todo el experimento, note en detalle:

- 8- Caja de distribución de las señales y,
- 9- *Swivel* que conecta el cable a la caja de distribución de señales
- 10- Imagen generada en la tela del computador conteniendo la señal de EEG y la imagen del animal, constituyendo así el vídeo-EEG.
- 11- Vídeo casete que graba la imagen de la tela del computador.
- 12- Televisión conectada al vídeo-casete para garantizar la grabación