

Lesiones macroscópicas observadas en núcleos talámicos después de *Status Epilepticus* por *Pilocarpina*

López-Hernandez Estela¹, Gallegos-Santiago Martin², Solís Hugo¹

¹LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, FACULTAD DE MEDICINA; UNAM.

²ESTUDIANTE DEL 3er. año DE MÉDICO CIRUJANO, FACULTAD DE MEDICINA; UNAM.

Artículo original

Correspondencia

Estela López-Hernández. Facultad de Medicina; UNAM. Edificio B, 4o Piso. Laboratorio de Neurofisiología. Coyoacán 04510, Ciudad de México.

E-mail: estelalopez@unam.mx

Recibido	21 marzo-2018
Aceptado	17 abril -2018
Publicado	15 junio-2018

Resumen

Antecedentes: el Status Epilepticus (SE) es un evento agudo y constituye una emergencia neurológica que requiere tratamiento rápido y eficaz con el fin de evitar daño neuronal. Es frecuente que después de un período de SE, hayan alteraciones estructurales y funcionales en redes neuronales que culminan con la aparición de crisis convulsivas espontáneas. Dentro de las estructuras que se afectan está el sistema límbico y en particular la amígdala del lóbulo temporal y el hipocampo. Otra estructura que se afecta después del SE es el tálamo que es considerado modulador de las crisis convulsivas, y está involucrado en la fisiopatología de crisis convulsivas tipo ausencias.

Objetivo: estudiar que los núcleos talámicos están afectados después de inducir SE por la administración de pilocarpina en ratas sometidas a diferentes tiempos de duración del SE.

Material y métodos: valorar los núcleos talámicos con presencia de *focos hemorrágicos* macroscópicos, después de 1, 2, 3 y 4 hs PosSE.

Resultados: los 5 núcleos talámicos que tuvieron *focos hemorrágicos* independientemente del tiempo de duración del SE, fue el posterior, el reticular, el ventrolateral, el ventroposterolateral y el ventroposteromedial. Observamos también que los animales mostraron déficit motor que se correlacionó con la duración del SE, es decir el déficit motor fue mayor en los animales que tuvieron 4 hs de SE.

Discusión y conclusión: Los *focos hemorrágicos* observados pueden corresponder a microsangrados por ruptura de vasos sanguíneos de pequeño calibre, que posiblemente condicionen el déficit motor y diversos cambios en la red neuronal.

Palabras clave: *status epilepticus, pilocarpina, tálamo, microsangrados*

2018 López-Hernandez, et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 International NC, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor original y la fuente.

Original article

Macroscopic lesions observed in thalamic nuclei after Status Epilepticus by pilocarpine

Abstract

Background: the Status Epilepticus (SE) is an acute event and constitutes a neurological emergency that requires rapid and effective treatment in order to avoid neuronal damage. It is common that after a period of SE there are structural and functional alterations in neural networks that culminate with the appearance of spontaneous seizures. Within the structures that are affected is the limbic system and in particular the amygdala of the temporal lobe and the hippocampus. Another structure that is affected after the SE is the thalamus that is considered modulator of seizures, and is involved in the pathophysiology of seizures type absences.

Objective: to study that thalamic nuclei are affected after inducing SE by the administration of pilocarpine in rats subjected to different times of duration of the SE.

Material and methods: Assess the thalamic nuclei with presence of *hemorrhagic foci* macroscopic, after 1, 2, 3 and 4 hs PosSE.

Results: the five thalamic nuclei that had *hemorrhagic foci* regardless of the duration of the SE were the posterior, the reticular, the ventrolateral, the ventroposterolateral and the ventroposteromedial. We also observed that the animals showed motor deficit that was correlated with the duration of the SE, that is to say, the motor deficit was higher in the animals that had more hours of SE.

Discussion and conclusion: the observed *hemorrhagic foci* may correspond to microbleeds due to the rupture of small blood vessels, which possibly condition the motor deficit and several changes in the neural network.

Key words: *status epilepticus, pilocarpine, thalamus, microbleeds*

Introducción

El Status Epilepticus (SE) es con frecuencia una emergencia neurológica asociada con complicaciones agudas que determinan alteraciones tanto funcionales como morfológicas que culminan con la aparición de epilepsia crónica. El proceso de epileptogénesis que inicia con el SE aún no está bien entendido. Es frecuente asociar daño severo de estructuras encefálicas con la aparición del SE y lesiones más severas después del SE. Dentro de estas estructuras están algunos núcleos talámicos y estructuras del sistema límbico.

El tálamo es un importante modulador de las Crisis Convulsivas (CC) y se afecta severamente en los modelos de epilepsia experimental en los que se utilizan agonistas colinérgicos; sin embargo, los circuitos neuronales involucrados en las crisis se han estudiado más en el hipocampo.

Existen diferentes estudios en los que se analizaron las lesiones de distintos núcleos talámicos después de diversos tiempos de SE, provocado por diferentes drogas como: flurothyl, pilocarpina, ácido kaínico o litio-pilocarpina¹⁻⁹.

Estas lesiones se observan y se caracterizan en función de los distintos tiempos que dura el SE, en el momento que se estudia el cerebro después del SE (posSE).

Se han observado en el análisis histológicos de cerebros de ratas con diferentes tiempos posSE (1 a 95 días) con litio-pilocarpina¹⁰ que lo característico de la lesión es que a mayor tiempo posSE la lesión muestra mineralización, es decir presencia de calcio, magnesio y hierro principalmente.

Objetivo

En el presente estudio nos interesó valorar la presencia de lesiones talámicas, en la etapa aguda de ratas a las que se les provocó SE durante 1, 2, 3 y 4 hs. con pilocarpina, y de manera macroscópica se pudo identificar qué núcleos talámicos están más involucrados.

Material y métodos

Se trata de un trabajo experimental descriptivo de ciencia básica en el cual no se incluyen pacientes. En este estudio se utilizaron cincuenta ratas macho de la cepa Wistar, de 46±2 días de edad y peso de 171±10g. El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurofisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Institución, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el manejo de los animales de experimentación. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales usados. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico de manera independiente con libre acceso a comida y agua, en un ambiente confortable en cuanto temperatura y humedad. Los animales se clasificaron en cinco grupos (n = 10): control, 1 hs, 2 hs, 3 hs y 4 hs de duración del SE. Para reducir los efectos periféricos colinérgicos se les aplicó bromuro de atropina (1mg/Kg s.c) (*Sigma-Aldrich*,

St Louis, MO, USA) y treinta minutos después se les inyectó la pilocarpina (350 mg/Kg i.p., *Sigma Aldrich*) para inducir el SE agudo en todos los animales, excepto al grupo control al que sólo se le inyectó solución fisiológica en la misma cantidad de volumen que la pilocarpina, también por vía intraperitoneal.

Las CC se clasificaron de acuerdo con la escala de Racine¹¹. En esta escala se considera el Estadio temprano 1 y 2 asociado con actividad facial y oral (fasciculaciones y masticación). En el estadio 3 hay crisis en estructuras más distales, crisis clónicas en las patas delanteras. En el estadio 4 hay crisis generalizadas, con clonus y rearing (movimiento clónico de las patas delanteras estando en posición erecta) y finalmente el estadio 5 en el cual hay *rearing* y caída grave, crisis tónico-clónicas generalizadas y pérdida del control de la postura. El inicio del SE, se consideró que cuando los animales de experimentación presentaron el estado 5. Para atenuar la severidad del SE; y por ende reducir la mortalidad, se les aplicó diazepam (5 mg/kg) a los 45 min después de haber iniciado el SE. Una vez concluido el tiempo de duración del SE (1, 2, 3 y 4 hs.), a cada uno de los animales se les aplicó una dosis eutánica (60mg/kg) de pentobarbital sódico, y se procedió con la perfusión a través de la aorta, con solución salina (0.9%) seguida de fijador frío (10% formaldehído).

Los cerebros fueron removidos, mantenidos en el mismo fijador, y almacenados a 4°C. Después de 24 h se realizaron cortes coronales de 300µm de espesor con un vibratomo (*Vibroslice 752; Campden Instrument Ltd. Lafayette, USA*). Las rebanadas en las que se observaron lesiones macroscópicas que definimos como *focos hemorrágicos* por su apariencia a simple vista se relacionaron con las correspondientes 10 láminas del atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson¹² y que estuvieron distribuidas según las coordenadas siguientes: -2.16, -2.40, -2.64,

-3.12, -3.24, -3.48, -3.72, -4.20, -4.44 y -4.56 mm con respecto a Bregma. Estas rebanadas se fotografiaron y digitalizaron para realizar el análisis específico con acetatos impresos sobrepuestos en el corte coronal correspondiente. Una vez que se contabilizó el número de veces que cada estructura mostró *foco hemorrágico* se elaboró el histograma de distribución de frecuencias respectivo, de acuerdo con el tiempo de duración del SE.

Para valorar el déficit motor que presentaron los animales se utilizó la escala de Berderson¹³ modificada, la cual señala que: El estado normal corresponde al grado 0 en el cual el animal está sin ningún tipo de déficit motor. El estado moderado o grado 1 pertenece a los animales que presentan una extremidad posterior hiperextendida, flácida y sin movimiento y el estado severo o grado 2 incluye a los animales que tienen ambas extremidades posteriores hiperextendidas, flácidas y sin movimiento.

Resultados

Todos los animales presentaron el estadio 5 de Racine a los 42 ± 18 min después de la inyección de la pilocarpina. Los cortes coronales de los cerebros de las ratas control no mostraron *focos hemorrágicos* o lesiones macroscópicas evidentes (figura 1B).

Los de las ratas de 1 hs de duración de SE (1hs-SE) tuvieron *focos hemorrágicos* en los núcleos talámicos Posterior (Po), Reticular (Rt), Ventrolateral (VL), Ventroposterolateral (VPL) y Ventroposteromedial (VPM) en el hemisferio cerebral derecho, izquierdo o en ambos (figura 1C). En los cortes de 2 hs (figura 1D), 3 hs (figura 1E) y 4 hs-SE (figura 1F) se observaron *focos hemorrágicos* en los núcleos Po, Rt, VL, VPL, VPM, y también en los núcleos Dorsal Lateral Geniculado (DLG), en el Latero-Dorsal parte Ventrolateral (LDVL) y en la radiación superior talámica (str) unilateral (derecho o izquierdo) o bilateral.

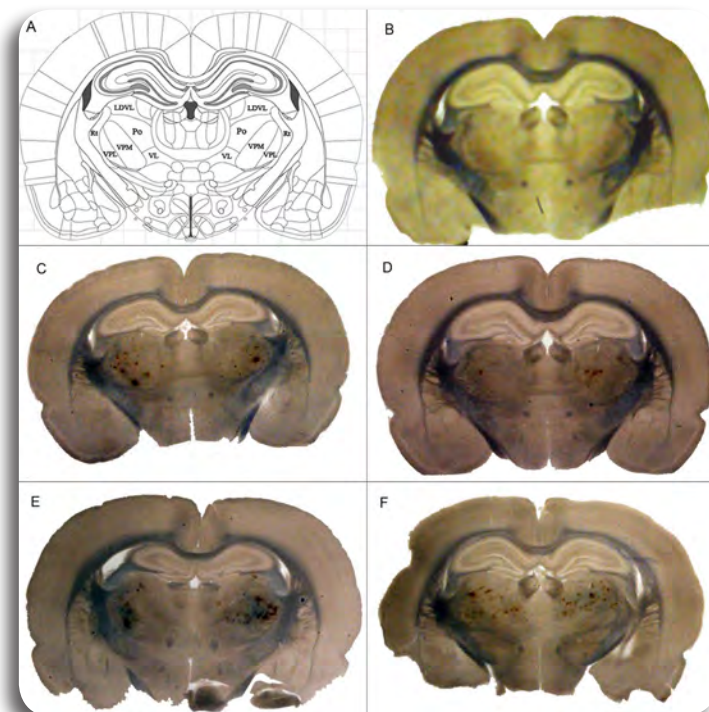


Figura 1. En A se muestra, como ejemplo, el esquema correspondiente al nivel de Bregma -3.12 mm del atlas estereotáxico de Paxinos, et al.¹² que se utilizó para identificar las estructuras talámicas con focos hemorrágicos. Se presentan también cortes coronales del cerebro B: control y representativos con focos hemorrágicos que se observaron a diferentes tiempos de SE. C: 1hs-SE, D: 2hs-SE, E: 3 hs-SE, F: 4 hs-SE. Abreviaturas: (A): VPM = núcleo talámico ventroposteromedial, VPL = núcleo talámico ventroposterolateral, Po = núcleo talámico posterior, VL = núcleo talámico ventrolateral, Rt = núcleo reticular, y LDVL = núcleo laterodorsal parte ventrolateral. Los cortes del cerebro fueron de 300μ de grosor.

La frecuencia de distribución de las diferentes estructuras, en función del tiempo de duración del SE (1, 2, 3 y 4 hs), con *focos hemorrágicos* se ilustra en la *figura 2*.

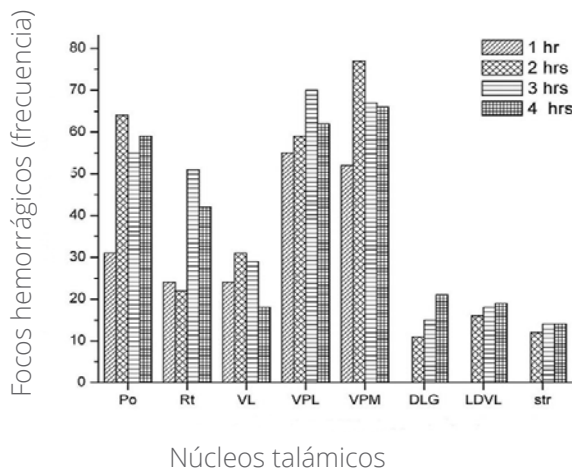


Figura 2. Ilustra las estructuras talámicas que con mayor frecuencia mostraron *focos hemorrágicos* con relación a los diferentes tiempos de SE (1, 2, 3, 4 hs-SE) VPM = núcleo talámico ventroposteromedial, VPL = núcleo talámico ventroposterolateral, Po = núcleo talámico posterior, Rt = núcleo talámico reticular. VL = núcleo talámico ventrolateral. Otros núcleos talámicos en donde se observaron focos hemorrágicos menos frecuentes fueron: DLG = núcleo geniculado dorso lateral, LDVL = núcleo talámico laterodorsal parte ventrolateral y el str = radiación talámica superior. El inserto indica los diferentes tiempos de duración del SE.

El 42.5% de los animales presentó déficit motor, de acuerdo con la escala de Berderson modificada, con latencia promedio de 82.8 ± 63.8 min de iniciado el SE. Observamos que 2 de las ratas de 1h-SE tuvieron déficit motor grado 1. Los animales de 2 hs-SE con déficit motor fueron 4, 3 de los cuales con grado 1 y uno con grado 2. Los de 3 hs-SE con déficit motor fueron 5 animales, 3 con grado 1 y 2 con grado 2. Mientras que los de 4 hs-SE fueron 6 animales, 5 con grado 1 y 1 con grado 2. El déficit motor involucró a más animales mientras mayor fue el tiempo de duración del SE.

Discusión

Los principales hallazgos de nuestro estudio son: 1. cinco principales núcleos talámicos (Po, Rt, VL, VPL y VPM) mostraron *focos hemorrágicos*, independientemente del tiempo de duración del SE y 2. presencia de déficit motor de las extremidades posteriores en el 42.5% de las ratas con SE. Respecto a los núcleos talámicos con *focos hemorrágicos*, podemos decir que este es el primer estudio que reporta estas lesiones en etapas agudas del SE en estructuras talámicas específicas. Sloviter¹⁴ en un estudio publicado en el 2005 reportó hemorragias aparentes en hipocampo, tálamo y cortezas temporales, a los 3 días después, mientras realizaron los cortes coronales de cerebros de ratas sometidas a SE por la administración sistémica de ácido kaínico o pilocarpina.

Regnier, et al., 2010¹⁵, 72 hs después de inyectar directamente carbacol en el núcleo VPL y formación reticular talámica, observaron macroscópicamente edema y microhemorragias dispersas a lo largo del eje amigdalocortical en sentido rostrocaudal. Otros estudios reportan lesiones focales hemorrágicas microscópicas, como el de Biagini, et al.,¹⁶ quienes estudiaron, después de una semana, la influencia de la lesión vascular en la afectación de las conexiones de la corteza entorrinal y el área CA3 en ratas con diferentes tiempos de duración de SE por pilocarpina. Con azul de toluidina observaron lesión focal hemorrágica localizada en el centro del estrato lacunoso molecular de CA3 con presencia de eritrocitos extravasados perivasculares, y en el área de CA3 donde hubo mayor pérdida neuronal también notaron ramas vasculares dilatadas rodeando el área de la microhemorragia. Fuera de la zona del hipocampo, reportaron que las microhemorragias siempre estuvieron presentes en el hipotálamo, en el tálamo y a veces en el septum y en el estriado. Asimismo, en el estudio realizado por Lucchi, et al.,¹⁷ se establece que los mecanismos de isquemia-hipoxia secundarios al SE guían la disfunción del hipocampo.

Con Imágenes de Resonancia Magnética mostraron disminución del flujo sanguíneo en las láminas profundas (V y VI) de la corteza somatosensorial después de 2 hs. de SE-pilocarpina, y los trayectos vasculares revelaron disminución en el diámetro de los vasos sanguíneos. Este dato también lo reporta Fabene, et al.¹⁸, Lucchi, et al.¹⁷, refirieron que dichos cambios vasculares y del flujo sanguíneo se acompañaron de necrosis neuronal extensa, como se ha observado después de isquemia.

Con la tinción de Nissl advirtieron que los vasos sanguíneos estaban anormalmente dilatados después del SE, y al parecer estaban rodeados por eritrocitos extravasados y microhemorragias, sugiriendo claramente pérdida en la integridad de la pared de los vasos sanguíneos.

Respecto al déficit motor que presentaron los animales con SE, en este estudio, consideramos una posible relación con las alteraciones microvasculares que se observan en los estudios antes mencionados, ya que en otra serie de experimentos que hemos realizado en donde damos diferentes tiempos (días) de recuperación posSE a los animales, hemos observado que se recuperan de dicho déficit motor entre 24 y 48 hs. después del SE. Por lo tanto, consideramos que los *focos hemorrágicos* que estamos reportando corresponden a microsangrados cerebrales (MSCs), los cuales se han definido como minúsculas colecciones de productos sanguíneos (hemosiderina, deoxihemoglobina y ferritina) que se liberan cuando un vaso sanguíneo, de pequeño calibre se rompe.

Frecuentemente se asocian con hemorragia cerebral, infartos lacunares, lesiones cerebrales de la sustancia blanca, arteriopatía hipertensiva y con angiopatía amiloide cerebral, lo que sugiere que se presentan como manifestación de patología hipertensiva que afecta a vasos sanguíneos de pequeño calibre¹⁹.

Los MSCs también han sido reportados en enfermos con SE refractario quienes desarrollaron múltiples MSCs nuevos y en quienes la neuromonitorización multimodal reveló incremento de la relación lactato-piruvato, disminución en la presión parcial de oxígeno en el tejido cerebral, aumento en el índice de reactividad de la presión cerebral, fluctuaciones en la presión sanguínea y en la presión de perfusión cerebral²⁰. Todos estos factores repercuten en la hemodinamia cerebral y por consiguiente en la excitabilidad neuronal.

Conclusión

El SE es una alteración neurológica severa que afecta de manera global al tejido cerebral. Repercuten tanto en la estructura y función de los diferentes tipos neuronales, así como en la hemodinamia, bioquímica y metabolismo del sistema nervioso central. A partir de los primeros 19 min de SE, los animales de experimentación, la circulación cerebral se altera considerablemente y que afecta al parénquima cerebral en diversas formas, y conforme pasa el tiempo la alteración es más severa.

Con esta información nuestros futuros estudios tendrán como objetivo la valoración histológica de los microsangrados, así como el análisis electrofisiológico de los núcleos talámicos en los que principalmente observamos *focos hemorrágicos* y su correlación con el patrón tanto electroencefalográfico como conductual de las crisis espontáneas que presentan los animales de experimentación.

Financiamiento

Interno por parte del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Referencias

1. Nevander G, Ingvar M, Auer R, Siesjo BK. Status Epilepticus in Well-Oxygenated Rats Causes Neuronal Necrosis. *Ann Neurol* 1985; 18(3):281-90.
2. Turski L, Cavalheiro EA, Sieklucka-Dziuba M, Ikonomidou-Turski C, Czuczwar SJ, Turski WA. Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. *Brain Res* 1986; 19,398(1):37-48.
3. Persinger MA, Makarec K, Bradley JC. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav* 1988; 44(1):27-37.
4. Handforth A, Treiman DM. Functional mapping of the late stages of status epilepticus in the lithium-pilocarpine model in rat: a ¹⁴C-2-deoxyglucose study. *Neuroscience* 1995; 64(4):1075-89.
5. Fujikawa DG. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1996; 24,725(1):11-22.
6. Covolan L, Mello LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 2000; 39(2):133-52.
7. Gayoso MJ, Al-Majdalawi A, Garrosa M, Calvo B, Díaz-Flores L. Selective calcification of rat brain lesions caused by systemic administration of kainic acid. *Histol Histopathol* 2003; 18(3):855-69.
8. Lehto LJ, Sierra A, Corum CA, Zhang J, Idiyatullin D, Pitkänen A, et al. Detection of calcifications in vivo and ex vivo after brain injury in rat using SWIFT. *Neuroimage* 2012; 16,61(4):761-72.
9. Aggarwal M, Li X, Gröhn O, Sierra A. Nuclei-specific deposits of iron and calcium in the rat thalamus after status epilepticus revealed with quantitative susceptibility mapping (QSM). *J Magn Reson Imaging* 2018;47(2):554-64.
10. Lafreniere GF, Peredery O, Persinger MA. Progressive accumulation of large aggregates of calcium-containing polysaccharides and basophilic debris within specific thalamic nuclei after lithium/pilocarpine-induced seizures. *Brain Res Bull* 1992; 28(5):825-30.
11. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32(3):269-79.
12. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Elsevier Inc 6ª Ed. 2007.
13. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17(3):472-6.
14. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol* 2005; 328(2):143-53.
15. Régnier A, Vicaut E, Mraovitch S. Aggravation of seizure-associated microvascular injuries by ibuprofen may involve multiple pathways. *Epilepsia* 2010; 51(12):2412-22.
16. Biagini G, Baldelli E, Longo D, Contri MB, Guerrini U, Sironi L, et al., Proepileptic influence of a focal vascular lesion affecting entorhinal cortex-CA3 connections after status epilepticus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(7):687-701.
17. Lucchi C, Vinet J, Meletti S, Biagini G. Ischemic-hypoxic mechanisms leading to hippocampal dysfunction as a consequence of status epilepticus. *Epilepsy Behav* 2015; 49:47-54.
18. Fabene PF, Merigo F, Galiè M, Benati D, Bernardi P, Farace P, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms. *PLoS One* 2007; 31;2(10).
19. Charidimou A, Werring DJ. Cerebral microbleeds and cognition in cerebrovascular disease: an update. *J Neurol Sci* 2012; 15;322(1-2):50-5.
20. Jeon SB, Parikh G, Choi HA, Lee K, Lee JH, Schmidt JM, et al. Acute cerebral microbleeds in refractory status epilepticus. *Epilepsia* 2013;54(5).

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias