

MAPEO CORTICAL QUE MUESTRA EL EFECTO DE LAS ENCEFALINAS EN UN FOCO EPILÉPTICO

Adrián Martínez^{1,2}, Rodrigo Fernández-Mas¹, Alejandro Valdés-Cruz¹, Victor Magdaleno-Madrigal¹, Augusto Fernández-Guardiola^{1,3}

SUMMARY

Introduction. Epileptic activity modifies the endogenous opioid system by increasing its levels at the end of the ictal phase, and in post-ictal and interictal phases. This increase originates a cortical excitatory effect which suppresses both slow wave sleep and REM. The epileptic activity is initiated with the presence of interictal epileptiform activity, which may be induced through penicillin administration into amygdaline nuclei. Interictal epileptiform activity is a widely employed tool used to determine the localization of epileptic foci characterized by the sudden presence of spikes or acute waves in an electroencephalogram (EEG). In the present work, this tool was used to study the participation of the opioid system in the installation and propagation of epileptic activity induced in temporal lobe amygdala. In the epileptogenetic study, amygdaline interictal epileptiform activity was used to assess changes induced by opioids and an antagonist in the occurrence of interictal activity using an event histogram. Propagation was studied with the cortical topographic mapping technique, which shows EEG frequency components in a power spectrum, as well as the rhythmic EEG patterns.

The aim of the present study was to analyze the effect of enkephalins on epileptiform activity induced with penicillin in temporal lobe amygdala and its propagation to the cerebral cortex.

Method. Fifteen male *Wistar* rats were submitted to an acute preparation; they were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.). A stainless steel bipolar electrode provided with a cannula was directed toward the left amygdaline basolateral nucleus and a second concentric bipolar electrode to the right amygdaline basolateral nucleus.

Two types of cortical recordings were carried out: global mapping and restricted areas. The first consisted of the placement of a 16 stainless steel electrode matrix (in which the electrodes from the vertex were removed) on the scalp, taking care that the tips of the electrodes were in contact with the cortex; this arrangement covered the whole cerebral cortex. The second involved a 4x4mm square matrix consisting of 16 equidistant electrodes placed on the cerebral cortex. The cortical recording was a result of placing this matrix in four different positions so that the whole cerebral cortex was monitored.

To monitor cortical recordings, experimental groups were injected penicillin into the amygdaline nuclei. To perform global mapping, enkephalins, [D-ala²]-methionine and [D-ala²]-leucine, were topically applied into the amygdaline nuclei and naloxone was administered systemically.

Analogical signals were recorded in a video-tape and were digitized in parallel with an HP workstation. Off-line analysis was carried as follows: a) information recorded in video-tapes was acquired in a computer designed for this purpose, using amygdaline interictal epileptiform activity to plot event histograms; b) EEG digitized signal, obtained from global mapping, was used to obtain a spectral analysis, consisting of color images maps in time and frequency domains, using RBEAM software. The recording of electrical activity obtained with the square matrix was visually analyzed only.

At the end of each experiment, animals were perfused and each brain was fixed intracardially with 10% formaldehyde. To verify the recording and sub-cortical injection sites, the rapid procedure was used.

Results. During control stages, cortical records showed slow activity in the form of spindles in all the recording channels; this was due to urethane. Penicillin administration in amygdaline nuclei induced epileptiform activity with a specific pattern: immediate appearance after penicillin application with a gradual increase in amplitude until stabilization was reached within 5-10 minutes of administration.

Analyses of global mapping in the frequency domain showed a specific mode of amygdaline interictal epileptiform activity propagation, starting in ipsilateral temporal, prefrontal and frontal cortices, appearing subsequently in contralateral prefrontal and frontal cortices, and finally in temporal cortex. In the time domain spectrum, an electric dipole generating an interictal spike was found in cerebral cortex.

Restricted areas mapping approach showed interictal epileptiform activity and its propagation along the ipsilateral fronto-temporal region. Data revealed an antero-posterior medial cortical activation spreading with decreasing intensity toward occipital regions.

Application of enkephalins-[D-ala²]-methionine and [D-ala²]-leucine produced no epileptic activity, but an increase in basal EEG

¹Subdirección de Investigación en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente

²Enep Aragón

³Facultad de Psicología UNAM.

Correspondencia: Dr. Adrián Martínez. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. Calzada México-Xochimilco 101, col. San Lorenzo Huipulco 14370 México, D.F. E-mail: adrianmc@imp.edu.mx

Recibido primera versión: 18 de diciembre de 2003. Segunda versión: 18 de junio de 2004. Aceptado: 6 de agosto de 2004.

of cortical epileptiform activity was detected, as well as a decrease in amplitude and frequency of amygdaline epileptiform activity. Naloxone originated a facilitatory effect, since its administration induced focal and generalized electrocorticographic seizures.

Conclusions. Focal penicillin is a reliable model of interictal spikes, paroxysms and generalized seizures. The study in rats showed a propagation of epileptic activity to prefrontal cortices prior to contralateral amygdala.

Our results showed that enkephalins produced a double effect. First, they originated an increase in basal EEG in temporal cortical areas, as well as a putative participation in propagation mechanisms. Second, they exerted an inhibitory effect on epilepsy installation mechanisms. The inhibitory effect originated by enkephalins was reverted by naloxone.

Key words: Epilepsy, amygdala, penicillin, cortical mapping, enkephalins.

RESUMEN

Introducción. La actividad epiléptica modifica el sistema de los opioides endógenos al aumentar su concentración al término de la fase ictal, en la fase postictal y durante la fase interictal. Este aumento genera un efecto excitador cortical que suprime el sueño de ondas lentas y el sueño de movimientos oculares rápidos. La actividad epiléptica se inicia con la aparición de una actividad epileptiforme interictal (AEI), la cual se puede inducir con penicilina en los núcleos amigdalinos. La AEI es una herramienta muy usada para determinar la localización de un foco epiléptico, la cual se describe como la aparición abrupta de espigas o de ondas agudas en el electroencefalograma (EEG). En el presente trabajo se utilizó esta herramienta para estudiar la participación del sistema opioide en la instalación y la propagación de la actividad epileptiforme inducida en la amígdala del lóbulo temporal. La epileptogénesis se estudió utilizando la AEI amigdalina para observar los cambios inducidos por los opioides y su antagonista en la ocurrencia de la actividad interictal por medio de un histograma de eventos. La propagación se estudió empleando la técnica del mapeo topográfico cortical, el cual nos muestra los componentes de frecuencia del EEG por medio del espectro de potencia, así como la evolución de los patrones rítmicos del EEG.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de las encefalinas en la actividad epiléptica inducida por la penicilina en la amígdala del lóbulo temporal y su propagación hacia la corteza cerebral.

Método. Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa *Wistar*, en preparación aguda y anestesiadas con uretano (1.2 gr/kg i.p.). Se dirigió un electrodo bipolar de acero inoxidable unido a una cánula hacia el núcleo basolateral amigdalino izquierdo y un electrodo bipolar concéntrico hacia el núcleo basolateral amigdalino derecho.

Se realizaron dos tipos de registro cortical: un mapeo global y otro de áreas restringidas. El primero consistió en la colocación de una matriz de 16 electrodos de acero inoxidable (tras eliminar los electrodos del vértex) sobre el cráneo, procurando que la punta del electrodo tocara la corteza y cubriendo toda la corteza cerebral. El segundo se realizó colocando sobre la corteza cerebral una matriz cuadrada de 4x4mm, que contenía 16 electrodos distribuidos equidistantemente. El registro cortical se obtuvo colocando la matriz cuadrada en cuatro posiciones diferentes, a fin de cubrir así toda la corteza cerebral.

A los grupos experimentales se administró penicilina G sódica

(Pn), que se inyectó en los núcleos amigdalinos para realizar registros corticales. En el caso del mapeo global, las encefalinas [D-Ala²]-metionina y [D-Ala²]-leucina se aplicaron tópicamente en los núcleos amigdalinos; a su vez la naloxona fue administrada sistémicamente.

Las señales analógicas se grabaron en cinta de video y paralelamente se digitalizaron en una estación de trabajo HP. El análisis fuera de línea se realizó de la siguiente forma: a) la señal grabada en las cintas de video se transfirió a una computadora de uso específico, utilizando la AEI amigdalina para realizar los histogramas de eventos; b) la señal digitalizada del EEG, que se obtuvo del mapeo global, se utilizó para obtener el análisis espectral, el cual consistió en elaborar imágenes en color de mapas en el dominio del tiempo y la frecuencia con el programa RBEAM. El registro de la actividad eléctrica cerebral obtenida por la matriz cuadrada sólo se analizó visualmente.

Al final de cada experimento se procedió a perfundir la sangre y a fijar intracardialmente el cerebro con formaldehído al 10%. Para verificar los sitios de registro e inyección subcorticales, se utilizó la técnica del procedimiento rápido.

Resultados. En el registro cortical se observó, en la situación control, una actividad lenta en forma de husos, en todos los canales, inducida por el uretano. La aplicación de Pn en los núcleos amigdalinos indujo una actividad epileptiforme de la siguiente forma; aparición inmediata después de su aplicación y un aumento gradual de su amplitud hasta estabilizarse a los 5-10 minutos de su aplicación.

Con el análisis del mapeo global en el dominio de las frecuencias, se observó el siguiente orden de propagación de la AEI amigdalina: se inició en las cortezas temporal, prefrontal y frontal ipsilateral; después apareció en las cortezas prefrontal y frontal, y, por último, en la corteza temporal contralateral. En el dominio del tiempo, se observó un dipolo eléctrico que generó una espiga interictal en la corteza cerebral.

Los mapeos de las áreas restringidas mostraron la localización frontotemporal ipsilateral de la AEI y su propagación. Los datos revelan una activación cortical medial antero-posterior de intensidad decreciente hacia las regiones occipitales.

La aplicación de las encefalinas [D-Ala²]-metionina y la [D-Ala²]-leucina, no produjo actividad epiléptica, pero sí se observó un aumento en la basal del EEG de la actividad epileptiforme cortical y una disminución de la amplitud y la frecuencia de la AEI amigdalina. La naloxona produjo un efecto facilitador, ya que su administración indujo crisis focales y generalizadas electrocorticográficas.

Conclusiones. Considerando que la aplicación de Pn focal es un modelo confiable de espigas interictales, de paroxismos y de crisis generalizadas, su aplicación en el cerebro de la rata mostró una propagación de la actividad epileptiforme amigdalina que se dirigió más hacia las cortezas prefrontales que a la amígdala contralateral.

Nuestros resultados muestran que las encefalinas producen un doble efecto. El primero consiste en un aumento en la basal del EEG en las áreas corticales temporales, que podrían estar participando en los mecanismos de propagación. El segundo efecto es la inhibición de los mecanismos de instalación de la epilepsia. El efecto de inhibición generado por las encefalinas fue revertido por la naloxona.

Palabras clave: Epilepsia, amígdala, penicilina, mapeo cortical, encefalinas.

INTRODUCCIÓN

La actividad cortical estudiada en la rata ha mostrado cambios puntuales con el análisis de frecuencia de la actividad basal del EEG (7, 10). Sin embargo, hay pocos estudios acerca de la actividad epiléptica y la propagación del foco subcortical hacia la corteza en la rata (4, 29). En estudios anteriores, nuestro grupo describió la propagación de la AEI hacia la corteza producida por el *kindling* (18) eléctrico (13, 14) y por la aplicación tópica de Pn (12) en la amígdala del lóbulo temporal.

También hemos reportado el desarrollo de un *kindling* amigdalino compactado por la estimulación química (15), o bien, por la estimulación eléctrica más la aplicación sistémica de naloxona (antagonista de los opioides endógenos) (16). Los opioides endógenos han intervenido en la epileptogénesis, con lo que se ha encontrado un aumento de la liberación y del contenido tisular (8, 43), durante la actividad interictal de un foco amigdalino (3), por las crisis inducidas por el ácido kaínico (36) y por *electroshock* (23, 40). En el humano se ha encontrado un aumento de los péptidos opioides en el líquido cefalorraquídeo después de las crisis (24). Asimismo, se ha reportado su disminución en la epileptogénesis inducida con pentilinetetrazol (42), con ácido kaínico 28 días después del *status* epiléptico (36) de los mismos. La aplicación intracerebral de Leu y Met encefalinas ha generado discrepancias pues, por un lado, se ha registrado la evocación de espigas epiléptiformes (9) y, por otro, no produce ninguna manifestación local o generalizada de descargas epilépticas (30, 31).

La AEI se ha analizado con respecto a la integración temporal de las variaciones de frecuencia en el área cortical a los cambios de su amplitud y a la presencia de paroxismos por el análisis visual (13). Las técnicas de análisis de la actividad cerebral, como la magnetoencefalografía (41), la tomografía computarizada por emisión de fotones (25) y la resonancia magnética funcional (5), utilizan las espigas interictales epiléptiformes para localizar el foco epiléptico en humanos, y el EEG como referencia en la elaboración de sus imágenes. La ventaja de usar estas técnicas en la localización de los focos epilépticos es disminuir la necesidad de implantar electrodos subcorticales y con ello reducir a su vez el registro subcortical (39). El EEG no se ha abandonado como técnica de diagnóstico y aún se siguen desarrollando aplicaciones a partir de su registro. Prueba de ello es el método de análisis basado en la transformada rápida de Fourier (14), que muestra los componentes de frecuencia del EEG, así como la evolución de patrones rítmicos difíciles de detectar por la simple inspección

visual (19, 22). Las descargas epiléptiformes interictales corticales tienen un origen diverso debido a la compleja interacción entre las regiones corticales (1). Lo anterior da como resultado un reclutamiento de la actividad neuronal de vías anatómicas específicas, relacionadas con la sincronización cerebral y su propagación hacia la corteza cerebral. Estas se han podido estudiar utilizando las técnicas de imágenes cerebrales (5, 14, 19, 22, 25, 39, 41).

El propósito del presente trabajo fue examinar la participación opioide en la AEI inducida por penicilina en el núcleo basolateral amigdalino y su propagación hacia la corteza cerebral, mediante la administración de Leu y Met encefalinas y de naloxona utilizando mapeos globales y de áreas restringidas corticales.

MÉTODO

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Ética en Investigación con Animales del INPRFM. Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa *Wistar*, con un peso entre 250-350gr, anestesiadas con uretano (1.2 gr/kg i.p.); en los sitios de incisión se les aplicó lidocaína al 2%. La temperatura se mantuvo en 38°C por medio de un colchón térmico alimentado con DC para no inducir ruido de 60Hz en el registro durante el experimento. Se dirigieron estereotáxicamente (33) un electrodo bipolar de acero inoxidable unido a una cánula y un electrodo bipolar concéntrico hacia el núcleo basolateral amigdalino izquierdo y derecho respectivamente. Las coordenadas fueron 2.8mm posterior al Bregma, lateral 5.0mm y vertical 8.5mm. Las 15 ratas se dividieron en dos grupos independientes: 10 para el mapeo global y cinco para el mapeo restringido. Enseguida se especifica el método para cada una de las preparaciones.

Preparación para el mapeo global

Una matriz de 16 electrodos de acero inoxidable en forma de clavo se colocó sobre el cráneo (con una distancia entre electrodos de 2mm), procurando que la punta de los electrodos tocara la corteza. Los electrodos se fijaron con acrílico dental; para ello se utilizó el atlas de la corteza (44). La matriz tuvo la variación de eliminar los electrodos del vértex. Los electrodos se colocaron en las cortezas prefrontal, frontal, central, parietal, occipital y temporal (donde se inserta el músculo masetero).

Preparación para el mapeo restringido

Una craneotomía se realizó para descubrir el total de la corteza y colocar la matriz cuadrada de 4X4mm. Esta matriz contenía 16 electrodos de acero inoxidable

ble cubiertos con teflón, distribuidos equidistantemente (figura 6A), la cual restringía a 16mm^2 el área para el registro cortical.

Fármacos

En ambos procedimientos experimentales, los animales recibieron 200 U.I. de Pn en $1\mu\text{l}$ de solución salina al 0.9%, administrados localmente con una microjeringa Hamilton. Para el grupo de mapeo global, se disolvieron $10\mu\text{g}$ en $1\mu\text{l}$ de solución salina al 0.9% de las encefalinas la [D-Ala²]-metionina y la [D-Ala²]-leucina, las cuales se aplicaron tópicamente en los núcleos amigdalinos. La naloxona se disolvió en solución salina al 0.9% y se administró 0.5 mg/kg en un mililitro por vía sistémica.

Al final de cada experimento se procedió a perfundir la sangre y fijar intracardialmente el cerebro con formaldehído al 10%. Para la verificación de los sitios subcorticales de inyección y de registro, se utilizó la técnica del procedimiento rápido (21).

Procedimiento

En las dos preparaciones, los registros corticales se obtuvieron usando derivaciones monopolares, la referencia común fue el músculo dorsal lateral del cuello. Como los animales permanecieron sujetos al estereotáxico, éste se refirió a la tierra del polígrafo (ISOGND del panel) y éste se refirió a su vez a una tierra física. Las señales analógicas que se registraron en cada animal se obtuvieron usando 16 amplificadores Grass 7P511K, los cuales contenían un filtro fijo de 60Hz. El filtro pasa bajos se colocó en 3Hz y el pasa altos en 100Hz.

Procedimiento para el mapeo global

Las derivaciones usadas para el registro se dividieron de la siguiente forma: del canal 1 al canal 8 para el hemisferio izquierdo y del canal 9 al canal 16 para el hemisferio derecho; el canal 17 para el núcleo basolateral amigdalino izquierdo y el canal 18 para el núcleo basolateral amigdalino derecho. En los canales 17 y 18, el registro obtenido fue bipolar. Después de un registro basal de diez minutos, se aplicó la Pn; 30 minutos después se aplicaron las encefalinas y una hora después la naloxona.

Las señales analógicas se grabaron en cinta de video usando un demodulador *Vetter Digital*, modelo 3000, para analizar la epileptogénesis. Para el análisis de la propagación epileptiforme interictal, las señales analógicas de los 16 canales se transfirieron a una estación de trabajo HP-9000.

Procedimiento de análisis

Las transferencias de la computadora consistieron en barridos de cuatro segundos de duración con un in-

tervalo de 20 segundos entre cada uno. La adquisición se inició en el registro del control, que duró 10 minutos, y continuó con la respuesta a la administración de la Pn, cuyo registro osciló entre 2-4 horas.

Este procedimiento permitió adquirir todos los componentes de la AEI cortical, desde su inicio hasta la aparición de crisis generalizadas electrográficas.

La salida de las señales analógicas de cada canal (± 2.0 voltios) se conectó a un convertidor de alta velocidad. Una vez muestreadas las 16 señales, el programa RBEAM generó una base de datos en que se guardaron las 16 señales crudas procesadas con un filtro digital para eliminar el ruido residual de 60Hz. Con las señales filtradas se puede observar la señal cruda resultante y su espectro de potencia correspondiente de entre 0 y 32Hz. El programa permite seleccionar frecuencias específicas de la AEI, con lo que restringe el mapeo topográfico en el dominio de frecuencias a bandas. Determinada la banda, se generan mapas correspondientes que se guardan como imágenes.

Se empleó una computadora de uso específico Nicolet modelo 1170, para elaborar histogramas de eventos. Este proceso consistió en un conteo de las espigas con la señal EEG de la amígdala, que en el registro correspondió al canal 17. Este canal se utilizó como *pretrigger*, con un *bin* de 5 segundos; el tiempo de análisis varió entre 125-255 minutos.

Procedimiento para el mapeo restringido de $4\times 4\text{mm}^2$

El registro cortical se obtuvo en cuatro áreas corticales de 16mm^2 , dos áreas por cada hemisferio cerebral. En la figura 6A se ilustra el diseño de la matriz para registro cortical. El registro consistió en la colocación de la matriz en las cuatro posiciones, y cada registro duró 10 minutos en situación control, y 20 minutos en situación experimental después de la Pn. El orden de colocación fue el siguiente: 1. en el área posterior, 2. en la parte anterior del hemisferio izquierdo, 3. en la parte anterior y 4. en la parte posterior del hemisferio derecho. En este procedimiento se utilizó exclusivamente el análisis visual.

RESULTADOS

Verificación de sitios de inyección y registro

El núcleo amigdalino estimulado fue el basolateral y el de registro varió entre el núcleo lateral y el basolateral en ambas preparaciones como se muestra en los cuadros 1 y 2.

Datos de ambos registros

En la situación control, en el registro cortical se observó una actividad lenta en forma de husos en todos los

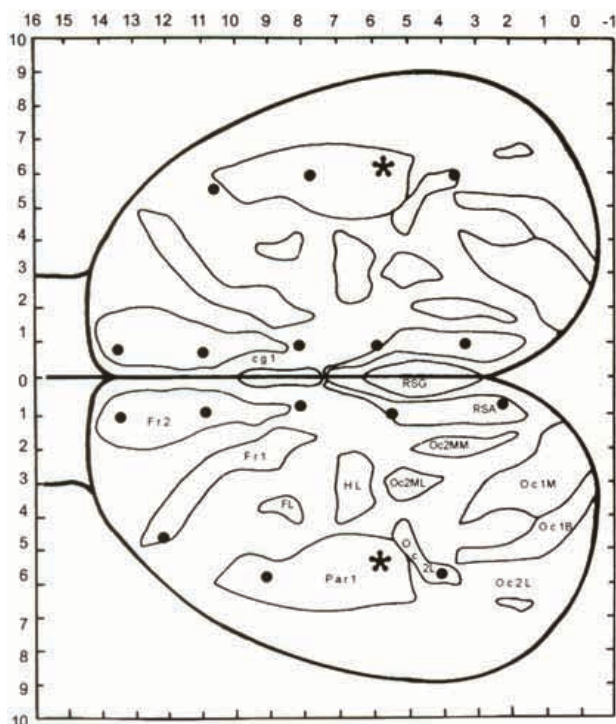


Fig. 1. Se muestra la corteza cerebral y las abreviaciones según el atlas de la ratona de Zilles. Los puntos negros indican la colocación de los electrodos de registro cortical en la matriz isométrica; los asteriscos señalan la entrada de los electrodos hacia las amígdalas

canales debido al uretano (figura 6C). La aplicación de 200 U.I. Pn en los núcleos amigdalinos produjo espigas, cuya aparición fue inmediata, aunada a un aumento de la amplitud, así como de la pronta estabilización (en el orden de la frecuencia) de entre 5-10 minutos (figuras 2 y 6). La AEI se caracterizó por un tren generalizado de alto voltaje repetitivo, el cual tuvo una morfología de espiga onda. La inspección visual del registro muestra que las descargas son simétricas bilaterales, sincrónicas prefrontalmente y asimétricas temporalmente. En general, la espiga de la superficie cortical fue monofásica o bifásica, pero con un componente negativo sobresaliente.

Resultados del mapeo global

El registro del EEG muestra la aparición de la AEI amigdalina y su propagación a la corteza cerebral en diferentes tiempos durante el efecto inducido por la Pn. La [D-Ala²]-metionina y la [D-Ala²]-leucina encefalina produjeron un aumento del EEG basal de la AEI cortical y una inhibición de la AEI amigdalina. A su vez, la naloxona indujo una facilitación en la amplitud y la frecuencia de dicha actividad (figura 2).

Las imágenes de los mapas cerebrales en el dominio del tiempo y de las frecuencias mostraron que la activación cortical por la propagación de la AEI durante la epileptogénesis inducida por la Pn es asimétrica (figuras 3 y 4).

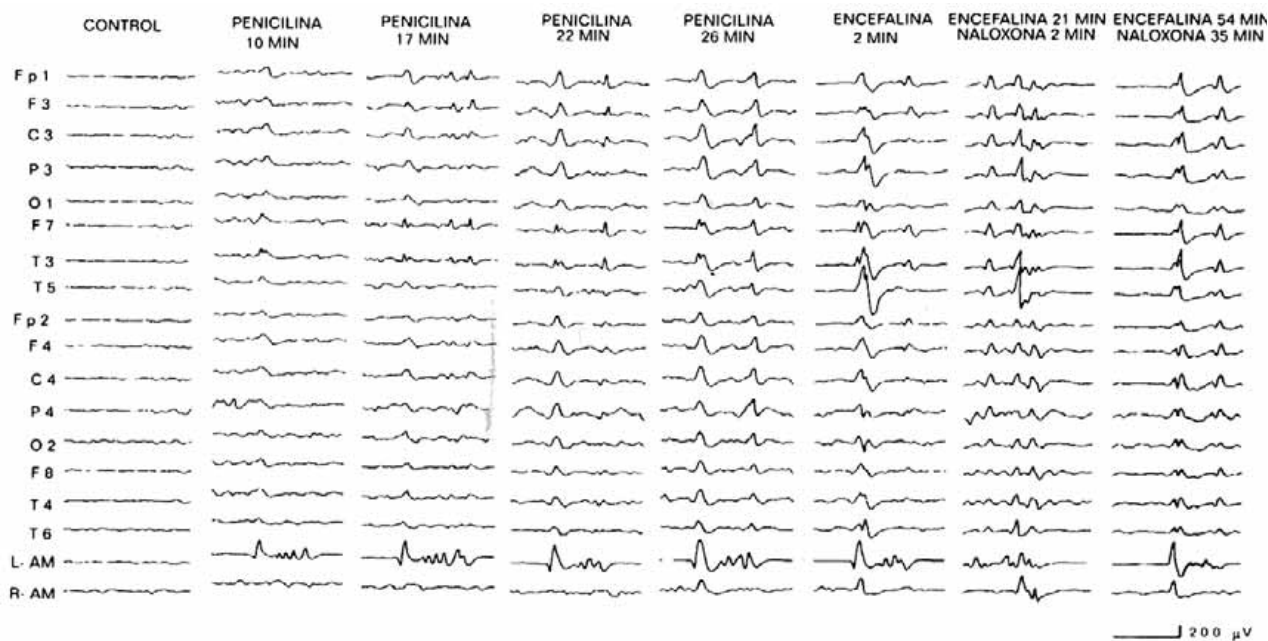


Fig. 2. Se muestra el registro del EEG de los 16 canales corticales y las amígdalas izquierda y derecha durante la situación control y la evolución temporal de la aplicación de 200 unidades internacionales (UI) de Pn intra-amigdalina. El foco muestra una descarga inicial rápida que se estabiliza, y su propagación ipsilateral cortical a los 10 minutos, y la propagación cortical contralateral a los 17 minutos. La amígdala derecha es la última estructura involucrada en la propagación hasta los 26 minutos. La aplicación [D-Ala²]-Metionina aumentó la amplitud pero no indujo aumento en la frecuencia de las espigas. La aplicación de naloxona aumentó la amplitud y la frecuencia de las espigas. Los primeros ocho canales corresponden al hemisferio izquierdo y los otros ocho al hemisferio derecho.

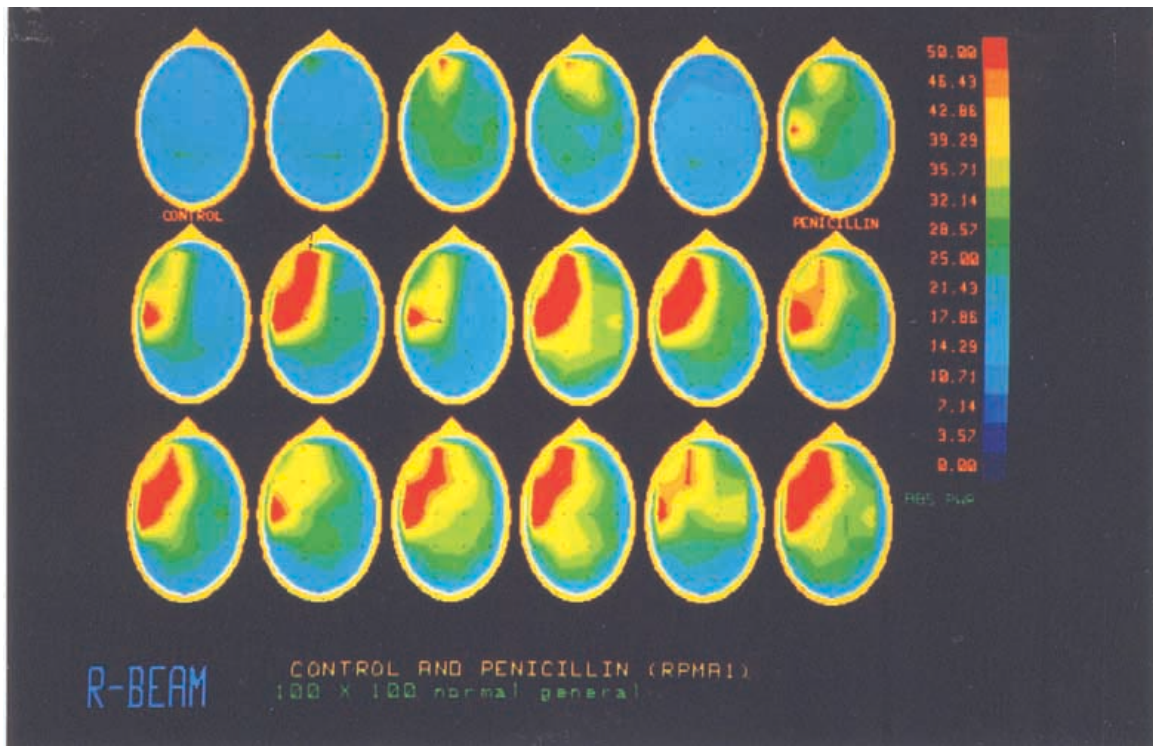


Fig. 3. Se muestran imágenes de mapas en el dominio de la frecuencia en un ancho de banda de 6-8Hz, control y la evolución cortical de la posdescarga amigdalina izquierda, después de la aplicación intra-amigdalina de Pn (200 UI) en el cerebro de rata. La escala en color sobre la derecha representa la potencia absoluta normalizada. Obsérvese la actividad asimétrica de la actividad cortical.

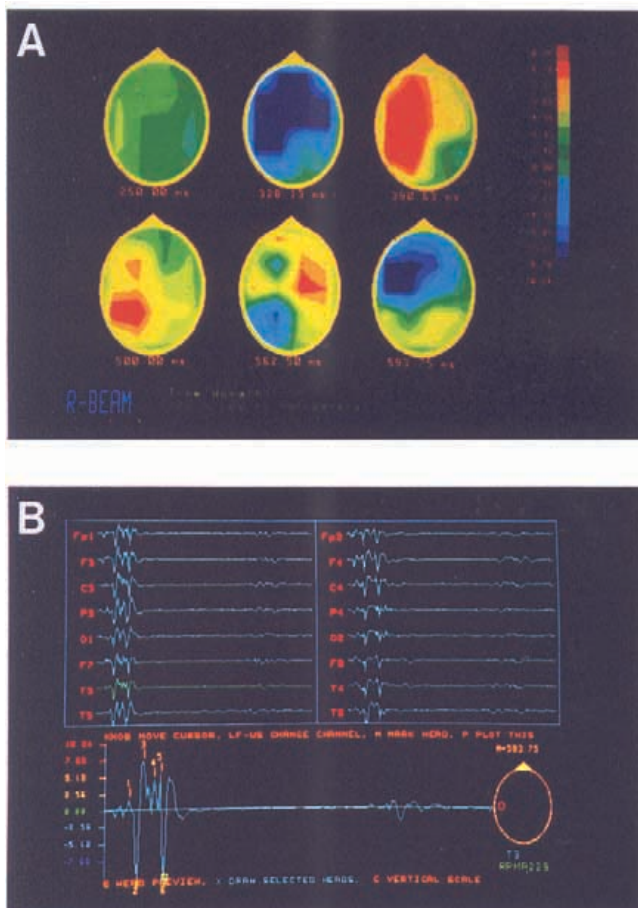


Fig. 4. Imagen en el dominio del tiempo de un ejemplo de cuatro segundos del EEG cortical en que se usa el sistema internacional de registro 10-20 modificado; se muestra la evolución temporal de la propagación cortical. La escala en color sobre la derecha representa la potencia normalizada. B) El trazo amplificado en la parte de abajo corresponde a T3 (en amarillo) y los cursores indican los seis puntos seleccionados de una espiga interictal después de la aplicación de Pn (200 UI) intra-amigdalina y analizados en A. A) Corresponde a mapas en el dominio del tiempo de los puntos seleccionados en B.

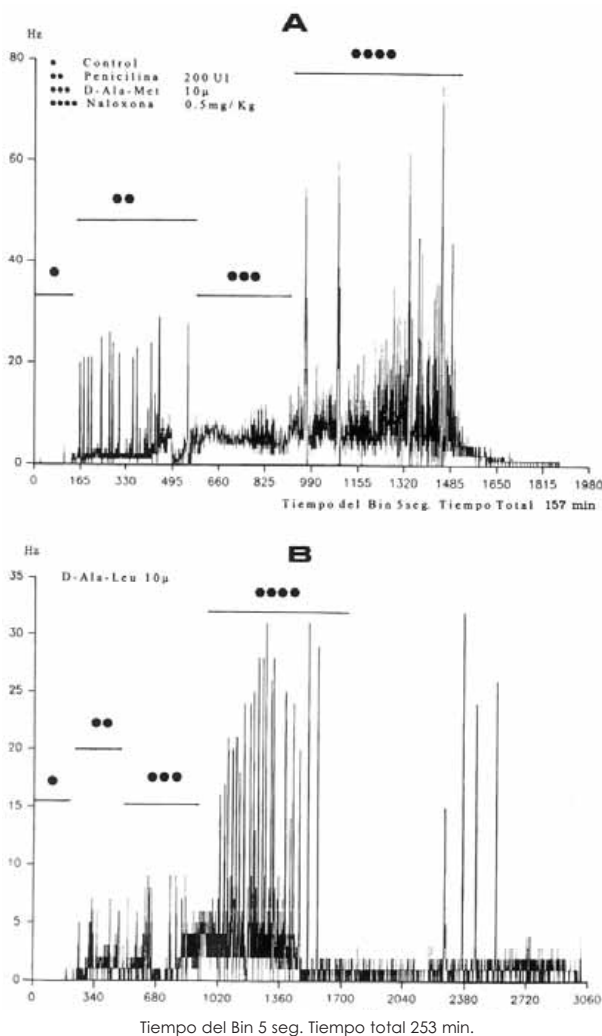


Fig. 5. El gráfico muestra en las ordenadas la frecuencia (Hz) y en la abscisas el tiempo (minutos) y el desarrollo la manipulación experimental en forma de histograma; cada punto negro encima de las líneas indica una manipulación experimental; un punto, la situación control; dos puntos, la aplicación de la Pn en la amígdala del lóbulo temporal; tres puntos, la aplicación de [D-Ala²]-Metionina (A), [D-Ala²]-Leucina (B) encefalinas intra-amígdalina y cuatro puntos de naloxona sistémica.

En el dominio de las frecuencias, el espectro de potencia en el ancho de banda de 6-8Hz muestra los focos corticales secundarios que se presentaron durante el desarrollo del foco amígdalino. El orden de propagación de las espigas hacia la corteza se inicia en la corteza temporal (las espigas se observan con más amplitud en este sitio durante el registro), seguida de las cortezas prefrontal y frontal ipsilaterales. Después aparecen en las cortezas prefrontal y frontal contralateral, y por último en la temporal contralateral (figura 3).

En el dominio del tiempo, las imágenes de mapas en color muestran un dipolo eléctrico que genera una espiga interictal y su distribución temporal. Cada cursor es una imagen e indica el tiempo que transcurre entre

ellos; también muestra la distribución asimétrica de la propagación de la espiga compleja en la corteza (figura 4).

Resultado de los histogramas de eventos

Con cada animal del grupo de mapeo global se realizó un histograma de eventos que ilustra el desarrollo de cada manipulación experimental. El histograma muestra que las encefalinas no produjeron ninguna manifestación focal o generalizada de actividad epiléptica. En contraste, la naloxona indujo una facilitación de la AEI amígdalina (figura 5).

Resultados del mapeo restringido

Los mapeos de áreas restringidas confirmaron la localización frontotemporal ipsilateral de esta propagación. Los datos revelan una activación cortical en "frangas mediales" antero-posteriores de intensidad decreciente hacia las regiones occipitales. El registro del EEG muestra la aparición de la AEI amígdalina y su propagación en la corteza cerebral. La colocación de la matriz en la parte posterior del hemisferio izquierdo presenta la actividad cortical lenta en forma de husos en todos los canales inducida por el uretano, así como el inicio de la AEI inducida por la Pn en el núcleo basolateral amígdalino y su propagación hacia la corteza cerebral (figura 6C).

DISCUSIÓN

En nuestros resultados se observa que la aplicación tópica de la Pn produce actividad interictal inmediata. Debido a que el núcleo basolateral amígdalino posee abundantes células gabaérgicas (27, 38). Asimismo se ha descrito que la Pn es un antagonista del complejo receptor GABA_A-benzodiazepina y en consecuencia la actividad producida por la Pn se considera un proceso de desinhibición (2).

En los mapas del dominio de la frecuencia y del tiempo se muestra la participación temprana de la corteza temporal ipsilateral, seguida de ambas cortezas prefrontales y, por último, de la corteza temporal contralateral. La gran densidad espectral del foco penicilínico cortical refleja una activación de las proyecciones que parten del núcleo basolateral amígdalino hacia la corteza prefrontal, como ha sido demostrado (20) y corroborado por las observaciones clínicas que han encontrado una propagación bihemisférica anterior en las crisis parciales (6).

Nuestros resultados muestran la existencia de focos corticales por la rápida propagación de la actividad epiléptica subcortical. Resultados similares se han encontrado en ratas *WAG/Rij* (un modelo genético de

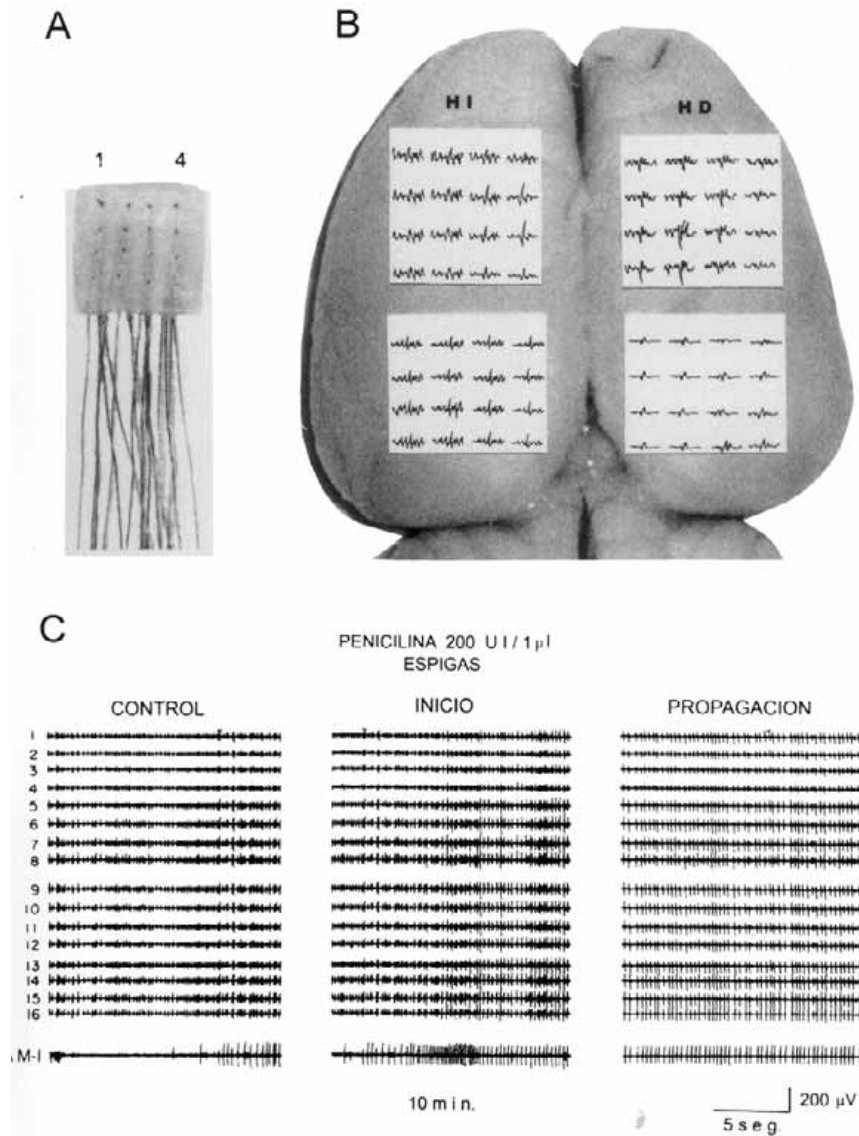


Fig. 6. La figura muestra el diseño de la matriz cuadrada de 4x4mm en A. En B, las posiciones de la matriz cuadrada cubriendo 16 mm² en el cerebro de la rata. La propagación ipsi y contralateral de la actividad epileptiforme interictal cortical inducida en la AM izquierda por 200 UI de Pn. Nótese la propagación con más amplitud en el hemisferio izquierdo (HI) en comparación con el hemisferio derecho (HD). En C, la evolución temporal y su propagación hacia la corteza de la actividad epileptiforme interictal inducida por Pn en la AM izquierda, por la colocación en la parte posterior del HI de la matriz cuadrada.

epilepsia de ausencia) (29) y en el gato con el *kindling* eléctrico amigdalino y con aplicación de Pn en amígdala (12, 14). En humanos, dicha activación se ha encontrado antes de iniciar las crisis de ausencia (19, 26) o bien en la activación de los lóbulos frontales en pacientes con crisis parciales complejas (41).

La aplicación de encefalinas en la amígdala del lóbulo temporal no produjo actividad epiléptica. Resultados similares se obtuvieron al ser aplicadas subcorticalmente en monos (30, 31). Asimismo, en humanos la administración sistémica de opioides no produjo cambios en la actividad epiléptica (28). Por

otro lado, en el núcleo basolateral las encefalinas producen un efecto inhibitorio de la excitabilidad local que se manifiesta en la reducción de la amplitud y frecuencia de la AEI. Este efecto inhibitorio local induce un aumento de la basal del EEG en la amplitud de la AEI cortical propagada hacia la corteza. En experimentos clínicos se observó que la administración de opioides vía i.v. también produce el aumento en la basal del EEG (28). La actividad epiléptica interictal se ha relacionado con la activación de sistemas inhibitorios cerebrales (11, 17). Se ha descrito que el sistema de los opioides endógenos participa en la reducción del esta-

blecimiento de la epileptogénesis, que a su vez se relaciona con un aumento en la liberación de encefalinas inducida por la presencia de agentes convulsivos (3, 8, 36). Este efecto antiepileptico de las encefalinas se atribuye principalmente a su acción en los receptores del tipo delta (40), los cuales se han asociado con el inicio y la propagación de la actividad epiléptica (34). Con la administración de naloxona se observó un aumento progresivo de la duración y la frecuencia de la actividad epileptiforme amigdalina, similar a lo obtenido en otros modelos de epilepsia (16, 32, 35, 37). La facilitación de la AEI observada por la presencia de la naloxona sugiere un bloqueo de la inhibición generada por las encefalinas en los mecanismos de reclutamiento en las áreas que participan en la sincronización cortical.

CONCLUSIÓN

La microinyección de Pn en el núcleo basolateral amigdalino es un modelo de espigas interictales, de paroxismos y de crisis generalizadas, reproducible en la rata.

La propagación de la actividad epileptiforme de la amígdala se manifiesta en la corteza prefrontal antes que en la amígdala contralateral.

Las encefalinas producen un doble efecto: Un aumento de la basal del EEG en las áreas corticales temporales que participan en los mecanismos de propagación, y una inhibición de los mecanismos de instalación en la epilepsia.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo en la realización de este proyecto a: INPRFM (SSA) 3220, CONACYT 3389-P y 31771-N y DGAPA-UNAM IN-204102. La asistencia técnica de Alfredo Martínez, Alejandro Rubio y Bernardo Contreras. A Raúl Cardoso y José Luis Calderón por las ilustraciones. A Marcela Sánchez por la revisión del inglés.

REFERENCIAS

1. ALARCON G, GARCIA SJJ, BINNIE CD, MARTIN MMC, JULER J y cols.: Origin and propagation of interictal discharges in the acute. *Brain*, 120:2259-2282, 1997.
2. ANTONIADIS A, MÜLLER WE, WOLLERT U: Inhibition of GABA and benzodiazepine receptor binding by penicillins. *Neurosci Lett*, 18:309-312, 1980.
3. ASAI M, MARTINEZ A, FERNANDEZ-MAS R, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Penicillin-G induced interictal activity increases both opioid peptide tissue content and release in the rat brain. *Neuropeptides*, 29:163-170, 1995.
4. BARTH DS, DI S: Topographical analysis of epileptiform potentials in rat somatosensory cortex: the interictal to ictal transition. *Brain Res*, 591:33-43, 1992.
5. BENAR CG, AGHAKHANI Y, WANG Y, IZENBERG A, AL-ASMI A y cols.: Quality of EEG in simultaneous EEG-fMRI for epilepsy. *Clin Neurophysiol*, 114:569-580, 2003.
6. BERTASHIUS KM: Propagation of human complex-partial seizures: A correlation analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 78:333-340, 1991.
7. BORBELY AA, TOBLER I, HANAGASIOGLU M: Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behav Brain Res*, 14:171-182, 1984.
8. BREGOLA G, ZUCCHINI S, FRIGATI L, CANDELETTI S y cols.: Involvement of the neuropeptide orphanin FQ/nociceptin in kainate and kindling seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43(Supl. 5):S18-S19, 2002.
9. CAIN DP, CORCORAN M: Intracerebral β -endorphin, met-enkephalin and morphine: kindling of seizures and handling-induced potentiation of epileptiform effects. *Life Sci*, 34:2535-2542, 1984.
10. CORSI-CABRERA M, PEREZ-GARCI E, DEL RIO-PORTILLA Y, UGALDE E, GUEVARA MA: EEG bands during wakefulness, slow-wave, and paradoxical sleep as a result of principal component analysis in the rat. *Sleep*, 24:374-380, 2001.
11. ENGEL JtJ, BLANDER R, GRIFFITH NC, CALDECOTT-HAZARD S: Neurobiology evidence for epilepsy-induced interictal disturbances. *Advances Neurology*, 55:97-109, 1991.
12. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, MARTINEZ A, FERNANDEZ-MAS R: Repeated penicillin-induced amygdala epileptic focus in freely moving cats. EEG, polysomnographic (23 h recording), and brain mapping study. *Epilepsy Res*, 22:127-136, 1995.
13. FERNANDEZ-GUARDIOLA R, FERNANDEZ-MAS R, MARTINEZ A, GUTIERREZ R: Mapeo espacio-temporal del EEG durante el *kindling* amigdalino en el gato. En: Brailowsky S, Otero-Siliceo E (eds). *Epilepsia Experimental*. Academia Mexicana de Neurología 2:139-148, México, 1991.
14. FERNANDEZ-MAS R, MARTINEZ A, GUTIERREZ R, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: EEG frequency and time domain mapping study of cortical projections of temporal lobe amygdala afterdischarge during in the cat. *Epilepsy Res*, 13:23-34, 1992.
15. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, MARTINEZ A, GUTIERREZ R, FERNANDEZ-MAS R: Amygdaline penicillin focus replicates and modulates the electrical amygdaloid kindling in the cat. *Proc West Pharmacol Soc*, 34:219-222, 1991.
16. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, ROCHA L, PELLICER F, GUTIERREZ R, CALVO JM: Massed amygdaloid kindling in encéphale isolé cats: its facilitation by naloxone. *Epilepsy Res*, 4:55-62, 1989.
17. FERRI R, ILICETO G, CARLUCCI V: Topographic EEG mapping of 3/s spike-and-wave complexes during absence seizures. *Ital J Neurol Sci*, 16:541-547, 1995.
18. GODDARD GV, MCINTYRE DC, LEECH CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*, 25:295-330, 1969.
19. GOTMAN J, KHAN YU: Wavelet based automatic detection in intracerebral electroencephalogram. *Clin Neurophysiol*, 114:898-908, 2003.
20. GRANATO A, SANTARELLI M, MINCHIACCHI D: Bihemispheric organization of amygdalo-cortical projections in the rat. *Neurosci Lett*, 127:53-56, 1991.
21. GUZMAN-FLORES C, ALCARAZ M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol Inst Est Méd Biol (Méx)*, 16:29-31, 1958.
22. HILFIKER P, EGLI M: Detection and evolution of rhythmic components in ictal EEG using short segment spectra and discriminant analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 82:255-265, 1992.

23. IADAROLA MJ, FLORES CM, CHANG HYT: Release of met⁵-enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸ immunoreactivity into rat cerebrospinal fluid by electroconvulsive shock. *Biochem Pharmacol*, 80:421-425, 1987.
24. JIANGO C, XUEKONG X: A study on opioid peptides in CSF of patients with epilepsy. *Epilepsy Res*, 6:141-145, 1990.
25. KAMINSKA A, CHIRON C, VILLE D, DELLATOLAS G, HOLLO A y cols.: Ictal SPECT in children with epilepsy: comparison with intracranial EEG and relation to postsurgical outcome. *Brain*, 126:248-260, 2003.
26. LIEB JP, DASHEIFF RM, ENGEL JrJ: Role of the frontal in the propagation of mesial temporal lobe seizures. *Epilepsia*, 32:822-837, 1991.
27. MCDONALD AJ: Immunohistochemical identification of gamma-aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett*, 53:203-207, 1985.
28. MCGUIRE G, EL-BEHEIRY H, MANNINEN P, LOZANO A, WENNERBERG R: Activation of electrocorticographic activity with remifentanyl and alfentanil during neurosurgical excision of epileptogenic focus. *Br J Anaesth*, 91:651-655, 2003.
29. MEEREN HK, PIJN JP, VAN LUIJTELAAR EL, COENEN AM, LOPES da SILVA FH: Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci*, 22:1480-1495, 2002.
30. MELDRUM BS, MENINI C, STUTZMANN JM, NAQUET R: Effects of opiate-like peptides, morphine, and naloxone in the photosensitive baboon, *Papio papio*. *Brain Res*, 170:333-348, 1979.
31. MELDRUM BS, MENINI C, NAQUET R, RICHE D, SILVA-COMTE C: Absence of seizure activity following focal cerebral injection of enkephalins in a primate. *Regul Pept*, 2:383-390, 1981.
32. MIHALY A, BENCSEK K, SOLYMOSI T: Naltrexone potentiates 4-aminopyridine in the rat. *J Neural Transm*, 79:59-67, 1990.
33. PAXINOS G, WATSON C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. Nueva York, 1998.
34. ONDARZA R, TREJO-MARTINEZ D, CORONA-AMEZCUA R, BRIONES M, ROCHA L: Evaluation of opioid peptide and muscarinic receptors in human epileptogenic neocortex: an autoradiography study. *Epilepsia*, 43:(Supl. 5):S230-S234, 2002.
35. ROCHA L, ACKERMANN RF, CHUGANI HT, ENGEL JrJ: Chronic pretreatment naloxone with modifies benzodiazepine receptor binding in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Res*, 17:135-142, 1994.
36. ROCHA L, MAIDMENT NT: Opioid peptide release in the rat hippocampus after kainic acid-induced status epilepticus. *Hippocampus*, 13:472-480, 2003.
37. SCHREIBER R: The effect of naloxone on audiogenic seizures. *Psychopharmacology*, 66:205-206, 1979.
38. SINGH SI, MALHOTRA CL: Amino content of monkey brain. I. General pattern and quantitative value of glutamic acid/glutamine, gamma-aminobutyric acid and aspartic acid. *J Neurochem*, 9:37-42, 1962.
39. SO EL: Integration of EEG, MRI, and SPECT in localizing the seizure focus for epilepsy surgery. *Epilepsia*, 41(Supl. 3):S48-S54, 2000.
40. TORTELLA FC, LONG JB: Characterization of opioid peptide-like anticonvulsant activity in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 456:139-146, 1988.
41. VANT ENT D, MANSHANDEN I, OSSENBLOK P, VELIS DN, DE MUNCK JC y cols.: Spike cluster analysis in neocortical localization related epilepsy yields clinically significant equivalent source localization results in magnetoencephalogram (MEG). *Clin Neurophysiol*, 114:1948-1962, 2003.
42. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M, TALAVERA E, RODRIGUEZ E, LINARES G: Pentylentetrazol kindling produces a long-lasting elevation of IR-met-enkephalin but not IR-leu-enkephalin in rat brain. *Brain Res*, 297:121-125, 1984.
43. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
44. ZILLES K: *The Cortex of the Rat: A Stereotaxic Atlas*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1985.