

EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIIO VAGO SOBRE LA EPILEPSIA FOCAL AMIGDALINA EN LA RATA

Adrián Martínez^{1,2}, Edith López-Ruiz¹, Germán Vega-Flores¹, Rodrigo Fernández-Mas¹,
Augusto Fernández-Guardiola^{1,3}

SUMMARY

Antecedents

Vagus nerve electric stimulation (VNS) is an anticonvulsant therapy used in patients with refractory epilepsy. Several methods are used to find VNS's action mechanisms. These techniques employ experimental models of epilepsy, such as topic applications into cerebral cortex or injections of convulsive substances by different systemic ways, both in chronic and acute experiments. However, only a few studies have related the VNS and the epilepsy of the temporal lobe.

When limbic seizures are produced in the amygdaloid complex, it is known that all their own sub-nuclei activate. However, during the spread or propagation of epileptiform activity, all nuclei and sites related with amygdala's complex participate are involved. There are many reports about the relationship between development and spread topics. However, it remains unclear the effect of VNS and its relation with interictal spike's frequency, seizure epileptic behavioral stages on Racine's scale, and the number of crisis in an induced epileptic focus into temporal lobe amygdala.

Aim of the study

The propose is to study how the VNS affects the development and spread of the epileptiform spike in the penicillin focus and behavioral stages induced by a topical administration of penicillin in the temporal lobe of the amygdala. Additionally we will observe the changes induced by VNS on theta rhythm.

Material and methods

Male Wistar rats were used. Rats were implanted with a guide cannula glued to a bipolar electrode in the amygdala of the temporal lobe; an electrode to the dorsal hippocampus; two epidural nails in the prefrontal cortex (for cortical record); two flexible wires in the lateral part of the neck muscles for electromyogram record, and one hook-form electrode in the left vagus nerve corresponding exactly to the larynx's level. At the end of the post-surgery recovery period (five days), the animals were divided in two groups (n=5). After one hour of recording, group I animals were administrated penicillin G sodic (Pn) in the amygdala (solution with 50 international units in 1 microliter as final volume,

using a saline solution of 0.9% sodium chloride as vehicle). After one hour of the penicillin injection, the vagus nerve electrical stimulation was performed (1.2 to 3.0 mA, square pulses of 0.5 ms duration, and 30 Hz frequency) during 30 seconds with intervals of 15 minutes between each stimulation only during two hours of recording (eight VNS's in total). The same manipulation was followed with group II, except that in this case the first VNS was performed just before the penicillin injection. Cerebral electric activity was recorded and saved for post off-line frequency analysis, during a six-hour period in both groups.

Results

We compared electrographic parameters provoked by a single Pn injection vs Pn + VNS on each group of animals and considering each rat as its own control.

Vagus nerve stimulation effects on the latency and duration of the epileptiform spikes

Group I showed a 40% decrease on its latency, and a 15% duration increase when compared with its own controls. Group II showed a 37% increase on latency and a 40% decrease on duration.

Vagus nerve stimulation effects over seizure stage and seizure number.

Group I developed stages III and IV on Racine's scale and higher number of seizures. Group II remained on seizure stages I and II presenting a smaller number of seizure compared to its own control records.

Vagus nerve stimulation effects on frequency of spikes

Group I showed a significant increase in frequency ($p < 0.05$), which was sustained during a long recording time. In contrast, Group II showed a decrease.

Spectral analyses of cerebral electric activity

The electroencephalogram is a tool used to investigate how the vagus nerve stimulation affects the epileptic phenomenon. In this case, the spectral analysis of the electric activity of amygdala and cerebral cortex showed a high activity between 1 and 4 Hz. This high voltage prevailed after penicillin injection and during all recording time. Hippocampus showed theta rhythm periods. The VNS caused cortical desynchronization, but it was not associated with hippocampal theta rhythm elicitation.

There is a possibility that VNS induced an increased susceptibility

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

²ENEP Aragón UNAM.

³Facultad de Psicología UNAM.

Correspondencia: Adrián Martínez Cervantes, Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370. México, DF. Correo electrónico: adrianmc@imp.edu.mx

Recibido primera versión: 22 de octubre de 2002. Segunda versión: 22 de septiembre de 2003. Tercera versión: 12 de febrero de 2004. Aceptado: 6 de mayo de 2004.

on rats to the convulsive effects of Pn. This was manifested in significantly shorter latencies to seizures, and significantly higher incidence, and duration of seizure.

Conclusion

When performed before the Pn injection, the vagus nerve stimulation increased the latency to the appearance of spikes, as well as the frequency, but the number of seizures decreased instead. Even, only early stages, such as I and II of Racine's scale, were seen. These data suggest that VNS softened epileptic synchronization. The frequency of the spikes, the development of stages IV and V, and also the number of seizures were delayed.

The VNS performed one hour after penicillin injection produced progressive epileptiform spike spread and changes in the behavioral seizure pattern. Frequency of spikes increased as well as seizures severity (stage III and IV). The vagus nerve stimulation did not only reduce epileptiform activity, but also induced neuronal recruiting, which is manifested as an enhancement in seizure expression.

The VNS elicited dual effects related with tissue-sensibility. This effect confirms anatomic and physiological relations among vagal afferents, amygdaloid complex and cerebral cortex due to thalamic pathways and its relations with vagus nerve, amygdaloid complex and pyramidal cells. As a matter of fact, the thalamus is the most important structure related with cerebral rhythms. For this reason we hypothesized that the thalamus plays a key role in the results showed here.

Key words: Vagus nerve, penicillin, epilepsy, EEG, spectral analysis.

RESUMEN

Antecedentes

La estimulación del nervio vago (ENV) es una terapia anticonvulsiva que se usa en la epilepsia resistente al tratamiento farmacológico. Para encontrar el mecanismo de acción del efecto anticonvulsivo, se emplean diversos modelos experimentales. La epilepsia se induce en preparaciones agudas mediante la aplicación sistémica de un convulsivante, tópicamente en la corteza cerebral o en preparaciones crónicas mediante la estimulación eléctrica de la amígdala del lóbulo temporal. Pocos estudios han empleado la ENV en preparaciones crónicas con el modelo de epilepsia del lóbulo temporal.

Por otro lado, en las crisis límbicas iniciadas en la amígdala participan los núcleos del complejo amigdalino, y en su propagación intervienen las áreas que tienen relaciones neuronales con éste. Esto influye en su desarrollo así como en la inhibición, por ejemplo, del ritmo theta hipocampal. Sin embargo, aún no se describe el efecto de la estimulación eléctrica del nervio vago sobre la frecuencia de las espigas, los estadios conductuales, el número de crisis y el ritmo theta hipocampal de un foco epileptico inducido por penicilina en la amígdala del lóbulo temporal.

Objetivo

Estudiar el efecto de la estimulación del nervio vago sobre el inicio, la propagación, los estadios conductuales y la inducción o reducción experimental del ritmo theta hipocampal en la epilepsia focal amigdalina.

Material y métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar*, que fueron implantadas con una cánula guía unida a un electrodo en la amígdala del lóbulo temporal, un electrodo al hipocampo dorsal, dos clavos

epidurales en la corteza prefrontal, un electrodo flexible en los músculos laterales de la nuca y un electrodo en el nervio vago izquierdo a la altura de la laringe. Al término del periodo de recuperación postoperatoria (cinco días), los animales se dividieron en dos grupos de cinco. En el Grupo I se tomó un registro control de una hora e inmediatamente después se microinyectó penicilina G sódica (Pn) en la amígdala (50 unidades internacionales [UI] en 1 µl de solución salina). Una hora después de la aplicación de la Pn se inició la estimulación eléctrica del nervio vago (1.2-3.0 mA, pulsos de 0.5 ms y 30 Hz) durante 30 segundos, con intervalos de 15 minutos durante dos horas. En el Grupo II se realizó el mismo procedimiento, excepto que este grupo recibió la primera ENV antes de aplicar la penicilina. En ambos grupos, los mismos animales funcionaron como sus propios controles, se registró la actividad eléctrica cerebral y las señales eléctricas se registraron en una PC durante seis horas en ambos grupos.

Resultados

Efecto de la ENV sobre la latencia y la duración de las espigas. En el Grupo I, en la latencia en segundos se observó una disminución de 40% y un aumento de 15% en la duración en minutos. En el Grupo II, en la latencia se observó un aumento de 37% y una disminución de 40% en la duración.

Efecto de la ENV sobre el estadio y el número de crisis. El Grupo I desarrolló los estadios III y IV de la escala de Racine y presentó más crisis. El Grupo II se mantuvo en los estadios I y II del desarrollo de la epilepsia, según la escala de Racine, y presentó menos crisis.

Efecto de la ENV sobre la frecuencia de las espigas. En el Grupo I se observó un aumento significativo y sostenido de ($P < 0.05$) en la frecuencia, durante el tiempo de registro. En el Grupo II se observó una disminución significativa de ($P < 0.05$) en la frecuencia.

Análisis espectral de la actividad eléctrica cerebral. El electroencefalograma es una herramienta para investigar la influencia de la ENV. El análisis espectral de la actividad eléctrica cerebral mostró en la amígdala y la corteza prefrontal una actividad eléctrica cerebral de alto voltaje con una frecuencia de entre 1-4 Hz, que predominó después de la inyección de Pn y durante todo el tiempo de registro. En el hipocampo se observó un aumento del ritmo theta hipocampal por la presencia de las espigas interictales. La ENV produjo una desincronización cortical que no se asoció con la inducción de la actividad theta hipocampal.

En contraste con la ENV antes de la Pn (Grupo II), la ENV después de la Pn (Grupo I) indujo una respuesta facilitadora acompañada de actividad rítmica de alto voltaje en el electroencefalograma.

Conclusión

Antes de aplicar la Pn, se observó que la ENV producía un incremento en la latencia de aparición de las espigas en la amígdala, además de una reducción en la frecuencia de las espigas, una disminución del número de crisis e incluso la aparición exclusiva de los estadios tempranos I y II con respecto a la Pn sola. Estos resultados sugieren que la ENV amortiguó la sincronización epileptiforme, disminuyendo la frecuencia de las espigas, que más tarde se manifestó en el desarrollo de los estadios conductuales IV y V, así como un aumento del número de crisis.

Una hora después de la aplicación de la Pn, la ENV tuvo un efecto proconvulsivo que se manifestó en un aumento de la frecuencia de las espigas y una inducción de estadios III y IV. La ENV no sólo es capaz de reducir la actividad epileptiforme, sino de inducir además un reclutamiento neuronal, que se manifiesta como una acción proconvulsiva en la expresión de las crisis.

La ENV ejerce un efecto dependiendo de la excitabilidad del tejido. Este efecto corrobora la relación anatómica y fisiológica que existe entre las aferentes vagales, la amígdala del lóbulo temporal y la corteza cerebral dada por la sensibilización observada inicialmente en la amígdala y por la propagación que induce la aplicación tópica de la Pn como convulsivante.

Por último, el efecto desincronizante inducido por la ENV sobre la actividad cortical alcanzó al ritmo theta hipocampal debido a que se observó una ligera disminución.

Palabras clave: Nervio vago, penicilina, epilepsia, EEG, análisis espectral.

ANTECEDENTES

La estimulación eléctrica del nervio vago (ENV) es una terapia anticonvulsiva que actualmente se utiliza en pacientes con epilepsia resistente al tratamiento farmacológico (14). Para encontrar el mecanismo por el cual se ejerce este efecto anticonvulsivo, se emplean diversos modelos experimentales en que se ha visto que la estimulación repetida del nervio vago disminuye la frecuencia de las espigas interictales e interrumpe o previene las crisis generalizadas en modelos experimentales inducidas por estricnina (44), crema de alúmina (21), electrochoque (43) y penicilina o pentilenetetrazol (24). También se ha reportado que la transición de crisis parciales a generalizadas, en el *kindling* eléctrico amigdalino (11), se retrasa al aplicar la ENV en el gato (8). Estos estudios sugieren que la ENV ejerce su efecto de manera indirecta, debido a que las aferentes del nervio vago no inervan la corteza cerebral, pero sí hacen blanco en varias estructuras cerebrales relacionadas directa o indirectamente con la corteza cerebral. Estas aferentes llegan al núcleo parabraquial (23) que proyecta a la amígdala (30) y al tálamo (34); al núcleo del tracto solitario, que también proyecta a la amígdala, y a la formación reticular, entre otras. Estas estructuras, que se relacionan de una u otra forma con el sistema límbico y el tálamo, modulan la actividad que induce la ENV, con lo que se producen una desincronización cortical y una inhibición de la generalización de las crisis límbicas (5, 12, 15, 22, 33, 42).

Durante el inicio y la propagación de la actividad paroxística, evocada por un foco epiléptico en la amígdala del lóbulo temporal, intervienen estructuras relacionadas directamente con el complejo amigdalino, como la corteza prefrontal (6), la formación reticular (4, 15), el tálamo (26, 35) y el hipocampo (2, 45). A su vez, hay estructuras que participan en la inhibición de la génesis; por ejemplo, el núcleo del tracto solitario (22) y el giro dentado del hipocampo (25).

Por otra parte, se ha observado que la actividad ictal e interictal se facilita o inhibe durante la sincronización

o desincronización cortical propia de las etapas del ciclo sueño-vigilia, respectivamente (17). Asimismo, se ha mostrado una menor ocurrencia de crisis epilépticas en la vigilia o en el sueño de movimientos oculares rápidos, estados en los cuales se presenta el ritmo theta hipocampal (36), que se atribuye a un efecto anticonvulsivo (18, 19, 27). También se ha analizado la actividad ictal e interictal respecto a la integración temporal de las variaciones de frecuencia y los cambios de amplitud en el área cortical mediante el análisis de la transformada rápida de Fourier, así como la evolución de patrones rítmicos difíciles de detectar por la simple inspección visual (6, 7). Este análisis describe los espectros de potencia en forma de imágenes en color generados por un programa computacional específico, diseñado en el laboratorio (9).

En trabajos anteriores hemos descrito las características y ventajas de un foco penicilínico en la amígdala del lóbulo temporal en preparaciones crónicas en rata y gato (1, 6, 7). Desde que lo propuso Gloor en 1978, éste se caracterizó como un modelo de epilepsia parcial secundariamente generalizada, cuya característica son las espigas ictales e interictales que inducen la actividad epileptiforme, recurrente y autosostenida (10). Desde entonces se han definido manifestaciones conductuales dosis-dependiente compatibles con la escala de Racine (31) y mecanismos de propagación (1, 3, 7, 10, 24). También se sabe que la dosis de penicilina varía según la vía de administración, así como la latencia de inicio de espigas y la aparición de crisis convulsivas generalizadas.

Con el propósito de investigar una posible relación temporal, en el presente trabajo se estudiará el efecto de la ENV en dos momentos temporales del episodio epiléptico provocado por un foco penicilínico en la amígdala del lóbulo temporal: 1. Se estudiarán el efecto de la ENV en el proceso de instalación/propagación de la actividad eléctrica epileptiforme y 2. el efecto de la ENV en un episodio epiléptico ya desarrollado y propagado. Para ello se analizarán la latencia de aparición, duración y frecuencia de las espigas epileptiformes, la conducta por la presencia o ausencia de estadios conductuales, el número de crisis y el aumento o disminución del ritmo theta del hipocampo.

MATERIAL Y MÉTODO

Los experimentos se realizaron según las especificaciones emitidas por el comité ético del Instituto Nacional de Psiquiatría para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso de 250-350 gr, anestesiadas con ketamina (20 mg/kg) y xilacina (0.2 mg/kg)

intramusculares, para implantarles, siguiendo coordenadas estereotáxicas (28), un electrodo bipolar de alambre de acero inoxidable (calibre 0.38 mm) y aislado eléctricamente (90-120 K Ω , de 8 mm de largo), unido a una cánula guía de 0.21 mm de diámetro en el núcleo central de la amígdala del lóbulo temporal izquierdo y un electrodo con similares características en el hipocampo dorsal derecho. Se implantaron además un electrodo monopolar epidural en forma de clavo de acero (4 mm de largo y calibre 5 mm) en ambas cortezas prefrontales, un electrodo bipolar de alambre de acero inoxidable (calibre 0.38 mm) en los músculos laterales de la nuca (electromiograma) y un electrodo bipolar en forma de horquilla, hecho con el alambre antes mencionado, en el nervio vago izquierdo a la altura de la laringe.

Posteriormente, los animales se colocaron en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum*. Al término del periodo de recuperación postoperatorio de cinco días, se registró la actividad eléctrica cerebral de todos los animales en situaciones diferentes: 1. registro sin manipulación alguna; sólo se registró durante seis horas. Esta situación tenía la función de habituarlos a las condiciones de registro con el fin de reducir los efectos del estrés y observar valores normales en su ciclo sueño-vigilia; 2. registros con aplicación de penicilina sola; estos registros nos indicaban la correcta respuesta del animal a la dosis administrada. Si la respuesta a la aplicación de la penicilina era nula, el animal se excluía del experimento; 3. registros con penicilina y ENV; estos datos se comparan contra la aplicación de penicilina sola para evaluar el efecto de la ENV. Mediante la observación del ciclo sueño-vigilia de las ratas, se controló que la aplicación de la penicilina siempre se realizará en vigilia.

En todos los animales, la cánula guía sirvió para liberar 50 UI de penicilina G sódica en 1.0 μ l de solución salina al 0.9%, PH 7.0, por medio de una microjeringa Hamilton. El procedimiento para determinar el umbral eléctrico de la ENV consistió en la aplicación, cada cinco minutos, de trenes de pulsos cuadrados con los siguientes parámetros: 30 Hz, pulsos de 0.5 ms de duración cada uno y 20 segundos de duración para cada tren. Durante la búsqueda del umbral se fue aumentando gradualmente la intensidad 0.2 mA hasta observar conductas vegetativas, como deglución, movimientos de vibras, guiños, acicalamiento, masticación y/o contracción abdominal. Una vez establecido este umbral, se aplicaban los trenes durante 30 segundos, con intervalos de 15 minutos durante dos horas (ocho estimulaciones en total). La intensidad total varió en un margen de 1.0-3.0 mA. Los estímulos se aplicaron siempre durante la fase de vigilia.

Descripción de los grupos

Se dividieron dos grupos de cinco animales cada uno (Grupo I y Grupo II).

Los registros de penicilina sola fueron realizados en idénticas circunstancias en el Grupo I y Grupo II, ya que cada animal funcionó como su propio control. Los registros de penicilina+ENV del Grupo I se realizaron de la siguiente manera: Se tomó un registro basal de una hora. Justo al término de éste, se les microinyectó a cada animal la penicilina en la amígdala. Una hora después, cuando el animal ya presentaba conductas y actividad eléctrica cerebral de tipo epiléptico, se inició la ENV.

Los registros de ENV+penicilina del Grupo II también al completarse la primer hora de registro, se inició con la ENV e inmediatamente terminado el primer estímulo se aplicó la microinyección de penicilina en la amígdala (misma dosis que el Grupo I); de tal manera que el Grupo II recibía la primera de las ocho ENV's antes de presentar cualquier conducta de tipo epiléptico, las subsecuentes siete ENV's se aplicaron a intervalos de 15 minutos. La primer hora de registro cumplía funciones de adaptación (en ambos grupos). El registro del electromiograma se utilizó para determinar la fase de la vigilia en ciclo sueño-vigilia y estimular en la misma fase a los animales.

Las señales analógicas obtenidas durante los registros fueron amplificadas usando preamplificadores de EEG idénticos (Grass 7P511K) con un filtro pasa bajos colocado en 1 Hz y un filtro pasa altas cortando a 100 Hz. Se usó un filtro "T" analógico para quitar el ruido residual de los 60 Hz de la línea. La actividad eléctrica cerebral se registró y se guardó digitalmente en el disco duro de una PC para un análisis posterior, más detallado y ya fuera de línea. Posteriormente, se realizó un análisis espectral tridimensional que permite ver la evolución temporal de la actividad bioeléctrica en el dominio de la frecuencia. En nuestro sistema de adquisición, los canales amplificados se conectaron a un convertidor analógico digital de 12 bits, con un filtro de *overlap* espectral *antialiasing* en cada entrada analógica. El rango de la muestra se seleccionó de acuerdo con el criterio de Nyquist. La duración de cada barrido fue de cuatro segundos con intervalos de 20 segundos entre cada barrido.

Los estadios conductuales se determinaron según el criterio de Racine (31): estadio I, movimientos faciales y de la boca; estadio II, movimientos verticales de la cabeza; estadio III, mioclonias de los miembros anteriores; estadio IV, postura de sentado con extensión del cuerpo en posición vertical; y estadio V, crisis convulsiva tónico clónica generalizada.

Al término del experimento, a todos los animales se les aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico; se

perfundieron vía intracardiaca utilizando una solución salina al 0.9% y formaldehído al 10% para fijar el cerebro posteriormente, se extrajeron los cerebros para obtener rebanadas de 60 micras por medio de un criostato y verificar los sitios de inyección y registro por medio del procedimiento rápido (13).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron las pruebas no paramétricas *U Mann-Whitney* de rangos para grupos independientes y la prueba de *Wilcoxon* para grupos relacionados, ambas con un nivel de significancia de $p < 0.05$. En las gráficas de la figura 2 se muestran la mediana y el error estándar.

Los datos presentados resultan del análisis comparativo en las dos condiciones de un mismo grupo del registro de la actividad eléctrica cerebral; la aplicación de penicilina sola se considera como la situación "control", para contrastar la situación experimental penicilina+ENV y ENV+penicilina, y así poder evaluar el efecto de la ENV en la latencia de aparición y frecuencia de las espigas, el estadio y el número de crisis.

RESULTADOS

La aplicación de penicilina se localizó en el núcleo central de la amígdala (cuadro 1). Con este resultado nos aseguramos de que la ENV tuviera un efecto sobre la actividad interictal epileptiforme, debido a las proyecciones entre el núcleo central de la amígdala y el núcleo del tracto solitario (principal blanco de las aferentes vagales). El electrodo de hipocampo se localizó en la parte dorsal (cuadro 1), en donde evaluamos los cambios inducidos sobre el ritmo theta.

En los dos grupos se obtuvo un total de 58 registros de la actividad eléctrica cerebral en situaciones diferentes, habituación, penicilina sola, penicilina+ENV y ENV+penicilina. En el Grupo I se obtuvieron cinco habituaciones: ocho con penicilina sola y diez con penicilina+ENV. En el Grupo II se obtuvieron ocho habituaciones, trece con penicilina sola y catorce con ENV+penicilina. Un resumen de la manipulación experimental se muestra en el cuadro 2, donde se observa lo anteriormente descrito.

Los registros de la actividad eléctrica cerebral mostraron las siguientes características: Inducción de la actividad interictal epileptiforme por la aplicación de penicilina en la amígdala del lóbulo temporal y su propagación hacia la corteza prefrontal y en el hipocampo la actividad theta y una irregular propagación de la actividad interictal epileptiforme (figura 1). Con la estimulación eléctrica del nervio vago, se observó una

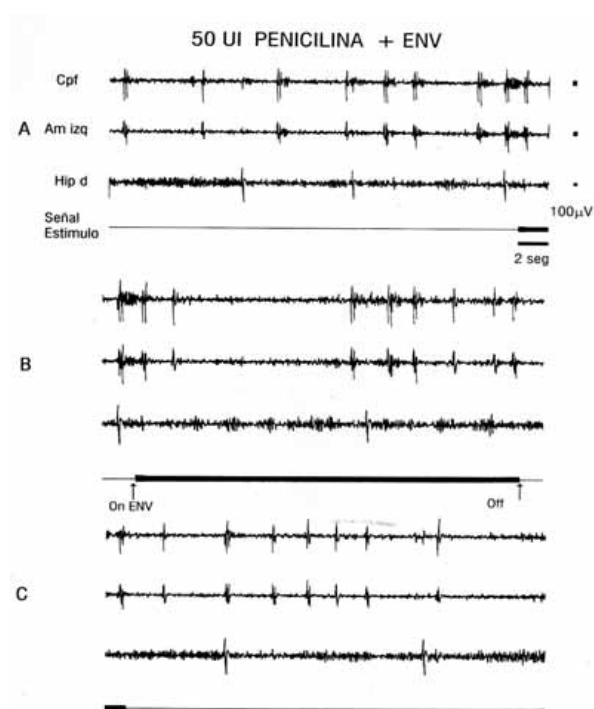
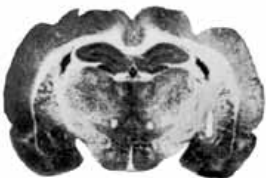
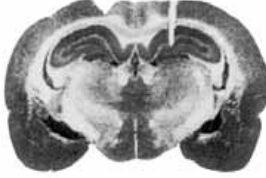


Fig. 1. Se muestra el registro de la actividad eléctrica cerebral de un animal del Grupo 2 en los 60 segundos previos a la ENV (A), durante (B) e inmediatamente después de ésta (C). Nótese el decremento en la frecuencia de las espigas durante la ENV y la disminución de la amplitud después de la ENV. Abreviaciones: Corteza prefrontal (Cpf); amígdala del lóbulo temporal izquierdo (Am izq); hipocampo derecho (Hip d).

disminución o un aumento de las espigas en la amígdala y la corteza prefrontal, así como una disminución del ritmo theta en el hipocampo dorsal. El desarrollo del foco penicilínico amigdalino en la situación control no se describe en este trabajo, ya que se ha abordado en trabajos anteriores (1, 7).

Efecto de la ENV sobre la latencia y la duración de las espigas
La latencia de aparición de las espigas se considera como el tiempo que transcurre entre el final de la microinyección de penicilina y la presencia de espigas en la actividad eléctrica cerebral de la amígdala. La duración de las espigas es el tiempo total en que se registra la actividad sincrónica autosostenida y de alto voltaje en el electroencefalograma. En el Grupo I ($n=5$) se observó una disminución en la latencia de aparición de las espigas de 40%, de 132 ± 42.2 a 78 ± 33.1 segundos, mientras que su duración aumentó aproximadamente 15%, de 133 ± 35.9 a 155 ± 27 minutos. En el Grupo II ($n=5$) se observó un aumento en la latencia de las espigas de 37%, de 132 ± 22.3 a 180 ± 62.5 segundos, y una disminución en la duración de éstas de 40%, de 176 ± 32.7 a 106 ± 48.1 segundos. Resultados obtenidos al comparar los datos de penicilina sola contra penicilina y la ENV, tomando a cada rata como su propio control

CUADRO 1. Sitio de inyección y registro

	Amígdala				Hipocampo			
								
Rata Núm								
10	B 2.5	L 4.5	V 7.5	CeC	B 3.8	L 2.0	V 2.5	hf
11	B 2.5	L 4.5	V 7.5	CeC	B 4.6	L 2.0	V 2.8	hf
12	B 3.1	L 4.3	V 7.5	CeL	B 4.5	L 2.0	V 3.4	DG
13	B 2.8	L 4.2	V 7.5	CeM	B 3.8	L 1.8	V 3.0	CA1
14	B 2.8	L 4.4	V 7.4	CeM	B 3.6	L 2.0	V 3.2	CA1
15	B 2.6	L 4.6	V 8.0	CeC	B 4.8	L 1.2	V 3.2	dhc
21	B 2.8	L 4.5	V 8.0	CeC	B 3.6	L 2.2	V 3.0	hf
22	B 2.8	L 5.0	V 7.5	CeC	B 4.5	L 2.0	V 2.5	CA1
23	B 3.3	L 4.0	V 7.5	CeC	B 4.2	L 2.0	V 3.5	hf
27	B 2.8	L 4.0	V 7.5	CeM	B 4.1	L 1.8	V 3.0	CA1

Muestra las coordenadas de los sitios de inyección en los núcleos de la amígdala del lóbulo temporal y las áreas de registro en el hipocampo dorsal. Se muestran dos cortes coronales del cerebro de la rata para indicar la trayectoria de la cánula y del electrodo.

CUADRO 2. Muestra la manipulación experimental por animal y grupo

Identificación del animal y número de registros							
Grupo 1				Grupo 2			
No. rata	Hab	Pn sola	Pn+ENV	No. rata	Hab	Pn sola	ENV+Pn
10	1	2	3	15	2	3	3
11	1	2	2	21	1	2	3
12	1	2	2	22	1	3	3
13	1	1	1	23	1	3	3
14	1	1	2	27	3	2	2

Muestra la manipulación experimental por grupo y por animal. La columna hab indica la habituación a la caja de registro y la manipulación. La columna Pn indica la aplicación de penicilina sola en ambos Grupos. En el Grupo 1 la columna Pn+ENV indica primero la penicilina y después la estimulación del nervio vago. En el Grupo 2 la columna ENV+Pn indica primero la estimulación del nervio vago y después la penicilina. Las abreviaturas indican penicilina G sódica (Pn), estimulación del nervio vago (ENV).

(figura 2). En otras palabras, cuando la ENV se aplicó antes de la penicilina, las espigas tardaron más tiempo en presentarse, a diferencia de cuando se aplicó una hora después de la penicilina en los animales que mostraban una clara conducta epiléptica.

En el modelo penicilínico, la duración de las espigas es un indicador que varía según la vía de administración y la dosis empleada. En las aplicaciones corticales son necesarias dosis altas (más de 5,000 UI) y la aplicación por vía sistémica precisa dosis aún mayores. La aplicación tópica, como es el caso del presente trabajo, requiere dosis bajas (50 UI) para provocar un efecto duradero que se extiende por más de 180 minutos. Los resultados indican que la duración de las espigas fue más corta cuando la ENV se aplicó previamente a la penicilina (Grupo II), esto es, en un sistema aún sin afectar por la actividad epiléptica.

Efecto de la ENV sobre los estadios conductuales y número de crisis

En este modelo, los estadios de las crisis epilépticas son dosis-dependiente. Con dosis de 50 UI se presenta una actividad epileptiforme interictal duradera (más de tres horas) y pocas crisis convulsivas, con escasas variaciones de sujeto a sujeto. Los estadios I, II y III en la escala de Racine (31) se consideran como crisis focales, en tanto que los estadios IV y V indican una actividad convulsiva generalizada. El Grupo I presentó un desarrollo de estadios tardíos de las crisis (III-IV) y tuvo más crisis focales: 47 ± 13.1 vs. 62 ± 23.5 . El Grupo II presentó un desarrollo de estadios más tempranos (I-II) de las crisis y tuvo menos crisis focales: 23 ± 3.5 vs. 17 ± 4.0 , al compararlos con sus propios controles (figura 3). El mayor número de crisis totales se presentó cuando la ENV se aplicó una hora después de la penicilina (Grupo

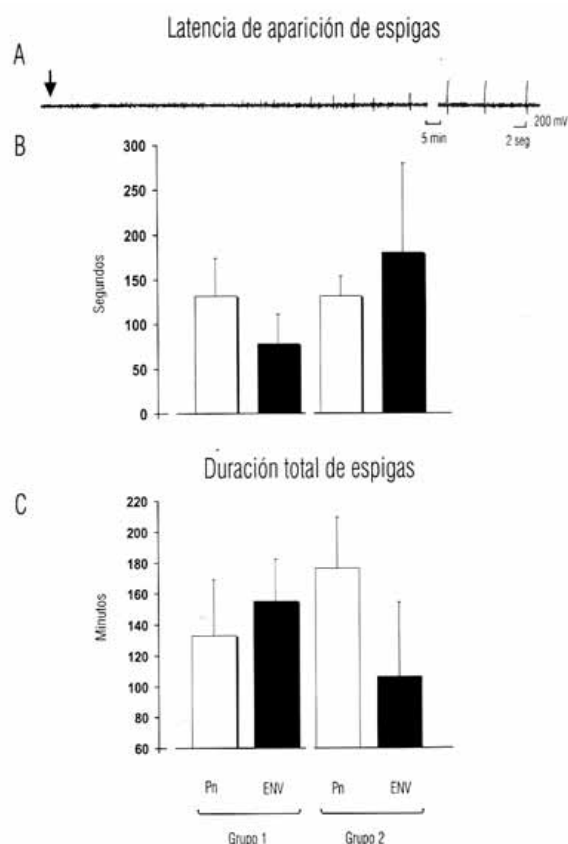


Fig. 2. En A se presenta el registro de la actividad eléctrica de la amígdala izquierda para ejemplificar la latencia entre la microinyección de penicilina (señalado con una flecha) y la aparición de espigas. En B se muestra por medio de la mediana, el aumento de la latencia en la aparición de espigas en amígdala en el Grupo 2 cuando se aplicaba la ENV previa a la inyección de Pn. En C se representa la disminución del tiempo que duraron las espigas a lo largo del tiempo de registro en el Grupo 2 al compararlo con su propio control. En las gráficas B y C las barras blancas indican la situación control (Pn sola) y las barras oscuras la situación experimental (ENV+Pn). Abreviaturas penicilina (Pn), estimulación del nervio vago (ENV).

I). Pero, cuando la ENV se aplicó antes de la microinyección (Grupo II), los animales desarrollaron menos crisis y un estadio más bajo.

Efecto de la ENV sobre la frecuencia (Hz) de las espigas

Una de las características de la actividad epileptiforme en la actividad eléctrica cerebral es la espiga y su frecuencia se asocia con los estadios de la epileptogénesis. El Grupo I mantuvo una frecuencia elevada durante la ENV con respecto a su control, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y que se sostuvo durante la mayor parte del tiempo de registro. En el Grupo II tuvo una frecuencia total significativamente más baja que sus propios controles (figura 4). En resumen, la frecuencia de la espiga epileptiforme disminuyó cuando la ENV se aplicó antes de microinyectar penicilina.

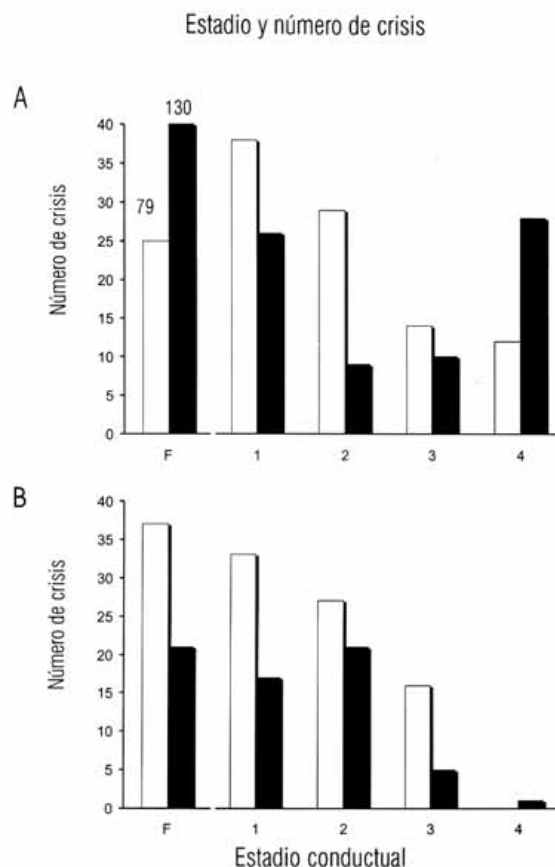


Fig. 3. Se muestra en ambos grupos por medio de la frecuencia acumulada (A, Grupo 1; B, Grupo 2), el efecto por ENV previa a la microinyección de penicilina (barras oscuras) sobre el número de crisis y estadio desarrollado, en comparación a sus propios registros de penicilina sola (barras claras). Nótese el decremento en el desarrollo de estadios tardíos en el caso del Grupo 2 (B). F, Crisis focales; números del 1 al 4, estadio conductual desarrollado durante la crisis.

Análisis espectral de la actividad eléctrica

Por medio del método descrito, en el cual se aplica la transformada rápida de Fourier a la actividad eléctrica cerebral (9), en las imágenes se muestra un evento continuo de la actividad eléctrica producida por una área cerebral, con lo que su función se observa en dos planos de forma espacio-temporal. La siguiente interpretación del análisis espectral de la actividad eléctrica de la amígdala del lóbulo temporal (figura 5) y del hipocampo dorsal (figura 6) de una rata del Grupo II: a) el eje X corresponde a la frecuencia 0-32 Hz; b) el eje Y representa el tiempo continuo del experimento, y el color indica la potencia absoluta (voltaje) en cada frecuencia. Las imágenes muestran una frecuencia de entre 2-4 Hz de la actividad eléctrica cerebral principalmente en amígdala, lo que predominó después de la inyección de penicilina en el control y disminuyó cuando se aplicó la ENV, lo cual es representado por el eje Y en la amígdala e hipocampo. En el hipocampo

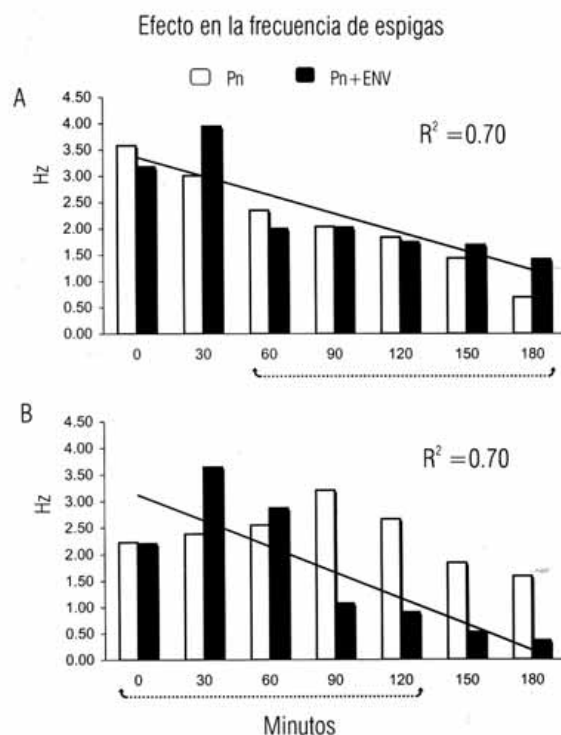


Fig. 4. Muestra la disminución de frecuencia de las espigas por la ENV mediante la frecuencia acumuladas en dos situaciones; penicilina sola (barras blancas) y ENV con penicilina (barras oscuras), en ambas gráficas se presenta la línea de tendencia para las barras oscuras. Se señala el lapso de tiempo de las ENV's por medio de una línea punteada. Nótese la diferencia de la frecuencia entre los dos grupos. A, Grupo 1; B, Grupo 2.

se observaron un aumento de la frecuencia de entre 4-8 Hz, que corresponde al ritmo theta por la presencia de la penicilina en la amígdala, y una disminución por la ENV+penicilina, Grupo II, y la penicilina+ENV, Grupo I. Las figuras 5 y 6 muestran un ejemplo de un análisis del Grupo II.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos por la ENV aplicada antes de la inyección de penicilina mostraron disminuciones en el número de crisis y de espigas. En cuanto a la disminución en el número de crisis, se ha obtenido en otros estudios en ratas (37) y en humanos (16), asociado a una disminución en la frecuencia de las espigas. Los resultados sugieren una posible amortiguación de la sincronización epileptiforme que más tarde se hubiera manifestado en un mayor número de crisis y en un desarrollo de crisis parciales, generalizadas secundariamente. Esta amortiguación de la sincronización epileptiforme indicaría que la desincronización inducida por la ENV viajaría por las aferentes vagales hacia las áreas subcorticales que inducen la sincronización

Análisis espectral de la actividad eléctrica de la amígdala

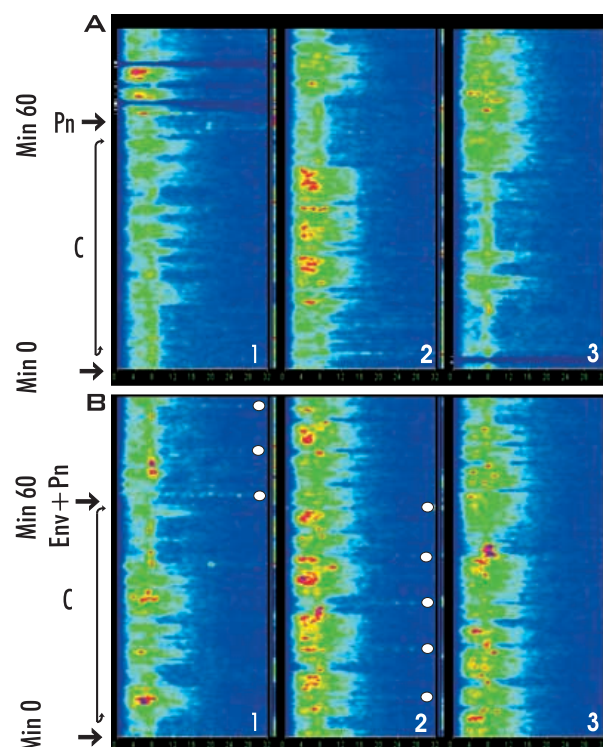


Fig. 5. Se muestra el espectro de potencia de la actividad eléctrica de la amígdala en un animal del Grupo 2 en situaciones experimentales diferentes, ilustradas en A y B. Ambas indican, la frecuencia de 0-32 Hz en el eje "X", el tiempo continuo del experimento en el eje "Y" cada plano representa 88 minutos y el voltaje de la actividad eléctrica cerebral en color, la lectura inicia de abajo hacia arriba empezando en uno y terminando en tres, 60 minutos de habituación (C) previos a la manipulación experimental. En A el efecto de la penicilina (Pn) sola, la fecha junto la Pn indican el momento en que ésta se aplicó. En B la fecha junto la Env+Pn indica el momento de la estimulación del nervio vago y al terminar la estimulación se aplicó la Pn; además se indica en el lado derecho de los planos el momento de inicio y término de la aplicación de las ENV's. Nótese la aparición de la banda de 1-4 Hz (espigas) cuando se aplica la penicilina.

cerebral y que inhibirían la propagación de la actividad epileptiforme amigdalina, las cuales favorecerían la desincronización cortical, principalmente prefrontal y frontotorrolándica, con lo que provocarían la inhibición respectiva de la actividad interictal e ictal. Diversas evidencias anatómicas apoyan esta hipótesis ya que se han descrito dos vías de comunicación del complejo amigdalino hacia la corteza. La primera es la proyección del núcleo basolateral amigdalino hacia el núcleo medio dorsal del tálamo, el cual proyecta las áreas mediales prefrontales (35); la segunda vía que está compuesta por las proyecciones monosinápticas directas de la amígdala hacia la corteza frontal (20). Asimismo, existe una vía de las aferentes vagales hacia la amígdala vía el núcleo del tracto solitario (32, 38).

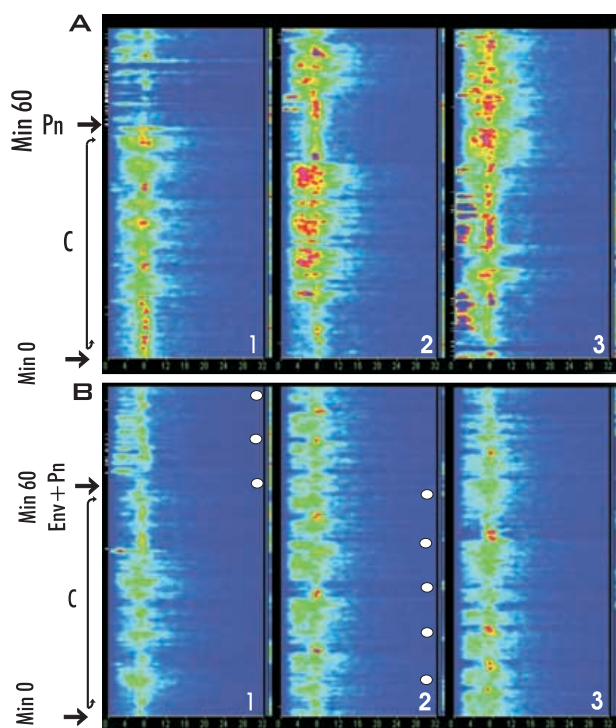


Fig. 6. La descripción es igual a la figura 5. Mostrando el espectro de potencia de actividad eléctrica del hipocampo. Nótese el aumento de la banda de 4-8 Hz (ritmo theta) cuando se aplica la penicilina y su disminución cuando se aplica la ENV.

Los resultados obtenidos por la ENV aplicada una hora después de la inyección de penicilina mostraron una mayor duración en la presencia de las espigas y más crisis, con lo que la ENV surte un efecto facilitador sobre la actividad paroxística. En otras palabras, la ENV no sólo es capaz de reducir la actividad epileptiforme, sino además de inducir un reclutamiento neuronal. Esto último sugiere que, una vez que se establece el foco epileptico amigdalino y se propaga hacia otras áreas del encéfalo, la ENV induce un reclutamiento neuronal en las áreas que se consideran como marcapasos de la actividad cortical (tálamo 36, 40), y que ya no depende del foco amigdalino sino de las áreas que generan la sincronización cortical. Evidencias anatómicas muestran que las lesiones talámicas reducen las espigas y el enfriamiento bilateral de los pedúnculos inferiores talámicos eliminan las espigas en el modelo de epilepsia generalizada inducida por penicilina en el gato (27).

En estudios previos con estimulación del nervio vago se ha reportado la inducción de la sincronización cortical (39). En el presente trabajo se confirman estos resultados, ya que este efecto se ejercería probablemente por la activación de sus aferencias en el núcleo del tracto solitario, que de ahí parten hacia el tálamo para activar, entre otros, el núcleo reticular, y facilitar la sincronización

previa provocada por el desarrollo y la propagación del foco amigdalino penicilínico. La sincronización es provocada por dos vías distintas, la Pn como epileptogénico y la ENV, encuentran en el tálamo un efecto diferencial entre dos eventos que pretenden modificar la ritmicidad cerebral normal asociada al grado de excitabilidad cortical.

El incremento en la latencia de las espigas que propicia la ENV sugiere la activación del sistema GABAérgico debido a que, al transcurrir los días de la ENV, se desencadenan efectos neuronales que dan como resultado el aumento de los receptores benzodiacepínicos en la amígdala, los cuales provocarían a su vez un retardo en la acción antagonista GABAérgica de la Pn. En estudios recientes se ha observado también que la aplicación intra-amigdalina de Pn induce una disminución de los niveles de unión de estos receptores (3).

Otro resultado que se observó fue la aparición del ritmo theta hipocampal en respuesta a la propagación de la actividad epileptiforme interictal amigdalina, lo que comprobó el efecto anticonvulsivo del ritmo theta hipocampal descrito anteriormente (27). Antes y después de aplicar la penicilina, con la ENV se observó una disminución en el ritmo theta, la no evocación de este ritmo plantea un mecanismo inhibitorio diferente. Dadas las conexiones anatómicas existentes entre el tallo cerebral y el hipocampo (41), más el papel que cumple el hipocampo en los mecanismos de propagación de la actividad de naturaleza epileptica (45), podemos inferir la no activación de los mecanismos de la inducción del ritmo theta hipocampal originados en el tallo cerebral, por la estimulación de las aferentes vagales.

Nuestros resultados apoyan el concepto de que las aferentes vagales regulan las interacciones entre las áreas del tallo cerebral y la corteza en la expresión de las crisis límbicas. La ENV ejerce un efecto dependiendo de la excitabilidad del tejido. Este efecto corrobora la relación anatómica y fisiológica entre las aferentes vagales, la amígdala del lóbulo temporal y la corteza cerebral, dada por la sensibilización observada inicialmente en la amígdala y su propagación inducida por la aplicación tópica del convulsivante. Nuestros resultados muestran también los diferentes rasgos característicos de la actividad eléctrica mediante planos que representan los espectros de potencia por la acción de la penicilina y que son concordantes con los reportados en trabajos anteriores (1, 7), donde señalamos el desarrollo del foco epileptico y una lentificación de la actividad eléctrica cerebral por la presencia de espigas en las áreas del lóbulo temporal.

CONCLUSIÓN

La ENV ejerce un doble efecto, pues por un lado tiene un efecto inhibitorio y, por otro, surte un efecto facilitador, dependiendo de la excitabilidad del tejido cerebral.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, SSA proyecto 3220, CONACYT 3389-P y 31771-N y DGAPA IN-203396 UNAM. Agradecemos la asistencia técnica del señor Bernardo Contreras y las ilustraciones de los señores Raúl Cardoso y José Luis Calderón.

REFERENCIAS

1. 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.
2. BERTRAM EH, ZHANG DX, MANGAN P, FOUNTAIN N, REMPE D: Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of diffusely hyperexcitable network. *Epilepsy Res*, 32:194-205, 1998.
3. CARMONA L: Caracterización de los sistemas de excitación e inhibición presentes en el foco epiléptico amigdalino inducido por la administración intracerebral de penicilina G en la rata. Tesis de Maestría en ciencias, México, 2002.
4. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, CONTRERAS CM, GONZALEZ-ESTRADA MT: Red nucleus multineuronal activity during the propagation and extinction of tonic-clonic generalized seizures. *Bol Inst Est Med Biol (Mex)*, 28:265-271, 1975.
5. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, AYALA F: Red nucleus fast activity and signs of paradoxical sleep appearing during the extinction of experimental seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 30: 547-555, 1971.
6. 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.
7. 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.
8. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, MARTINEZ A, VALDES-CRUZ A, MAGDALENO-MADRIGAL VM, MARTINEZ D, FERNANDEZ-MAS R: Vagus nerve chronic stimulation in cats: effects on epileptogenesis (amygdala electrical kindling): behavioral and electrographic changes. *Epilepsia*, 40:822-829, 1999.
9. FERNANDEZ-MAS R, VALDES A, MARTINEZ A, MAGDALENO V, ALMAZAN S, MARTINEZ D, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Visualización gráfica de las transiciones de las fases del sueño en el hombre: métodos de representación tridimensional. *Salud Mental*, 21:27-32, 1998.
10. GLOOR P: Generalized epilepsy with bilateral synchronous spike and wake discharge. New findings concerning its physiological mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol (Supl)* 34:245-249, 1978.
11. GODDARD GV, MCINTYRE DC, LEECH CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*, 25:295-330, 1969.
12. GOLANOV E, REIS DJ: Neurons of nucleus of the solitary tract synchronize the EEG and elevate cerebral blood flow via a novel medullary area. *Brain Res*, 892:1-12, 2001.
13. GUZMAN-FLORES C, ALCARAZ M, FERNANDEZ GUARDIOLA A. Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol Inst Est Med Biol (Mex)*, 16:29-31, 1958.
14. HAMMOND EJ, UTHMAN BM, REID SA, WILDER BJ, RAMSAY RE: Vagus nerve stimulation in humans: neurophysiological studies and electrophysiological monitoring. *Epilepsia (Supl 31)*, 2:51-59, 1990.
15. HASHIZUME K, TANAKA T, FUJITA T, TANAKA S: Generalized seizures induced by an epileptic focus in the mesencephalic reticular formation: Impact on the understanding of the generalizing mechanism. *Stereotact Funct Neurosurg*, 74:153-160, 2000.
16. KUBA R, GUZANINOVA M, BRAZDIL M, NOVAK Z, CHRASTINA J, REKTOR I: Effect of vagal nerve stimulation on interictal epileptiform discharges: A scalp EEG study. *Epilepsia*, 43:1181-1188, 2002.
17. KUMAR P, RAJU TR: Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep. *Brain Res*, 922:299-304, 2001.
18. LA GRUTTA V, SABATINO M: Focal hippocampal epilepsy: effects of caudate stimulation. *Experimental Neurol*, 99:38-49, 1988.
19. LERMA J, HERRERAS O, MUÑOZ D, SOLIS JM: Interactions between hippocampal penicillin spikes and theta rhythm. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 57:532-540, 1984.
20. LLAMAS A, AVENDAÑO C, REINOSO-SUAREZ F: Amygdaloid projections to prefrontal and motor cortex. *Science*, 195:794-796, 1977.
21. LOCKARD JS, CONGDON WC, DUCHARM E: Feasibility and safety of vagal stimulation in monkey model. *Epilepsia (Supl 31)*, 2:20-26, 1990.
22. MAGDALENO-MADRIGAL VM, VALDES-CRUZ A, MARTINEZ-VARGAS D, MARTINEZ A, ALMAZAN S, FERNANDEZ-MAS R, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia*, 43:964-969, 2002.
23. MAGNES J, MORUZZI G, POMPEIANO O: Synchronization of the EEG produced by low frequency electrical stimulation of the region of the Solitary Tract. *Arch Ital Biol*, 99:33-61, 1961.
24. MCLACHLAN R S: Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. *Epilepsia*, 34:918-923, 1993.
25. MILGRAM NW, YEARWOOD T, KHRUGEL M, IVY GO, RACINE R: Changes in inhibitory processes in the hippocampus following recurrent seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Brain Res*, 551:236-246, 1991.
26. MILLER JW: The role of mesencephalic and thalamic arousal systems in experimental seizures. *Prog Neurobiol*, 39:155-178, 1992.
27. MILLER JW, TURNER GM, GRAY BC: Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Res*, 18:195-204, 1994.
28. PAXINOS G, WATSON C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Nueva York, 1998.
29. PELLEGRINI A, GLOOR P: Effects of bilateral partial diencephalic lesions on cortical epileptic activity in generalized penicillin epilepsy in the cat. *Exp Neurol*, 66:285-308, 1979.
30. PITKÄNEN A, JOLKKONEN E, KEMPPAINEN S: Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia*

Morphol, 59:1-23, 2000.

31. RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32:281-294, 1972.
32. RICARDO JA, KOH ET: Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*, 153:1-26, 1978.
33. RUIZ DR, RULL RA, ROLDAN RE, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Mecanismos de propagación y extinción de la actividad convulsiva. *Bol Inst Est Med Biol (Mex)*, 16:153-173, 1958.
34. SAPER CB, LOEWY AD: Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res*, 197:291-317, 1980.
35. SARTER M, MARKOWITSCH HJ: Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. *J Comp Neurol*, 224:445-460, 1984.
36. STERIADE M, GLOOR P, LLINAS RR, LOPES DA SILVA FH, MESULAM MM: Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 76:481-508, 1990.
37. TAKAYA M, TERRY WJ, NARITOKU DK: Vagus nerve stimulation induces a sustained anticonvulsant effect. *Epilepsia*, 37:1111-1116, 1996.
38. TER HORST GJ, STREEFLAND C: Ascending projections of the solitary tract nucleus. En: Robin I, Barraco A (eds). *Nucleus Solitary Tract*. CRC Press, 93-103, Londres, 1994.
39. VALDES A, MAGDALENO V, MARTINEZ D, FERNANDEZ-MAS R, ALMAZAN S, MARTINEZ A, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Chronic stimulation of the cat Vagus Nerve effect on sleep and behavior. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat*, 26:113-118, 2002.
40. VAN LUIJTELAAR G, MEEREN H, SITNIKOVA EY, WELTING J: The effects of lesions in the reticular thalamic nucleus on sleep spindles and spike-wave discharges in rats. *J Sleep Research (Supl 11)*, 1: Abstr 463, 2002.
41. VERTES RP, COLOM LV, FORTIN WJ, BLAND BH: Brain sites for carbachol of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res*, 96:419-429, 1993.
42. WALKER RB, EASTON A, GALE K: Regulation of limbic motor seizures by GABA and Glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia*, 40:1051-1057, 1999.
43. WOODBURY DM, WOODBURY JW: Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia (Supl 43)*, 2:7-19, 1990.
44. ZANCHETTI A, WANG S C, MORUZZI G: The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 4:357-361, 1952.
45. ZHANG X, LE GAL LA SALLE G, RIDOUX V, YU PH, JU G: Prevention of kainic acid-induced limbic seizures and fos expression by the GABA-A receptor agonist muscimol. *Eur J Neurosci*, 9:29-40, 1997.