

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio PET de la modulación farmacológica de  
modelos experimentales de crisis epilépticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ahmed Anis el Sayed**

DIRECTORES

**Luis García García  
Miguel Ángel Pozo García  
Mercedes Delgado Wallace**

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE Farmacia**

Departamento de Farmacología



**Estudio PET de la modulación farmacológica de  
modelos experimentales de crisis epilépticas**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**AHMED ANIS EL SAYED**

*Directores:*

**LUIS GARCÍA GARCÍA**

**MIGUEL ÁNGEL POZO GARCÍA**

**MERCEDES DELGADO WALLACE**

*Madrid, 2016*



*A mis padres  
Y a mi tío que espero que esté en un sitio mejor*



En primer lugar, quiero agradecer a mi director Luis García García, que con el tiempo se convirtió en amigo, por haberme instruido en los métodos de trabajo, los conocimientos de farmacología adquiridos, su experiencia científica, su precisión, la confianza depositada en mí y en general por todas las enseñanzas académicas y personales.

También quiero agradecer al Prof. Miguel Ángel Pozo García, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en la Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar y por sus consejos en momentos decisivos de este camino.

Gracias a la Dra. Mercedes Delgado Wallace por su inestimable ayuda en el análisis de los resultados obtenidos en PET y por enseñarme a trabajar con tesón y paciencia. Son mis tres directores, que me han apoyado y me han hecho sentir más cerca de casa durante estos años en España.

Especial agradecimiento a la Prof. Sagrario Martín-Aragón Álvarez, la primera persona que conocí en la Facultad de Farmacia cuando estaba realizando mi Máster y me dio la oportunidad de conocer a Luis García García. Durante estos cinco años ha sido una amiga y hermana.

Quiero agradecer también a Rubén Fernández y a Pablo Bascuñana, los mejores amigos que me llevo de España, por sus enseñanzas y su apoyo incondicional tanto dentro como fuera del laboratorio.

Gracias a Gerardo, a Uxía y a Pablo por sus conversaciones en la cafetería, sus sonrisas y su compañía. Quiero dar las gracias a todo el personal del Instituto Pluridisciplinar, incluyendo a Sonia, por su colaboración en mayor o menor medida y por hacerme sentir como en casa.

Gracias a mi novia Beatriz Martínez por su paciencia y comprensión en estos dos últimos años. También por su insistencia para avanzar y su confianza en mí.

El agradecimiento más grande es para mis padres por todo lo que han hecho durante su vida por mí, y en especial estos últimos cinco años, han sido mi gran apoyo y me han dado la energía que necesitaba para continuar con mi trabajo. También a mis hermanas Mona y Engy, por sus ánimos y por su confianza en mí.

Por último, quiero agradecer a mis amigos de Egipto; Karim, por sus visitas, haciendo la distancia más corta, a Yousef y a Wafik y a Karim Abdelatif por sus ánimos que me hacían sentir que estaban cerca.



## ***ÍNDICE***

---



<b>0</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1	EPILEPSIA.....	13
1.2	CLASIFICACIÓN DE LA EPILEPSIA.....	14
1.2.1	<i>Epilepsia del lóbulo Temporal (ELT)</i> .....	15
1.2.2	<i>Epilepsia de Ausencia Infantil (EAI)</i> .....	17
1.2.3	<i>Status Epilepticus (SE)</i> .....	17
1.3	EPILEPTOGÉNESIS.....	19
1.4	NEUROTRANSMISORES.....	20
1.4.1	<i>Glutamato</i> .....	20
1.4.2	<i>GABA</i> .....	23
1.4.3	<i>Serotonina (5-HT)</i> .....	25
1.4.4	<i>Dopamina (DA)</i> .....	27
1.5	TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA.....	28
1.6	MODELOS EXPERIMENTALES DE LA EPILEPSIA.....	30
1.6.1	<i>Modelos Genéticos</i> .....	31
1.6.2	<i>Modelos in Vitro</i> .....	33
1.6.3	<i>Lesiones Focales</i> .....	34
1.6.4	<i>Modelos de Kindling</i> .....	35
1.6.5	<i>Modelos de Status Epilepticus (SE)</i> .....	38
1.7	LA TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES EN LA EPILEPSIA.....	42
1.7.1	<i>Técnica de la tomografía por emisión de positrones</i> .....	42
1.7.2	<i>El tomógrafo PET</i> .....	44
1.7.3	<i>Cuantificación de las imágenes PET</i> .....	48
1.7.4	<i>18-Flúor-deoxiglucosa ([<sup>18</sup>F]FDG)</i> .....	50
1.7.5	<i>PET y epilepsia</i> .....	52
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
3.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	61
3.2	CRISIS EPILÉPTICAS: MODELOS EXPERIMENTALES.....	62
3.3	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	64
3.3.1	<i>Efecto de la administración subcrónica de fluoxetina sobre las alteraciones cerebrales inducidas por pilocarpina</i> .....	64
3.3.2	<i>Estudio del eventual efecto de la depleción de 5-HT sobre el daño hipocampal inducido por pilocarpina</i> .....	65
3.3.3	<i>Estudio del efecto de la modulación selectiva aguda del sistema central dopaminérgico sobre el hipometabolismo cerebral y neurogeneración hipocampal inducida por el modelo de SE de litio-pilocarpina en ratas</i> .....	66
3.3.4	<i>Efecto de la administración subaguda de fluoxetina sobre la actividad convulsiva inducida por la administración de 4-AP</i> .....	68
3.4	EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL DE LA CRISIS.....	69
3.4.1	<i>Modelo de Litio-pilocarpina</i> .....	69
3.4.2	<i>Modelo de generación de crisis por administración de 4-AP</i> .....	70
3.5	ESTUDIOS DE IMAGEN IN VIVO ([ <sup>18</sup> F]FDG PET).....	70
3.5.1	<i>Equipamiento utilizado</i> .....	70
3.5.2	<i>Procedimiento de adquisición y reconstrucción de las imágenes tomográficas</i> .....	73
3.5.3	<i>Cuantificación de la actividad metabólica regional</i> .....	74
3.6	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CEREBRALES.....	76
3.7	ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS.....	76

3.7.1	<i>Doble marcaje con Fluoro-Jade C y DAPI</i> .....	76
3.7.2	<i>Inmunohistoquímica de GFAP</i> .....	78
3.7.3	<i>Inmunohistoquímica de Caspasa-9</i> .....	79
3.7.4	<i>Inmunohistoquímica de NeuN</i> .....	80
3.7.5	<i>Tinción de Nissl (violeta de cresilo)</i> .....	81
3.8	ESTUDIOS AUTORRADIOGRÁFICOS.....	82
3.8.1	<i>Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]Flumazenilo</i> .....	82
3.8.2	<i>Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]AMPA</i> .....	83
3.8.3	<i>Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]MK801</i> .....	84
3.8.4	<i>Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]Kainato</i> .....	84
3.8.5	<i>Revelado de las películas de ligandos tritados</i> .....	85
3.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	85
<b>4</b>	<b><i>EFFECTOS DE LA MODULACIÓN SEROTONÉRGICA EN EL DAÑO CEREBRAL INDUCIDO POR EL MODELO DE LITIO-PILOCARPINA</i></b> .....	<b>87</b>
4.1	ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBAGUDA DE FLUOXETINA SOBRE EL DAÑO HIPOCAMPAL INDUCIDO POR PILOCARPINA.....	89
4.1.1	<i>Resultados</i> .....	91
4.2	ESTUDIO DEL EVENTUAL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE 5-HT POR ADMINISTRACIÓN DE PCPA SOBRE EL DAÑO HIPOCAMPAL INDUCIDO POR PILOCARPINA.....	100
4.2.1	<i>Resultados</i> .....	102
4.3	DISCUSIÓN.....	108
<b>5</b>	<b><i>EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D<sub>1</sub> EN LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL MODELO DE LITIO-PILOCARPINA</i></b> .....	<b>119</b>
5.1	RESULTADOS.....	123
5.2	DISCUSIÓN.....	129
<b>6</b>	<b><i>ESTUDIO DEL DAÑO HIPOCAMPAL INDUCIDO POR 4-AP PERIFÉRICA Y SU EVENTUAL MODULACIÓN POR ADMINISTRACIÓN DE FLUOXETINA</i></b> .....	<b>135</b>
6.1	RESULTADOS.....	137
6.2	DISCUSIÓN.....	146
6.2.1	<i>La actividad convulsiva provocada por la administración periférica de una dosis única de 4-AP</i> .....	147
6.2.2	<i>Signos de daño cerebral inducidos por 4-AP</i> .....	148
6.2.3	<i>Efectos de la fluoxetina en la actividad convulsiva inducida por 4-AP</i> .....	152
6.2.4	<i>Efectos neuroprotectores de la fluoxetina en el daño cerebral hipocampal inducido por 4-AP</i> .....	153
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>155</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>185</b>

# Abreviaturas y acrónimos

**4-AP:** 4-aminopiridina

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina  
(serotonina)

**AMPA:** ácido  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropiónico

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BSA:** albúmina sérica bovina

**DA:** dopamina

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**EAI:** epilepsia de ausencia infantil

**ELT:** epilepsia del lóbulo temporal

**FBP:** filtered back projection

**FDG:** fluorodesoxiglucosa

**FOV:** campo de visión

**GABA:** ácido gamma-aminobutírico

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial

**i.p.:** intraperitoneal

**IRM:** imagen de resonancia  
magnética

**ISRS:** inhibidor selectivo de la  
recaptación de serotonina

**KBq:** kilobecquerel

**KeV:** kiloelectronvoltio

**LOR:** línea de respuesta

**LTP:** potenciación a largo plazo

**MBq:** megabecquerel

**MeV:** megaelectronvoltio

**MLEM:** *maximum likelihood  
expectation maximization*

**NeuN:** proteína neuronal nuclear

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**OSEM:** ordered subset expectation  
maximization

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCPA:** p-clorofenilalanina

**PET:** tomografía por emisión de  
positrones

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**ROI:** región de interés

**SCH23390:** R-(+)-7-Cloro-8-hidroxi-  
3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-  
3-benzazepina

**SE:** *status epilepticus*

**SNC:** sistema nervioso central

**SUV:** standardized uptake value

**TAC:** tomografía axial computerizada

**TBS:** buffer tris salino

**UV:** ultravioleta



## ***0 RESUMEN***

---



## Introducción

La epilepsia se define conceptualmente como un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas (Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2014). El término crisis (“*seizure*”) se define como una descarga eléctrica anormal en el cerebro que causa la alteración de la conciencia, la sensibilidad y el comportamiento (Reddy y Kuruba, 2013). La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes, y afecta aproximadamente al 1% -2% de la población. Se estima que alrededor de 50 millones de personas en el mundo sufren de epilepsia (Sander, 2003). La epilepsia del lóbulo temporal es la forma más común de epilepsia parcial en adultos, y por lo general presenta una alta proporción de resistencia al tratamiento farmacológico.

El origen de las crisis se ha relacionado con una desregulación de la actividad neurotransmisora excitatoria glutamatérgica y de la inhibitoria GABAérgica. Por otro lado, poco se conoce de la implicación de otros sistemas neurotransmisores en la epileptogénesis. Así, la participación de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) en la epileptogénesis fue originalmente postulada hace más de 50 años (Bonnycastle et al., 1957). En este sentido, se ha descrito la presencia de diferentes subtipos de receptores de 5-HT que pudieran jugar un papel crucial en la modulación de la excitabilidad neuronal (Bagdy et al., 2007). Sin embargo, en la actualidad, los efectos de la 5-HT y de los fármacos moduladores de su actividad como son los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS) han sido asociados tanto a efectos proconvulsivantes como anticonvulsivantes (Jobe y Browning, 2005).

El papel de la dopamina (DA) en la epilepsia tampoco está del todo esclarecido. Así, parece ser que la actividad dopaminérgica no se modifica de manera significativa durante una crisis epiléptica (Weinshenker y Szot, 2002). De todas formas, la administración de agonistas y antagonistas selectivos de los dos principales grupos de receptores dopaminérgicos (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) en diferentes modelos experimentales sugiere la participación del sistema dopaminérgico en esta patología (Starr, 1996). Así, la administración de agonistas y antagonistas

de ambos subtipos de receptores han sido capaces de modular la respuesta convulsiva en distintos modelos experimentales (Burke et al., 1990; Barone et al., 1992; Freitas et al., 2006a; Freitas et al., 2006b).

Para el estudio de esta patología se han desarrollados distintos modelos animales. Entre éstos, el modelo de *status epilepticus* (SE) mediante la administración de pilocarpina (o su variante por la administración previa de litio) es uno de los modelos animales más ampliamente empleados (Turski et al., 1983). Se caracteriza por la aparición rápida de SE, seguido de un período de latencia silente sin crisis en el que se presenta un estado de hipometabolismo cerebral generalizado (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009; Lee et al., 2012) junto con daño neuronal que afecta principalmente al hipocampo (Mello et al., 1993; Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013). Tras este periodo de latencia de aproximadamente 1 mes de duración, tiene lugar la aparición de crisis recurrentes espontáneas. Por ello, hace que este modelo se considere muy apropiado para el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal (ELT).

La 4-aminopiridina (4-AP) es un agente despolarizante que actúa mediante el bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Hayes, 2004), incrementando de esta manera la liberación neuronal de neurotransmisores, asociándose la liberación de glutamato como causante de las convulsiones inducidas por 4-AP (Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Medina-Ceja et al., 2000; Mihály et al., 2001). A diferencia del modelo de pilocarpina, este modelo no es considerado un modelo de epilepsia ya que su administración no desencadena uno de los aspectos característicos de esta patología que consiste en la aparición de crisis espontáneas. Además, en general, la aparición de crisis de moderada intensidad por administración periférica de este convulsivante no se asocia a un excesivo daño neuronal (Takács et al., 2010).

## Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido explorar la eventual implicación de la modulación farmacológica de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica central en las alteraciones comportamentales, metabólicas y neuroquímicas inducidas por los modelos de SE por administración de litio-pilocarpina y de convulsiones agudas por 4-AP.

Para alcanzar este objetivo general se han diseñado experimentos en los que se ha estudiado los cambios metabólicos y daño neuronal asociados al modelo de SE litio-pilocarpina en tres condiciones:

- 1 Estudiar los efectos del tratamiento con el inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS) fluoxetina durante 7 días, 4 días antes del inducir el SE de litio-pilocarpina y 2 días después del SE.
- 2 Estudiar el efecto de la depleción de 5-HT por administración subaguda de *p*-clorofenilalanina (PCPA), inhibidor de la enzima triptofanohidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de 5-HT.
- 3 Estudiar el efecto del tratamiento agudo con el antagonista selectivo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>, SCH23390 en las alteraciones comportamentales, metabólicas y neurológicas a este modelo de SE.

Adicionalmente, se ha explorado las eventuales alteraciones desencadenadas por las convulsiones inducidas por 4-AP y de la implicación del sistema serotoninérgico cerebral en este modelo de crisis. En este sentido, se evaluó el efecto de un tratamiento subagudo de fluoxetina de 7 días de duración en las eventuales alteraciones asociadas a este modelo agudo.

Como herramienta esencial en la presente Tesis Doctoral, la actividad metabólica regional cerebral se ha evaluado mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET) con 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucosa ([<sup>18</sup>F]FDG). La PET es una técnica de neuroimagen mínimamente invasiva que permite la realización de estudios longitudinales *in vivo* de diferentes aspectos funcionales. En nuestro

caso, la administración del radiotrazador [<sup>18</sup>F]FDG permitió la evaluación del metabolismo como índice de deterioro cerebral asociado a la epileptogenesis.

## **Resultados**

**Modelo de SE por administración de litio-pilocarpina:** Las ratas sometidas a este modelo mostraron crisis de marcada severidad, alcanzado una puntuación de 4-5 (crisis tónico-clónicas) en la escala de Racine. Tres días después del SE, la imagen metabólica [<sup>18</sup>F]FDG-PET mostró un hipometabolismo cerebral generalizado que afectó a todas las áreas del cerebro analizadas en comparación con el grupo de animales control ( $p < 0,01$ ). Esta alteración metabólica fue transitoria, ya que retornó a los valores basales cuando se evaluó en el día 30. Por otra parte, los estudios histoquímicos mostraron signos evidentes de daño neuronal (intensa astrogliosis, neurodegeneración e inducción de caspasa-9) preferentemente en regiones del hipocampo.

**Efecto de la fluoxetina en las alteraciones inducidas por litio-pilocarpina:** El grupo de animales tratados subcrónicamente con fluoxetina (10 mg/kg 7d), no mostró diferencias significativas a nivel comportamental. Así, tanto la intensidad de las crisis, el periodo latencia como la mortalidad fueron similares al grupo de animales inyectados con pilocarpina pero no tratados con fluoxetina. En cambio, el análisis de los resultados de [<sup>18</sup>F]FDG-PET reveló que la fluoxetina fue capaz de evitar el hipometabolismo a corto plazo inducido por el SE. Así, este grupo de animales mostraron valores de actividad metabólica superiores al grupo de animales sometidos al modelo de SE y similares a los grupos control. A su vez y corroborando un papel protector de la fluoxetina (y eventualmente de la 5-HT) en este modelo, los estudios histoquímicos mostraron signos de menor daño neuronal en comparación al grupo de SE litio-pilocarpina.

**Efecto de la administración de PCPA en las alteraciones cerebrales inducidas por el modelo de litio-pilocarpina:** Por otro lado, el tratamiento subagudo con PCPA en animales SE litio-pilocarpina provocó crisis convulsivas tónico-clónicas similares de las del grupo de SE litio-pilocarpina. A su vez, este régimen farmacológico no alteró el hipometabolismo cerebral ni el daño neuronal

agudo inducido por litio-pilocarpina. Así, la evaluación de las respuestas metabólicas por PET y de los diferentes marcadores de daño neuronal no difirió significativamente de las obtenidos en ratas que fueron sometidas a SE litio-pilocarpina. Estos resultados revelan que en nuestras condiciones experimentales, la depleción de 5-HT no tuvo efectos a corto plazo sobre el hipometabolismo inducido por SE litio-pilocarpina ni tampoco sobre los signos de daño neuronal evaluados.

#### **Efecto del bloqueo D<sub>1</sub> sobre las alteraciones cerebrales inducidas por el**

**SE:** En nuestro estudio sobre el efecto de la administración aguda del antagonista D<sub>1</sub> SCH23390, en el modelo de SE litio-pilocarpina, no se observaron cambios significativos ni en la respuesta conductual ni en el hipometabolismo inducido por la administración de litio-pilocarpina. Sin embargo, el bloqueo previo a la inducción del SE de este subtipo de receptor dopaminérgico, sí dio lugar una disminución de marcadores de daño neuronal asociados a este modelo de SE.

#### **Efecto de las crisis convulsivas por administración de 4-AP y su eventual modificación por administración subaguda de fluoxetina:**

En el último estudio realizado, la administración de única dosis de 3 mg/kg de 4-AP generó crisis moderadas (nivel 3-4 según una escala modificada de Racine). Tres días después de la crisis, no se encontraron cambios significativos en la actividad metabólica cerebral cuando se evaluaron los diferentes grupos experimentales. A pesar de que no se observaron signos de neurodegeneración ni de muerte neuronal por 4-AP, los estudios inmunohistoquímicos sí revelaron ciertos signos de daño neuronal. Así, astrogliosis e incremento de la expresión de la proteína apoptótica caspasa-9 aparecieron en las regiones del giro dentado y CA1 del hipocampo de las ratas inyectadas con 4-AP. A nivel comportamental, la fluoxetina no redujo significativamente la severidad de las crisis, pero en cambio, si incrementó por más de 3 veces el tiempo de latencia del inicio de la crisis. Por otra parte, corroborando un efecto neuroprotector para la fluoxetina, el pretratamiento con este ISRS (10 mg/kg, 7d) redujo significativamente el inmunomarcaje de GFAP y de caspasa-9 a nivel hipocampal.

## Discusión

En primer lugar, nuestros resultados avalan el hipometabolismo cerebral generalizado a corto plazo inducido por el SE por administración de litio-pilocarpina. Además, la reducción a corto plazo de la actividad metabólica cerebral inducida por el SE estuvo acompañada de signos de daño neuronal (marcadores de neurodegeneración, astrogliosis, inducción de la expresión de caspasa-9), cuando se evaluaron 33 días después del insulto.

La administración subaguda de fluoxetina (10 mg/kg, 7 d) previno el hipometabolismo cerebral inducido por el SE y redujo los signos de daño neuronal asociados al modelo SE litio-pilocarpina. Como fármaco prototipo del grupo de los ISRS, estos resultados iniciales sugirieron una intervención de la 5-HT en los efectos neuroprotectores observados (Malberg et al., 2000; Mahar et al 2014). Con el fin de corroborar el papel neuroprotector de esta amina cerebral en este modelo, se diseñó un estudio cuyo objetivo era determinar el efecto de la depleción de 5-HT en el daño cerebral generado por el SE de litio-pilocarpina. En este sentido, la administración de PCPA, paradójicamente no agravó ni el hipometabolismo a corto plazo ni ningún marcador estudiado de daño neuronal inducido por pilocarpina (gliosis, neurodegeneración). Es por ello, que al menos en la fase latente temprana de la epileptogenesis inducida por litio-pilocarpina, acciones directas de naturaleza no serotoninérgica, pueden estar contribuyendo a los efectos neuroprotectores de la fluoxetina en este modelo de SE.

La modulación selectiva de los receptores dopaminérgicos ha mostrado tener efectos diferenciales en la respuesta convulsiva en modelos experimentales (Burke et al., 1990, Freitas et al., 2006b). Con el fin de estudiar más profundamente el papel de los receptores D<sub>1</sub> en la respuesta comportamental y en las alteraciones inducidas por el modelo de litio-pilocarpina, se procedió a administrar el antagonista selectivo del receptor D<sub>1</sub> SCH23390 (0,2 mg/kg) en este modelo de SE. El bloqueo D<sub>1</sub> no ejerció efectos significativos sobre la imagen metabólica ni tampoco sobre diversos parámetros comportamentales. Sin embargo, nuestros resultados mostraron acciones neuroprotectoras

asociadas al bloqueo D<sub>1</sub> frente a ciertas alteraciones inducidas por el SE. Así, la administración aguda de SCH23390, 30 minutos antes de la administración de pilocarpina, redujo la neurodegeneración, gliosis y signos de apoptosis característicos de la administración de litio-pilocarpina. Es por ello, que estos resultados sugieren por tanto un papel activo de los receptores dopaminérgicos y concretamente del D<sub>1</sub> en el daño neuronal inducido por la epileptogénesis.

A diferencia del SE inducido por litio-pilocarpina, las convulsiones desencadenadas por 4-AP periférica no se encuentran asociadas a muerte neuronal (Peña y Tapia, 2000; Slezia et al., 2004; Takács et al., 2010). En el presente estudio, la administración de 4-AP (3 mg/kg, i.p), generó convulsiones de moderada intensidad, tal como se han sido descritas en estudios en las que se administraban dosis similares a las aquí utilizadas (Sitges et al., 2012; Sitges et al., 2014). Este comportamiento convulsivo no fue acompañado de signos de muerte neuronal ni de hipometabolismo cerebral a corto plazo, pero en cambio, sí se observaron signos de daño hipocampal. Concretamente, encontramos una activación astrocítica moderada junto con una inducción de la expresión de caspasa-9, sugiriendo por tanto una posible activación retardada de la vía mitocondrial de apoptosis. Estos hallazgos parecen estar en concordancia con la naturaleza no epileptogénica de la 4-AP y su moderada capacidad convulsiva (Medina-Ceja et al., 2008).

La modulación farmacológica de la actividad serotoninérgica cerebral en los estudios con 4-AP se hizo por la administración del ISRS fluoxetina, de forma similar a los estudios con el modelo de SE litio-pilocarpina. A nivel comportamental, la fluoxetina no afectó significativamente a la intensidad de las crisis, pero en cambio, sí incrementó de manera efectiva el periodo de latencia del inicio de las crisis. Además, redujo los dos marcadores anteriormente mencionados de daño neuronal (inmunomarcaje de GFAP y caspasa-9). Ambos resultados, tanto los comportamentales como los neuroquímicos, concuerdan con los descritos para el ISRS sertralina (Gómez et al., 2014; Sitges et al., 2016), en los que este compuesto incrementó el tiempo de latencia a la crisis, redujo la expresión de citocinas proinflamatorias y atenuó la actividad electroencefalográfica epileptiforme inducida por 4-AP. Por tanto, el hecho de

que dos ISRS distintos, como son la fluoxetina y la sertralina, presenten efectos similares y complementarios en la respuesta convulsiva a 4-AP, apoyan un potencial papel neuroprotector para esta clase fármacos, y eventualmente para la 5-HT, frente al daño neuronal inducido crisis convulsivas.

# ***1 INTRODUCCIÓN***

---



## 1.1 Epilepsia

La epilepsia es un trastorno cerebral caracterizado predominantemente por interrupciones recurrentes e imprevisibles de la función normal del cerebro, llamadas crisis epilépticas, cuyo desencadenante no está totalmente determinado (Fisher et al., 2005). Tradicionalmente, el término epilepsia se ha utilizado para referirse a un síndrome o una familia de trastornos más que a una enfermedad concreta, para destacar que comprende diferentes enfermedades. La prevalencia global de este síndrome crónico está en el rango de 4 a 10 por cada 1.000 personas (Forsgren et al., 2005; de Beor et al., 2008). Aunque se han desarrollado un gran número de fármacos para el tratamiento de esta patología, se calcula que el 20-50% de las personas que padecen este trastorno no responde correctamente a la terapia farmacológica (Engel, 2001; Löscher, 2002; Sander, 2003; White, 2003; Theodore y Fisher, 2004). Esta circunstancia, junto con los efectos adversos que presentan muchos de los fármacos antiepilépticos actuales, hace que la búsqueda de nuevos tratamientos siga en desarrollo activo. La carga asociada a la epilepsia es elevada, tanto para los enfermos como para los familiares y la sociedad en general. La epilepsia puede afectar negativamente a la función cognitiva, puede ser fuente de estigma marginación social, provoca un aumento de la mortalidad y se asocia con un mayor riesgo de trastorno psiquiátrico (Begley et al., 2000; Fisher et al., 2005; de Beor et al., 2008).

Las crisis epilépticas pueden expresarse como episodios transitorios y breves, como en el caso de las ausencias o las sacudidas musculares limitadas, o como convulsiones intensas y prolongadas que tienen lugar en las crisis tónico-clónicas o el *status epilepticus* (SE) (Mariani, 2013). El término crisis (“*seizure*”) se define como una descarga eléctrica anormal en el cerebro que causa la alteración de la conciencia, la sensibilidad y el comportamiento (Reddy y Kuruba, 2013). Generalmente, después de dos crisis espontáneas el paciente suele ser diagnosticado con epilepsia.

No hay que confundir, por tanto, los términos de epilepsia y crisis epiléptica. Una crisis epiléptica es el resultado de una descarga neuronal cortical excesiva, que

puede ser focal, generalizada o generalizarse secundariamente, y que es seguida de manifestaciones clínicas, produciendo un trastorno autolimitado de la consciencia, comportamiento, emoción o cualquier función cortical, dependiendo de la localización y características de las descargas. Por otra parte, se entiende por epilepsia a aquella enfermedad en la que las crisis epilépticas recurren, en general como resultado de una lesión cerebral estructural, en el seno de una enfermedad sistémica o de forma idiopática o genética (Fisher et al., 2005).

Básicamente, se distinguen dos tipos de epilepsia: epilepsia primaria y epilepsia secundaria. La primaria (50%) es idiopática, mientras que la secundaria o sintomática (50%) se refiere a la epilepsia adquirida. Los ataques pueden sobrevenir como consecuencia de una variedad de desencadenantes como trauma, anoxia, desequilibrios metabólicos, tumores, encefalitis, síndrome de abstinencia a drogas de abuso, o neurotoxicidad. Los factores de riesgo más comunes de la epilepsia secundaria son las enfermedades cerebrovasculares, los tumores cerebrales, el alcohol, las lesiones traumáticas en la cabeza, malformaciones del desarrollo cortical, la herencia genética, y las infecciones del sistema nervioso central (Mathern et al., 1996; Jacobs et al., 2009; Reddy y Kuruba, 2013).

## **1.2 Clasificación de la epilepsia**

Las crisis epilépticas se clasifican generalmente en crisis parciales y en crisis generalizadas. La manifestación clínica de las crisis parciales varía en función del origen de las descargas epilépticas (el foco epiléptico) y afecta a las funciones motoras, sensoriales y autonómicas, e incluso cursa con síntomas psíquicos. En las crisis parciales simples no hay pérdida del conocimiento, a diferencia de las crisis parciales complejas en las que sí hay pérdida del mismo. Cuando la descarga se hace suficientemente generalizada e incluye una fuerte participación de los circuitos del sistema motor, el resultado es una respuesta

convulsiva, que por lo general incluye tanto contracciones tónicas (contracciones sostenidas) como clónicas (alternancia de contracciones y relajaciones). Las crisis de ausencia son crisis primarias generalizadas que no afectan de una forma tan importante al sistema motor. Las crisis focales, cuyo origen se encuentra localizada, pueden extenderse y llegar a convertirse en generalizadas, dando lugar a convulsiones generalizadas secundarias (Engel, 2001).

Tal como se ha mencionada anteriormente, de acuerdo con la etiología, la epilepsia se clasifica en epilepsia idiopática y epilepsia sintomática. Las epilepsias idiopáticas, tanto generalizadas como focales, pueden deberse a canalopatías, a alteraciones del metabolismo neuronal o a alteraciones de la migración neuronal. Las canalopatías son alteraciones de los canales iónicos dependientes de voltaje o ligados a receptores de neurotransmisores, que pueden tener un sustrato genético monogénico o poligénico. Y así se han encontrado mutaciones en los canales iónicos dependientes de voltaje, como el canal de  $\text{Na}^+$ , canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , canal de  $\text{K}^+$ , canal de  $\text{Cl}^-$ . También se han encontrado mutaciones en los canales iónicos ligados a receptores de neurotransmisores, como el canal de  $\text{Cl}^-$  del receptor  $\text{GABA}_A$  (ácido gamma-aminobutírico) y el canal catiónico del receptor nicotínico. Por otro lado, las epilepsias sintomáticas son epilepsias adquiridas que se pueden producir por lesiones prenatales graves del SNC, traumatismos craneoencefálicos, infecciones del SNC, alteraciones cerebrovasculares, tumores y enfermedades neurodegenerativas, por sí solas o favorecidas por un sustrato genético. Algunas de estas lesiones pueden provocar convulsiones en la fase aguda, pero en muchos casos la epilepsia aparece al cabo de meses o incluso años. Sin embargo, también hay epilepsias sin lesiones epileptogénicas claras como la epilepsia criptogénica (Engel, 2001; Shorvon, 2011).

### **1.2.1 Epilepsia del lóbulo Temporal (ELT)**

La ELT es la forma más común de epilepsia parcial, afectando aproximadamente al 20% de todos los pacientes con epilepsia. Es también la epilepsia que ofrece

mayor resistencia al tratamiento farmacológico. El foco epiléptico en pacientes con ELT reside a menudo en las estructuras temporales mesiales como el hipocampo y la amígdala. Las crisis son complejas y se acompañan de inmovilidad y automatismos oroalimentarios. Este tipo de epilepsia está asociado a depresión, a dificultades en el aprendizaje y en la memoria (Engel, 1996; Morimoto et al., 2004; André et al., 2007; Reddy y Kuruba, 2013).

La atrofia de las estructuras temporales mesiales es bien conocida por estar asociada con la ELT. La esclerosis del hipocampo es la anormalidad histológica más frecuente de esta forma de epilepsia, y por lo que recibe el nombre de ELT mesial. Aunque las etiologías de la ELT son heterogéneas, los pacientes con ELT mesial suelen tener antecedentes de convulsiones febriles prolongadas o un SE (Morimoto et al., 2004). Estudios *in vivo* de neuroimagen han sido de gran utilidad a la hora de detectar anormalidades estructurales y metabólicas relacionadas con la epilepsia en estas estructuras temporales mesiales. Así, la resonancia magnética (RMN) ha demostrado la atrofia del hipocampo mientras que la tomografía por emisión de positrones (PET) ha revelado alteraciones funcionales, entre los que se incluyen una disminución en el flujo sanguíneo cerebral y alteraciones del metabolismo de la glucosa. En este sentido, es característico la detección de hipometabolismo en el período interictal y un aumento del mismo en el período ictal (Engel, 1996; Morimoto et al., 2004; Duncan et al., 2006). En consonancia con estas alteraciones descritas por técnicas de neuroimagen, los estudios histológicos han mostrado lesiones en las áreas temporales de pacientes diagnosticados de ELT. Así, estudios de los hipocampos resecados quirúrgicamente de pacientes de ELT que presentaban resistencia al tratamiento con los fármacos anticonvulsivantes, han mostrado signos de carácter degenerativo o esclerosis, incluyendo gliosis y pérdida neuronal. Además de estos cambios degenerativos, el hipocampo epileptógeno presenta una reorganización aberrante neuronal (red epileptogénica) que se hace evidente por la formación de nuevas ramificaciones axonales (*sprouting*) y de sinaptogénesis (Proper et al., 2001; Morimoto et al., 2004; André et al., 2007; Reddy y Kuruba, 2013).

A nivel experimental, el modelo de ELT inducida en ratas por la administración del agonista colinérgico muscarínico pilocarpina, solo o en combinación con litio reproduce la mayoría de las características clínicas y neuropatológicas de la ELT humana con SE, como la lesión inicial precipitante (Turski et al., 1989; André et al., 2007; Löscher, 2011) y del hipometabolismo cerebral (Goffin et al., 2009, Guo et al., 2009, Lee et al., 2012).

### **1.2.2 Epilepsia de Ausencia Infantil (EAI)**

Los niños diagnosticados con EAI representan aproximadamente el 10% de los casos de epilepsia en los niños en edad escolar. Es la forma común de epilepsia pediátrica generalizada idiopática. Se caracteriza por múltiples crisis de ausencia típicas, acompañadas con descargas bilaterales, simétricas y sincrónicas con picos de frecuencia de 3 Hz en la electroencefalografía (EEG). Existe un gran interés por estos pacientes, no sólo en los aspectos cognitivos, conductuales y genéticos, sino también en los estudios de neuroimagen (Pavone et al., 2001; Caplan et al., 2008; Mariani, 2013; Matricardi et al., 2014).

En estudios anteriores, la EAI se había considerado un trastorno benigno cuyo control de las convulsiones se alcanzaba con relativa facilidad y con una mínima afectación de la función cognitiva y del comportamiento. Sin embargo, los resultados de los estudios más recientes reportan una tasa variable de control de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas asociadas, la progresión a epilepsia mioclónica juvenil, así como de las dificultades cognitivas y del aprendizaje (Covanis et al., 1992; Pavone et al., 2001; Grosso et al., 2005; Caplan et al., 2008; Matricardi et al., 2014).

### **1.2.3 *Status Epilepticus (SE)***

El SE es una emergencia neurológica y médica asociada a una alta morbilidad y mortalidad que alcanza hasta el 40%. Se caracteriza por la larga duración de las convulsiones. El SE se define como la actividad convulsiva continua o múltiples

convulsiones sin recuperación de la conciencia durante más de 30 minutos (Lowenstein et al., 1990; Trinka et al., 2015). El SE es una emergencia médica que si no se trata puede la muerte. Se distinguen dos tipos de SE: generalizado convulsivo y no convulsivo (Knake et al., 2009). Aunque la fisiopatología del SE no se conoce con precisión, los mecanismos más probables consisten en un exceso de la actividad excitatoria glutamatérgica junto con una pérdida de la actividad inhibitoria GABAérgica (Reddy y Kuruba, 2013). Actualmente, las terapias de primera línea frente a esta urgencia médica son las benzodiazepinas, administradas por vía intravenosa, que potencian las respuestas inhibitorias mediadas por los receptores de GABA. Sin embargo, la eficacia de éstas disminuye drásticamente con el aumento de la duración del SE (Trinka et al., 2015). En algunos casos de SE hay una pérdida completa de la eficacia terapéutica de las benzodiazepinas, debiéndose recurrir a una terapia de segunda línea más agresiva (fenitoína y fosfenitoína) o terapias de tercera línea (el anestésico-sedante propofol o el barbitúrico fenobarbital), aunque no siempre resultan eficaces. Estas formas de SE fármaco-resistentes se denominan SE refractario. El SE refractario, que ocurre hasta en el 40% de los pacientes con SE, sigue siendo un desafío en cuanto a su tratamiento debido a mal pronóstico. En general, el SE refractario se trata con la inducción de coma usando anestésicos generales como propofol o pentobarbital (Claassen et al., 2002). Es por todo ello, que continúe la búsqueda de nuevos anticonvulsivantes para el tratamiento eficaz de esta emergencia médica.

En la actualidad existe una amplia variedad de modelos animales de crisis epilépticas y/o SE. La diversidad de modelos animales disponibles ofrece una oportunidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos antiepilépticos. El SE puede ser inducido en modelos animales de forma farmacológica utilizando compuestos químicos convulsivos, o mediante estimulación eléctrica. Los modelos animales que han recibido mayor atención han sido los que han utilizado la administración sistémica de pilocarpina (agonista muscarínico), la administración sistémica o local de ácido kaínico (agonista del receptor de glutamato ionotrópico del mismo nombre) o bien usando protocolos de estimulación eléctrica de áreas específicas del cerebro, especialmente a nivel

del sistema límbico (Morimoto et al., 2004; Martín y Pozo, 2006; Reddy y Kuruba, 2013).

### **1.3 Epileptogénesis**

Se denomina epileptogénesis al proceso por el cual un cerebro que funciona correctamente se convierte gradualmente en un cerebro epiléptico (Akhlaghi et al., 2012). El término epileptogénesis se aplica a los cambios progresivos tanto bioquímicos, anatómicos y fisiológicos que conducen a crisis recurrentes espontáneas. Estos cambios se producen durante un periodo de latencia, que puede durar desde semanas a años, en el que tiene lugar muerte celular, activación glial, alteraciones en los niveles de neurotransmisores y de sus receptores, *sprouting* axonal (ramificación axonal) con formación de una “red epiléptica”, alteraciones en el metabolismo cerebral y daño neuronal en diferentes áreas cerebrales como hipocampo, corteza y amígdala. (Wieser, 2004; Akhlaghi et al., 2012; Radzik et al., 2015).

La característica clave en cualquier modelo de epileptogénesis es un intervalo entre la aparición de la anomalía o estímulo epileptógeno (genética o inducida) y la ocurrencia espontánea de las crisis (Stables et al., 2002). La determinación temprana de marcadores adecuados permitiría reflejar las modificaciones estructurales o funcionales asociadas a la epileptogénesis. En este contexto, se ha planteado la hipótesis de que el establecimiento de un estado epiléptico crónico (epileptogénesis) inducido gradualmente (“*kindling*”) o de forma aguda (como el que tiene lugar por la generación de SE), tiene como base la activación de las vías que utilizan glutamato como neurotransmisor excitatorio y la atenuación de las vías de que utilizan GABA como un neurotransmisor inhibitorio (Morimoto et al., 2004). En consecuencia, los estudios sobre los mecanismos de epilepsia se han centrado en los cambios en estos sistemas excitatorios e inhibitorios, incluyendo a su vez alteraciones en la eficacia sináptica, el crecimiento de nuevas conexiones, la pérdida de las conexiones existentes e incluso posibles implicaciones de otros

neurotransmisores como la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) y la DA (Bonnycastle et al., 1957; Morimoto et al., 2004; Bagdy et al., 2007; Tripathi y Bozzi, 2015).

A continuación, se hace una revisión de los posibles elementos implicados en el proceso de epileptogénesis.

## **1.4 Neurotransmisores**

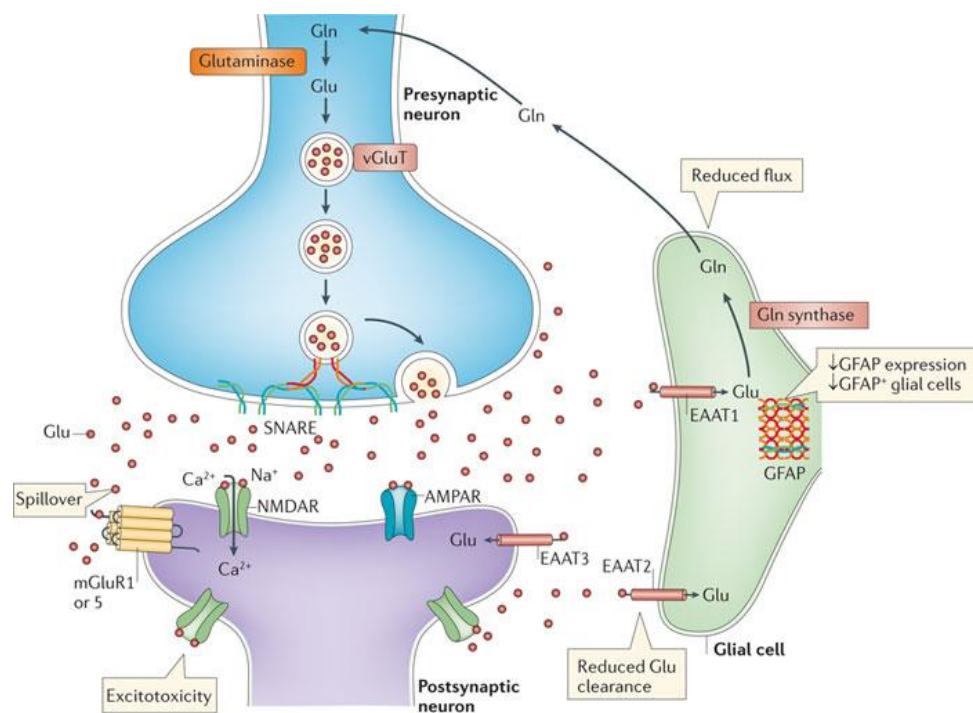
En general, las crisis epilépticas se desencadenan por un desequilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, por lo que los principales neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, glutamato y GABA respectivamente, juegan papeles cruciales en el origen de las crisis. La implicación de otros neurotransmisores (entre ellos, la DA y 5-HT) en el desencadenamiento de las crisis, en el proceso de epileptogénesis y en el eventual daño o protección no está aún bien esclarecida. Aún así, existen evidencias farmacológicas del papel de la 5-HT y la DA en la epileptogénesis. En el caso de la 5-HT, se ha postulado que la 5-HT podría desempeñar un papel protector (Bonnycastle et al., 1957; Avanzini y Franceschetti, 2003; Morimoto et al., 2004; Bagdy et al., 2007; Werner y Coveñas, 2015). En el caso de la DA, se han descrito efectos opuestos sobre los parámetros comportamentales desencadenados por el SE inducido por administración de pilocarpina de las dos familias de receptores dopaminérgicos (Burke et al., 1990; Barone et al., 1992, Freitas et al., 2006b).

### **1.4.1 Glutamato**

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro, y un incremento de la actividad glutamatérgica está asociado a un estado de hiperexcitabilidad neuronal. Se encuentra en el cerebro de los mamíferos en una concentración elevada (10 mM) (Bradford, 1995). Se han descrito 5 vías glutamatérgicas a nivel cerebral: 1) la proyección ascendente mesocortical; 2) la corticoestriatal; 3) la talamocortical; 4) la vía descendente corticotalámica y 5)

una red de intracortical constituida por neuronas piramidales (Schwartz et al., 2012), involucrándose su alteración no solamente en la epilepsia, sino en otras patologías como la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson y en enfermedades neurodegenerativas.

El glutamato se sintetiza en el citoplasma a partir de glutamina por acción de la glutaminasa, y también a partir del 2-oxoglutarato catalizado por la 2-oxoglutarato-aminotransferasa. Una vez sintetizado se almacena en las vesículas sinápticas para que tenga lugar la secreción por el proceso de exocitosis. Este almacenamiento vesicular de glutamato tiene lugar por un transportador vesicular altamente específico, dependiente de un gradiente electroquímico producido por una bomba H<sup>+</sup>-ATPasa incorporada a la membrana vesicular. Tras la liberación del glutamato a la hendidura sináptica, éste ejerce sus efectos por unión a sus receptores (Popoli et al., 2012). Estos procesos se muestran en la Fig. 1. Existen dos grandes grupos de receptores glutamatérgicos, los ionotrópicos que son canales iónicos asociados a ligando de naturaleza excitatoria o despolarizante y los metabotrópicos que son receptores acoplados a proteínas G. Se distinguen tres familias de receptores ionotrópicos (AMPA “ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico”, NMDA “N-metil-D-aspartato” y kainato) y tres familias de receptores metabotrópicos que comprenden un total de 8 receptores distintos (Grupo I: mGluR1 y mGluR5; Grupo II: mGlu2 y mGlu3; Grupo III: mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) (Meldrum et al., 1999; Avanzini y Franceschetti, 2003; Morimoto et al., 2004). Los receptores ionotrópicos son permeables a cationes, fundamentalmente Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>. Además, los receptores metabotrópicos están frecuentemente acoplados a un incremento intracelular de inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>) con el consiguiente incremento de los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup>. La finalización de la acción del glutamato a nivel sináptico tiene lugar por la acción de transportadores específicos (EAAT; transportadores de aminoácidos excitatorios), localizados tanto a nivel glial como neuronal.



**Fig. 1.** Neurotransmisión glutamatergica (tomado de Popoli et al., 2012).

Existen evidencias de la implicación de los receptores glutamatergicos, y en especial de los ionotrópicos, en la epileptogénesis (Morimoto et al., 2004). Así, en algunos modelos animales como en el kindling se ha observado que la progresión de la epileptogénesis depende de la activación de los receptores NMDA. A su vez, se ha comprobado que antagonistas de los receptores NMDA y AMPA han mostrado ejercer efectos neuroprotectores frente a los daños inducidos por agentes convulsivantes (Meldrum, 1994; Meldrum et al., 1999). Los estudios de las descargas epileptiformes en rodajas de hipocampo muestran que la descarga en forma de ráfagas prolongadas de los potenciales de acción es dependiente de la activación de los receptores AMPA en sus componentes iniciales y por los receptores NMDA en los elementos posteriores (Meldrum et al., 1999).

Por otra parte, es ampliamente conocido que la inyección sistémica o intracerebroventricular de kainato en roedores induce convulsiones que parecen originarse en el hipocampo asociadas a un intenso daño en esta área cerebral (Choi et al., 2015). En este sentido, se ha sugerido una participación clave de los subtipos de receptores de kainato, GluR5 y GluR6, en las crisis, ya que la

administración de antagonistas selectivos de este subtipo de receptor como el LY 382884 (Simmons et al., 1998) y el NS 102 (Verdoorn et al., 1994) previenen tales crisis. De todas formas, la contribución de los diferentes receptores glutamatérgicos ionotrópicos en la epileptogénesis aún no está establecido (Mathern et al., 1996; Meldrum et al., 1999; Avanzini y Franceschetti, 2003; Morimoto et al., 2004). Por lo tanto, una alteración funcional de los receptores ionotrópicos, de los transportadores encargados de su recaptación o bien un incremento anormalmente excesivo de la exocitosis glutamatérgica podrían constituir los factores desencadenantes principales en el inicio, mantenimiento y daño neuronal de las crisis epilépticas.

Hasta la fecha se han descrito ocho receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu1-8) con secuencias moleculares conocidas. La activación de mGluRs da lugar a una amplia variedad de efectos inmediatos y mediatos en la excitabilidad neuronal; efectos que implican cambios en la conductancia de canales de  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  que pueden condicionar su acoplamiento con la subunidad  $\alpha$  de la proteína G. La localización anatómica de los receptores mGluRs en el sistema nervioso central favorece tanto el control presináptico de la liberación de glutamato, así como el control postsináptico de las respuestas neuronales a este neurotransmisor. El tratamiento de animales con agonistas y antagonistas de receptores mGluRs del grupo I da lugar a efectos proconvulsivantes y anticonvulsivantes, respectivamente. Por otra parte, los agonistas de los grupos II y III producen un efecto anticonvulsivante (Fitzjohn et al., 1996; Luján et al., 1996; Tang et al., 1997; Meldrum et al., 1999; Morimoto et al., 2004).

#### **1.4.2 GABA**

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. Por ello, la pérdida del equilibrio entre excitación e inhibición neuronal característica de la epilepsia ha sido también atribuida a alteraciones en el funcionamiento del sistema inhibitorio GABAérgico. Las pérdidas de neuronas o terminales nerviosas GABAérgicas en los focos epilépticos corticales constituyen una evidencia relevante de la pérdida del equilibrio excitación-inhibición (Bradford,

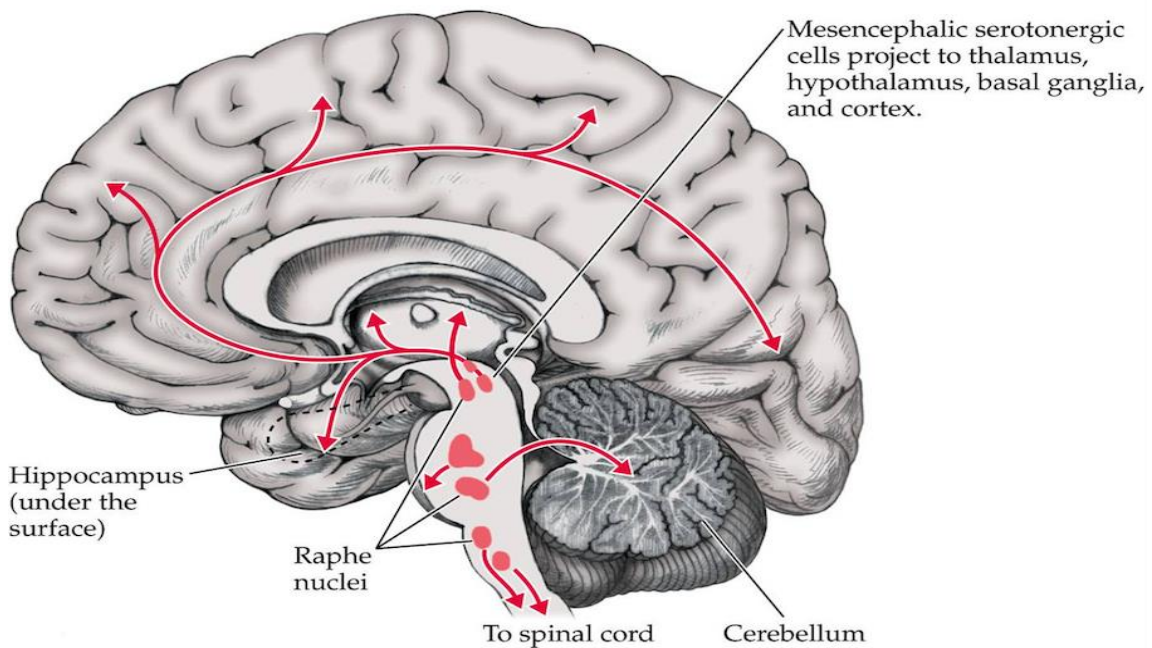
1995; Treiman, 2001). Apoyando una pérdida de la población neuronal GABAérgica en la epilepsia, se ha observado que la muerte neuronal hipocampal que tiene el modelo experimental SE en rata inducido por administración de pilocarpina afecta de manera intensa a las neuronas GABAérgicas, sugiriendo la especial susceptibilidad de estas neuronas a los insultos epileptogénicos.

El GABA se sintetiza en las terminales de los axones de neuronas GABAérgicas y se libera en la sinapsis, donde se une a uno de los dos tipos de receptores de GABA: el ionotrópico GABA<sub>A</sub> que controlan la entrada de cloruro (Cl<sup>-</sup>) en la célula, y GABA<sub>B</sub> (receptor acoplado a proteínas G) cuya activación aumenta la conductancia del potasio (K<sup>+</sup>), disminuye la entrada de calcio (Ca<sup>2+</sup>) e inhibe la liberación presináptica de otros transmisores (McKernan y Whiting, 1996; Treiman, 2001; Sperk et al., 2004). Por lo tanto, ambos tipos de receptores presentan una naturaleza de carácter inhibitorio al presentar un efecto hiperpolarizante.

La evidencia experimental y clínica apunta a que el GABA ejerce una función clave en el mecanismo de control de la epilepsia, así como en su tratamiento. En este último punto conviene recordar la demostrada eficacia antiepiléptica, especialmente frente al SE mostrada por benzodiazepinas y por el barbitúrico fenobarbital, fármacos potenciadores de la inhibición GABAérgica. Por otra parte, antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, como son la bicuculina y la picrotoxina, son potentes proconvulsivantes (Treiman, 2001; Löscher, 2002; Morimoto et al., 2004). Otras evidencias, incluyen una reducción de la población y/o eficacia de las proteínas de transporte de GABA en las membranas celulares neuronales o gliales en el tejido epiléptico, tanto de humanos como de rata. Se postula que esta disminución en los transportadores de GABA podría dar lugar a una disminución en la liberación de GABA inducida por el glutamato (Bradford, 1995). Con respecto a los modelos experimentales de SE, tanto las crisis como el daño del hipocampo asociados a las mismas, son prevenidos completamente por el pre-tratamiento con fenobarbital y por benzodiazepinas. Sin embargo, la mayoría de los fármacos antiepilépticos, incluyendo los agonistas/moduladores de los receptores GABA<sub>A</sub>, no impiden el desarrollo de epileptogénesis si son administrados después del SE.

### 1.4.3 Serotonina (5-HT)

El papel de la 5-HT en el sistema nervioso central es muy diverso. La 5-HT participa en el control del apetito, el sueño, la memoria y el aprendizaje, el estado de ánimo, la temperatura corporal, y la maduración neuronal, entre otros (Ray et al., 2011; Berger et al., 2009). Aunque hace más de 50 años se describió por primera vez la implicación de la 5-HT en la epilepsia (Bonnycastle et al., 1957), la mayoría de las investigaciones en relación con la 5-HT se han llevado a cabo en el área del descubrimiento y desarrollo de fármacos neuropsiquiátricos para el tratamiento de trastornos afectivos. Los somas de las neuronas serotoninérgicas se localizan en los Núcleos del Rafe, proyectándose en vías ascendentes hacia la corteza, tálamo, hipotálamo o ganglios basales o descendentes hacia la médula espinal (Fig. 2).



**Fig. 2.** Vías serotoninérgicas centrales (tomado de Biological Psychology, Sinauer Associates, 6ª ed.)

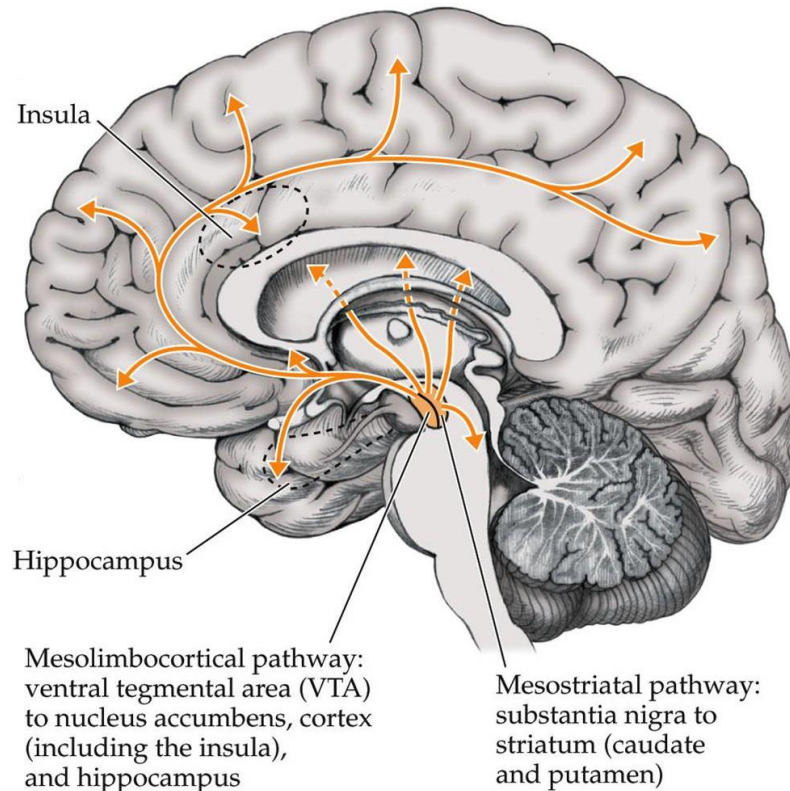
Existen alrededor de 14 subtipos de receptores de 5-HT, que han sido clasificados en 7 familias diferentes. Todos los receptores de 5-HT son

receptores metabotrópicos con 7 segmentos transmembrana, acoplados a proteínas G, excepto el receptor 5-HT<sub>3</sub> que es un receptor ionotrópico despolarizante. Se ha descrito la participación de al menos 4 subtipos de receptores de 5-HT en la epileptogénesis: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. Aunque los mecanismos responsables aún no están bien determinados, se ha descrito ampliamente que la presencia de diferentes subtipos de receptores 5-HT que controlan tanto las sinapsis excitatorias como las sinapsis inhibitorias juegan un papel crucial en la modulación de la excitabilidad neuronal. En este contexto, la 5-HT y los fármacos antidepresivos se han asociado de forma contradictoria tanto con efectos proconvulsivantes y anticonvulsivantes (Hoyer et al., 1994, Theodore, 2003; Jobe y Browning, 2005; Bagdy et al., 2007; McCovry et al., 2015).

Los fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS) incrementan la concentración de este neurotransmisor en las sinapsis serotoninérgicas por lo que afectan a la transmisión serotoninérgica a través de un amplio rango de subtipos de receptores pre- y postsinápticos. La diferencia en la potencia y la constante de disociación de estos ligandos parece explicar los efectos pro- o antiepilépticos resultantes relacionados con la dosis administrada (Braitberg y Curry, 1995; Theodore, 2003). Además del eventual efecto debido al incremento de 5-HT sináptica, se ha atribuido que la modulación de otros neurotransmisores mediada por la 5-HT, sean en parte responsables de los efectos observados de la administración de ISRS (Bagdy et al., 2007). Incluso, se ha atribuido que las acciones anticonvulsivantes de la fluoxetina, prototipo del grupo de los ISRS, sean debidas a mecanismos de naturaleza no serotoninérgica (Vizi et al., 2013). En cuanto a los efectos de la reducción de los niveles de 5-HT en el desarrollo de epilepsia, los resultados que se han descrito hasta la fecha son un tanto inconsistentes, observándose tanto efectos proconvulsivantes, anticonvulsivantes como ausencia de efectos (Racine y Coscina 1979; Tagashira et al., 1983; Bercovici et al., 2006).

#### 1.4.4 Dopamina (DA)

La DA es un neurotransmisor que interviene en el control de los centros de recompensa y placer, en la regulación del movimiento, en las respuestas emocionales y en la regulación neuroendocrina (Schultz, 2007). Estas diversas funciones vienen reguladas por las distintas vías neuronales: vía nigroestriatal, tuberohipofisaria, mesolímbica y mesocortical (Fig. 3).



**Fig. 3.** Vías dopaminérgicas centrales (tomado de Biological Psychology, Sinauer Associates, 6ª ed.)

Diversos estudios farmacológicos indican que la DA puede modular la respuesta epiléptica. La respuesta, convulsiva o anticonvulsiva parece estar ligada a los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos existentes. Así, mediante el empleo de ligandos específicos para las diferentes subclases de receptores dopaminérgicos, se han observado efectos contradictorios (anticonvulsivante o proconvulsivante) dependiendo del tipo de receptor estimulado y en función del modelo animal empleado (Schultz, 2007; Tripathi y Bozzi, 2015). Los estudios realizados en ratones genéticamente modificados que carecen de subtipos de receptores específicos de DA muestran el efecto contrario de los receptores D<sub>1</sub>

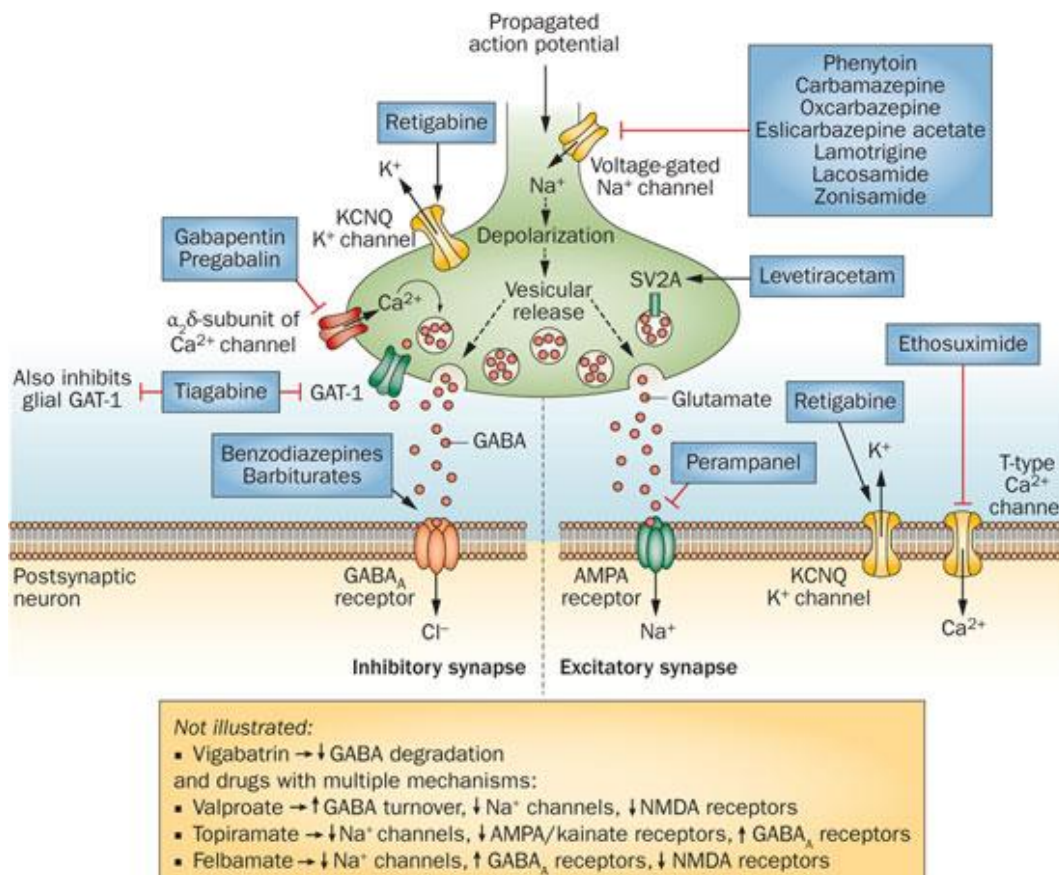
y D<sub>2</sub> en la regulación de la actividad convulsiva. De los diferentes estudios realizados hasta la fecha, se ha encontrado que la activación de los receptores D<sub>1</sub> (receptores acoplados a la activación de la adenilato ciclasa) generalmente ejerce efectos pro-epileptogénicos, mientras que la estimulación de los receptores inhibitorios D<sub>2</sub> (receptores acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa) parece presentar efectos anticonvulsivantes. Por tanto, se puede concluir que el equilibrio fisiológico de la actividad dopaminérgica “excitatoria” D<sub>1</sub> e “inhibitoria” D<sub>2</sub> es importante para determinar la compleja respuesta neuromoduladora frente a las convulsiones y también frente a la muerte neuronal hipocampal (Starr, 1996; Bozzi et al., 2000; O’Sullivan et al., 2008; Tripathi y Bozzi, 2015).

## **1.5 Tratamiento de la epilepsia**

En general, cuando un paciente ha tenido dos o más crisis no provocadas se diagnostica epilepsia y se inicia un tratamiento farmacológico antiepiléptico (Sander, 2003). Tal como se ha mencionado anteriormente, aproximadamente, el 20% de los individuos con un diagnóstico de epilepsia tienen crisis que no son controladas adecuadamente con fármacos antiepilépticos. Algunos de estos pacientes no responden porque sus eventos paroxísticos no son epilépticos. Otros siguen teniendo crisis debido a la prescripción de un tratamiento incorrecto, bien por un diagnóstico equivocado del tipo de crisis o bien por la desinformación acerca de la terapia apropiada. Sin embargo, hay otros pacientes que no alcanzan el control a causa del incumplimiento de sus regímenes de tratamiento farmacológico. También existe un número significativo de pacientes con crisis no controladas médicamente y que no responden a los fármacos antiepilépticos (Engel, 2001).

El tratamiento farmacológico actual de la epilepsia se basa en restablecer el equilibrio de la actividad cerebral anormalmente alterada, con el objetivo de reducir la frecuencia e intensidad de las crisis epilépticas. En este sentido, los diferentes fármacos antiepilépticos son capaces de modular la actividad neuronal, bien potenciando la actividad inhibitoria o frenando los mecanismos

neuronales implicados en la excitabilidad neuronal. Así, el tratamiento farmacológico actual (esquemático en la Fig. 4) se basa en: 1) potenciación de la inhibición sináptica mediada por GABA, bien disminuyendo la degradación metabólica del GABA por inhibición de la enzima GABA-transaminasa (valproato o vigabatrina), o activando el receptor GABA<sub>A</sub> (barbitúricos, benzodiazepinas, felbamato, topiramato) o bloqueando la recaptación de este neurotransmisor (tiagabina) ; 2) inhibición de los canales de iones de Na<sup>+</sup> (carbamazepina, valproato, lamotrigina, felbamato, topiramato); 3) reducción o inhibición del flujo de Ca<sup>2+</sup> por bloqueo de los canales : (valproato, etosuximida, trimetadiona, zonisamida, gabapentina, pregabalina) y; 4) reducción de la actividad glutamatergica (topiramato y felbamato) que presentan cierta capacidad de reducir la actividad glutamatergica, aunque en la actualidad no se han conseguido fármacos anticonvulsivantes eficaces que actúen exclusivamente por este mecanismo (Duncan, 1991; White, 1999).

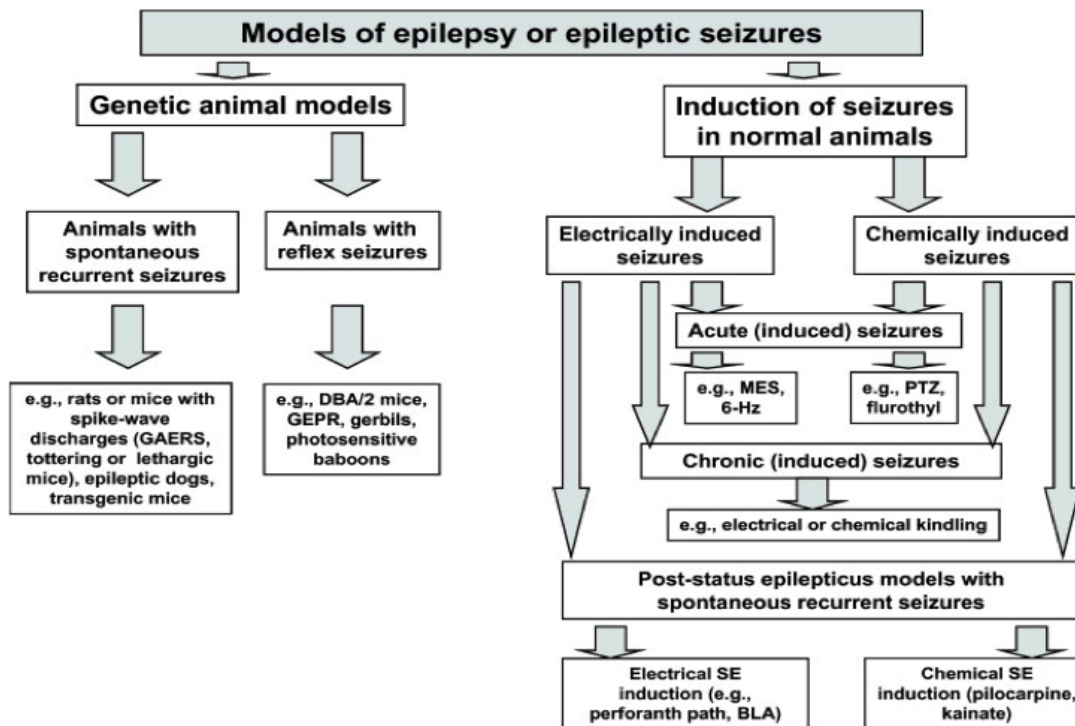


**Fig. 4.** Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos. (Singh y Brashier, 2014).

## 1.6 Modelos experimentales de la epilepsia

Durante la última década se han hecho progresos sustanciales en el conocimiento de las características clínicas de las epilepsias y el descubrimiento de los mecanismos básicos responsables de estos trastornos. Se han identificado once genes de la epilepsia humana y otros muchos se están identificando actualmente gracias a los modelos animales de epilepsia (Jacobs et al., 2009). Es por ello que el uso de modelos de crisis tanto *in vitro* como en animales sigue siendo esencial en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos.

En 1938 Merritt y Putnam fueron los primeros en desarrollar con éxito, por primera vez, un modelo de convulsiones en animales. Mediante convulsiones inducidas eléctricamente en gatos, descubrieron las propiedades anti-convulsivas de la fenitoína. En la actualidad existe una amplia variedad de modelos experimentales de crisis epilépticas, SE y la diversidad de modelos experimentales disponibles ofrece una oportunidad de descubrir y desarrollar mejores fármacos antiepilépticos (Martín y Pozo, 2006). Por tanto, en los últimos años ha habido un cambio en el enfoque de muchos laboratorios acerca de la comprensión de los cambios biológicos que siguen a la aparición de convulsiones recurrentes para la comprensión de aquellos que los preceden. En definitiva, una gran parte de la información sobre los mecanismos de epileptogénesis proviene de los modelos animales (Jacobs et al., 2009). No todos los modelos animales de convulsiones y/o epilepsia pueden ser utilizados para todos los propósitos descritos anteriormente. Además, el objetivo del experimento es esencial para la selección de un modelo animal adecuado (Fig. 5; Löscher, 2011).



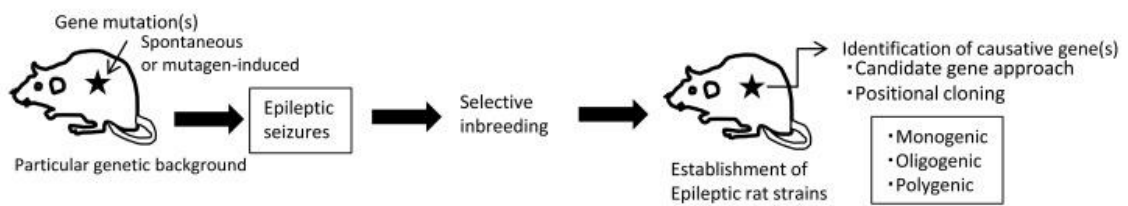
**Fig. 5.** Visión general de los modelos de epilepsia y convulsiones epilépticas. Hay que tener en cuenta que existen numerosos modelos que no se muestran en esta figura, incluyendo modelos de epilepsia crónica en la que las convulsiones recurrentes espontáneas se desarrollan después de una lesión traumática cerebral, daño cerebral isquémico, o convulsiones febriles (Tomado de Löscher, 2011).

### 1.6.1 Modelos Genéticos

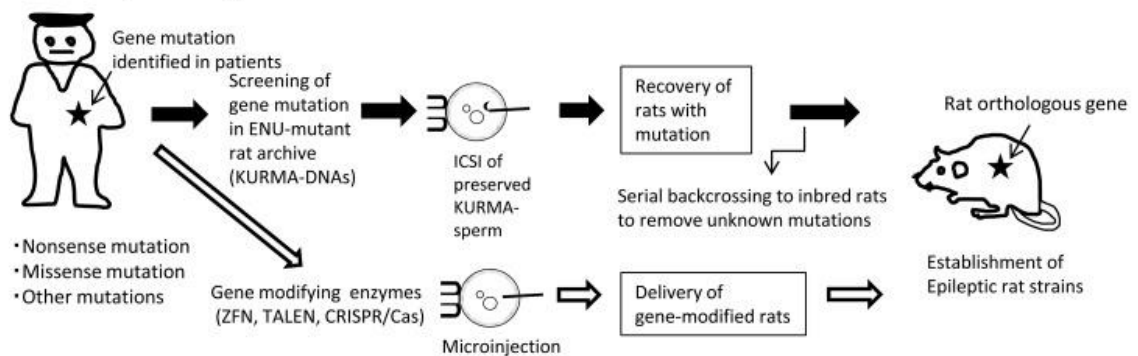
La capacidad para manipular el genoma de los animales ha llevado a la identificación de una diversidad de genes cuya ausencia o modificación puede causar crisis epilépticas. Alternativamente, las estrategias de transfección o técnicas de transgénesis se pueden utilizar para identificar selectivamente genes que codifican canales iónicos voltaje dependientes y canales iónicos activados por ligando. Esta manipulación sugiere que estos genes específicos pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la excitabilidad y facilitar la evaluación de la función del circuito durante las convulsiones (Martín y Pozo, 2006). Una vez que se determina el papel potencial de una proteína en un mecanismo epileptogénico, la expresión del gen que codifica para dicha proteína se puede manipular y se pueden evaluar los efectos sobre la epilepsia. En la

transgénesis los niveles de expresión de un gen se manipulan mediante la construcción de animales transgénicos con sobreexpresión de ciertas especies de ARNm o deleciones de genes específicos que dan lugar a un fenotipo epiléptico (Serikawa et al., 2015). Otras técnicas incluyen la transfección usando la manipulación oligonucleótido antisentido de los niveles de ARNm o varios vectores de expresión (Janson et al., 2001). Estos avances en genética molecular están contribuyendo a comprender los mecanismos subyacentes de control genético de la excitabilidad neuronal y señalar los posibles genes de formas genéticas subyacentes de epilepsia humana. Estas técnicas también proporcionan un valioso modelo para dilucidar cómo el genotipo puede dar lugar a diferentes fenotipos de epilepsia humana (Martín y Pozo, 2006).

### A. Phenotype to gene(s)



### B. Gene to phenotype



**Fig. 6.** Dos rutas utilizadas para desarrollar cepas de ratas epilépticas. KURMA (KyotoUniversityRatMutant Archive); ICSI (intracytoplasmicsperminjection); las flechas negras muestran el proceso utilizado en el desarrollo de ratas epilépticas; las flechas blancas muestran el proceso que se utilizará en un futuro próximo (Tomado de Serikawa et al., 2015).

Cepas de ratas epilépticas obtenidas genéticamente:

A) Establecidos por selección combinada:

Cepa	Modelos/ tipos de convulsiones
GAERS/Mave	Ausencia
WAG/Rij	Ausencia
WER	Ausencia Tónico-clónica
IER/lhr	Tónico-clónica
NER/Kyo	Tónico-clónica
SER/Kyo	Ausencia Tónica Tónico-clónica
TRM/Kyo	Ausencia
GEPR-3, GEPR-9	Audiogénica

B) Generados por mutagénesis química:

- *Phenotype-driven* (promovidos por el fenotipo):

GRY/lhr	Ataxia episódica tipo 2
F344-Adms/Kyo	(ADMS rat) Ataxia episódica tipo 1

- *Gene-driven* (promovidos por el genotipo):

F344-Lgj1 <sup>m1Kyo</sup>	Epilepsia temporal lateral autosómica dominante
F344-Scn1a <sup>m1Kyo</sup>	(Hissrat) Convulsión febril

### 1.6.2 Modelos *in Vitro*

Las técnicas electrofisiológicas *in vitro* se utilizan comúnmente para elucidar el mecanismo de acción de compuestos anticonvulsivos. Las técnicas electrofisiológicas más populares y ampliamente empleadas son los ensayos *patch-clamp* en rodajas de hipocampo y en neuronas individuales. La evidencia

más directa que se obtiene de la electrofisiología del *patch-clamp* sugiere un mecanismo específico a nivel del receptor o canal iónico. Aunque consume mucho tiempo y requiera un trabajo intensivo, la electrofisiología puede proporcionar información muy valiosa sobre la capacidad de un fármaco para modificar un canal iónico o un receptor (Reddy y Kuruba, 2013). Así, estas técnicas electrofisiológicas han estudiado los efectos que este nivel presenta el convulsivante 4-aminopiridina (4-AP), uno de los agentes utilizados en la presente Tesis Doctoral. La 4-AP actúa como un bloqueante de corrientes de K<sup>+</sup>, principalmente de las corrientes transitorias hacia afuera, y actúa sobre las neuronas presinápticas que conducen a la liberación de neurotransmisores. Aunque la 4-AP actúa de manera inespecífica, afectando tanto a la liberación de neurotransmisores inhibitorios como excitatorios, sus acciones convulsivantes están asociadas a la liberación de glutamato a la hendidura sináptica. Cuando se aplica o se inyecta en bajas concentraciones, la 4-AP evoca fácilmente una actividad epileptiforme en modelos *in vivo* e *in vitro*. A diferencia de otros fármacos convulsivos que actúan principalmente por la disminución de la eficacia de la inhibición mediada por GABA, las descargas epileptiformes inducidas por 4-AP se producen a pesar de la presencia de la inhibición sináptica normal o incluso favorecida. Por tanto, se piensa que la 4-AP es una herramienta adecuada para investigar los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en la generación de actividad epileptiforme en condiciones en las que se conserva la inhibición sináptica (Rutecki et al., 1987; Reddy y Kuruba, 2013).

### **1.6.3 Lesiones Focales**

El modelo de lesión por congelación transcortical es un modelo de microgiria cerebrocortical de rata que resulta apropiado para el estudio de los mecanismos que contribuyen a la epileptogénesis asociada a la polimicrogiria humana, una malformación del desarrollo cortical en el que las circonvoluciones son anormalmente pequeñas. Los principales resultados de los experimentos de Jacobs et al. (1999) en la puesta a punto de este modelo animal apuntan a la existencia de circuitos neuronales epileptogénicos aberrantes en el área

adyacente al microgyrius. El aumento de la retroalimentación excitatoria en elementos corticales específicos podría ser uno de los mecanismos involucrados en la epileptogénesis en este modelo de malformación cortical (Jacobs et al., 1999). La participación de los receptores NDMA en la actividad epileptiforme inducida por este tipo de lesión (y eventualmente en esta malformación congénita) queda evidenciada porque ésta queda inhibida de manera reversible y selectiva por la administración de antagonistas NMDA (Jacobs et al., 1999).

#### **1.6.4 Modelos de Kindling**

El fenómeno de kindling o “encendido” descubierto originalmente por Goddard (Goddard et al., 1967), se define como el incremento gradual de la actividad convulsiva (pudiéndose alcanzar generación de convulsiones espontáneas propias de un estado epiléptico) en respuesta a un estímulo inicialmente subconvulsivo cuando éste es aplicado de manera repetida o intermitente. El umbral de convulsión se reduce en el transcurso del kindling (Racine, 1972a; Racine, 1972b; Racine, 1975). Una vez que las crisis se han generalizado, las alteraciones producidas suelen persistir durante meses o años (Goddard et al., 1967). Actualmente, el kindling inducido bien por estimulación eléctrica o química es uno de los modelos de epileptogénesis y de ELT más usados (Dhir, 2012).

##### *Kindling eléctrico*

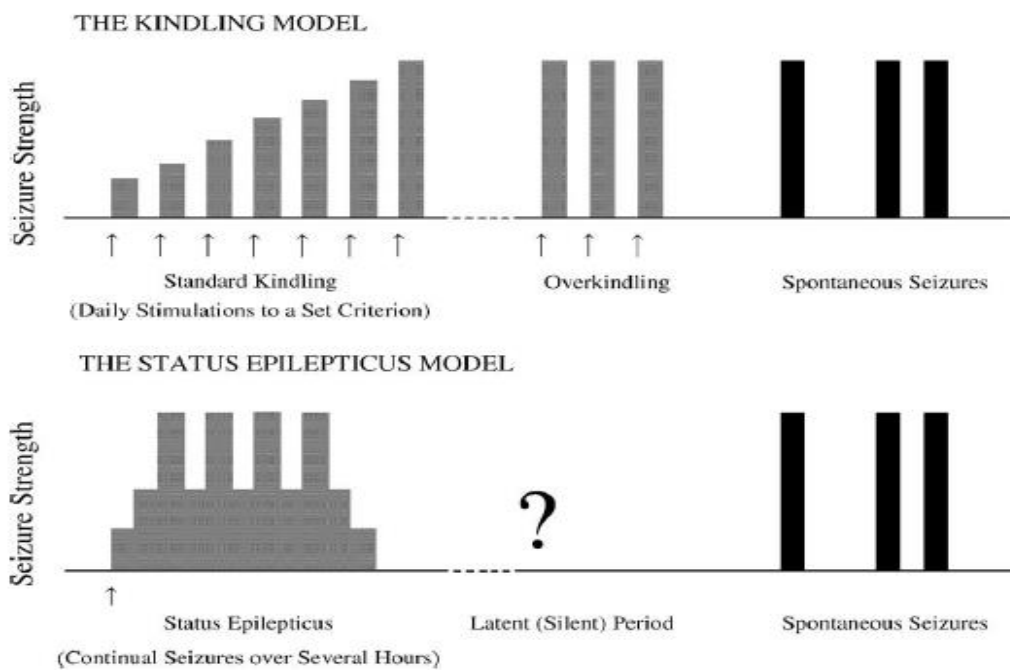
En este caso, el fenómeno de kindling se produce tras la repetición de estímulos eléctricos, en un área específica del cerebro, normalmente mediante la inserción de electrodos en el hipocampo, amígdala y corteza entorrinal, evocando una susceptibilidad progresiva e incrementada a las crisis (Kandratavicius et al., 2014). Se produce una alteración en las propiedades de la excitabilidad neuronal de las células localizadas en estas áreas, provocando una hiperexcitabilidad capaz de generar crisis epilépticas, primero inmediatamente tras la estimulación y más tarde (una vez instaurado el fenómeno de kindling) de forma espontánea. La instauración del kindling es gradual, tiene lugar a través del mecanismo de la

potenciación a largo plazo (LTP) y de procesos de plasticidad neuronal. Así, se ha observado como en este modelo también se produce un incremento de la neurogénesis a nivel del giro dentado (Auvergne et al., 2002) de forma que se producen nuevas neuronas con características electrofisiológicas diferentes de las habituales, lo que podría estar en relación con la formación de circuitos hiperexcitables y el mantenimiento de la actividad epiléptica (Ribak et al., 2000). Desde su descubrimiento por Goddard en 1967, el fenómeno kindling se ha utilizado ampliamente como un modelo animal crónico de ELT. Con alguna excepción, el kindling es ampliamente aceptado como modelo de epilepsia funcional en el que la respuesta neuronal alterada se desarrolla en ausencia de daño morfológico, como el que se observa en muchos otros modelos de epilepsia. Además de su aplicación en la investigación de los mecanismos de la epilepsia, el kindling se ha utilizado para la evaluación preclínica de fármacos antiepilépticos (Cavazos et al., 1994).

En el kindling eléctrico se expresa la respuesta inicial convulsiva focal, principalmente la descarga epileptiforme activa en el sitio estimulado. La única respuesta comportamental durante las primeras etapas del kindling es una respuesta de “congelación” durante la descarga ictal provocada (Morimoto et al., 2004). Con la activación repetida, la respuesta se generaliza hasta el punto de producir convulsiones clónicas bilaterales, conocidas como estado 5 de convulsión (Racine, 1972b). El kindling eléctrico es el tipo de kindling más frecuente. Para el desarrollo de este tipo de kindling es necesario la implantación de un electrodo bipolar en la estructura donde queramos estimular y registrar la postdescarga. El estímulo aplicado es variable, aunque lo más común es un tren de estímulos de entre 1 y 2 s de duración, de pulsos bipolares de 1ms y una frecuencia entre 50 y 100 Hz (Sutula y Ockuly, 2006).

Las ventajas del modelo de kindling para la investigación de epilepsia son claras: es posible una activación focal precisa en áreas cerebrales determinadas; el desarrollo de epileptogénesis crónica se observa de forma fiable; el patrón de propagación y generalización de las convulsiones se controla fácilmente; y los periodos interictales, ictales y postictales son fácilmente manipulables. Sin embargo, también presenta algunas desventajas. Los experimentos de kindling

pueden ser relativamente largos y requieren un trabajo intenso, dado que los electrodos se implantan en el cerebro y se requieren estímulos espaciados en el tiempo. Además, las convulsiones espontáneas no se desarrollan a menos que se aplique un gran número de estimulaciones. Es por ello que si el objetivo es producir convulsiones espontáneas es preferible utilizar el modelo de SE (Morimoto et al., 2004). Las diferencias entre el modelo de kindling y el de SE para la generación de la epileptogénesis se muestran en la Fig. 7.



**Fig. 7.** Desarrollo de epileptogénesis y aparición de crisis espontáneas en el modelo de kindling y en los modelos de SE. Las flechas indican la aplicación del estímulo. Se puede observar que en los modelos de SE, a diferencia del modelo de kindling, existe un periodo silente de duración variable, después de la generación del SE en el que no se observan crisis. Una vez alcanzado el estado de kindling o bien después del periodo silente que tiene lugar en los modelos de SE, tiene lugar la aparición de crisis espontáneas (Tomado de Morimoto et al., 2004).

### Kindling químico

A diferencia del kindling eléctrico, el kindling químico consiste en la administración repetida de agentes farmacológicos que en una única dosis son usualmente subconvulsivos pero que administrados de forma repetida y a largo plazo producen un efecto similar al kindling eléctrico, aumentando la sensibilidad

a la misma pudiendo finalmente desencadenar crisis espontáneas (Diehl et al., 1984; Gilbert y Goodman 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

A los animales se les evalúa la respuesta comportamental y la actividad convulsiva. Sin embargo, durante el kindling químico, los animales no siguen el mismo patrón comportamental que con el kindling eléctrico. Por ello, debemos utilizar escalas comportamentales específicas para cada fármaco. La tasa de animales que desarrollan kindling varía en función del químico usado, la dosis, la duración del tratamiento y el intervalo entre estímulos (Gilbert y Goodman, 2006). Entre los agentes usados se encuentra el antagonista GABAérgico pentiléntetrazol (Bascuñana et al., 2016).

#### **1.6.5 Modelos de Status Epilepticus (SE)**

Existen compuestos químicos que se utilizan comúnmente para inducir SE en roedores. Entre los agentes que se utilizan para generar un SE se encuentran el ácido kaínico, la pilocarpina (junto con su variante litio-pilocarpina que consiste en la administración previa de cloruro de litio) y di-isopropil-fluoro-fosfato. Si bien cada uno de estos compuestos presenta características propias, se han venido utilizando para caracterizar la fisiopatología de la epilepsia y evaluar intervenciones terapéuticas. Estos compuestos químicos al actuar potenciando la neurotransmisión glutamatérgica excitatoria o inhibir la GABAérgica son capaces de inducir convulsiones e incluso llegar a generar un SE. También el desencanamiento de convulsiones puede lograrse por hiperactivación de la transmisión colinérgica, bien por estimulación directa de los receptores muscarínicos centrales (pilocarpina) o de forma indirecta por inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa (di-isopropil-fluoro-fosfato), enzima encargada de la degradación de la acetilcolina (Reddy y Kuruba, 2013).

### Ácido Kaínico

Los receptores de kainato son receptores ionotrópicos de glutamato tetraméricos compuestos por la combinación de cinco subunidades, GluK1-GluK5. Estos receptores están estructuralmente relacionados con los receptores AMPA al presentar una mayor permeabilidad al  $\text{Na}^+$  y dar lugar a potenciales postsinápticos excitatorios rápidos, en contraste con los receptores NMDA que presenta una mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y genera potenciales excitatorios lentos. Aunque el ácido kaínico es una potente neurotoxina conocida por inducir convulsiones agudas a través de la activación de receptores de kainato, el papel real de estos receptores en la fase crónica clínicamente relevante de la ELT ha sido difícil de determinar (Crépel y Mulle, 2015).

Este modelo tiene 3 etapas principales: el SE, el periodo latente y el desarrollo de crisis epilépticas espontáneas. Esta última etapa es normalmente permanente (Dudek et al., 2006). La administración intracerebroventricular (del orden de  $0.01\mu\text{g}$ - $1\mu\text{g}$ ) o sistémica (8-12 mg/kg, sc o i.p) de ácido kaínico en ratas, deriva de las descargas epileptiformes originarias de estructuras límbicas y propagadas a otras áreas del cerebro (Dudek et al., 2002). El ácido kaínico provoca grandes daños en las numerosas regiones cerebrales, tales como hipocampo (especialmente CA1), amígdala, corteza piriforme, corteza entorrinal, septum y tálamo medial. En caso de que el animal sobreviva al SE y haya pasado el periodo silente, tiene lugar la aparición de convulsiones espontáneas intensas y persistentes asociadas al daño neuronal, similar al encontrado en el tejido epileptógeno humano. El modelo de epilepsia por kainato es fácil de reproducir y no requiere equipos sofisticados (Reddy y Kuruba, 2013).

### Pilocarpina

El modelo de SE por pilocarpina es un modelo animal bien establecido y comparte muchas de las características del ELT humano (Löscher y Schmidt, 1988; Martín y Pozo, 2006). En 1983, Turski describió que la pilocarpina, agonista colinérgico muscarínico, tanto administrado mediante inyección intra-amígdala, intrahipocampal o intraperitoneal inducía convulsiones límbicas (Turski et al., 1983; Turski et al., 1984; Turski et al., 1986). Con respecto a la

administración sistémica de pilocarpina, dosis de 400 mg/kg en rata y de 300-350 mg/kg en ratón inducen en cuestión de minutos una clara respuesta convulsiva. Así, se observan una secuencia de alteraciones conductuales, como mirada fija, automatismos gustativos límbicos y convulsiones motoras límbicas que desarrollaban progresivamente SE en el sistema límbico y que duraban varias horas. Los cambios inducidos por la pilocarpina en la actividad cerebral aparecen por primera vez en el hipocampo, seguido de la amígdala y la corteza cerebral. Sin embargo, más tarde se demostró que las alteraciones iniciales se producían en el cerebro anterior ventral. Esto puede explicar la ausencia de movimientos de cabeza y sacudidas de perro mojado (“*wet dog shakes*”) al comienzo del SE inducido por pilocarpina. Dentro de las 24 h de la inyección de pilocarpina, las convulsiones desaparecen y la actividad cerebral regresa a la normalidad (Turski et al., 1983; Clifford et al., 1987). El pretratamiento con escopolamina y diacepam son capaces de prevenir las convulsiones inducidas por pilocarpina (Turski et al., 1984). Este modelo permite estudiar la generación y propagación de la actividad convulsiva en el hipocampo y la amígdala. El inicio de las convulsiones se debe a la activación del sistema colinérgico porque el pretratamiento con atropina o escopolamina, antagonistas muscarínicos con potente acción central, previenen la aparición de convulsiones. Aunque el inicio del SE sea debido a una hiperactivación colinérgica, en cambio la continuidad de la actividad convulsiva, parece probablemente causada por un mecanismo de activación glutamatérgica e inhibición GABAérgica (Reddy y Kuruba, 2013), de manera que la administración de diacepam o barbitúricos (fenobarbital o pentobarbital) son capaces de prevenir y finalizar la actividad convulsiva. Por otra parte, la pérdida neuronal y la actividad convulsiva espontánea posterior son fenómenos secundarios ligados a la liberación de glutamato y su actividad excitotóxica (Clifford et al., 1987).

La inyección de dosis elevadas de pilocarpina aumenta la actividad cerebral y provoca convulsiones y SE. La pilocarpina induce SE y causa daño neuronal máximo tras 24-72 h (Reddy y Kuruba, 2013). La pilocarpina induce daños importantes en las siguientes regiones del cerebro: hipocampo, amígdala, corteza cerebral incluyendo la piriforme y la entorrinal, septum, tálamo medial y sustancia negra (Turski et al., 1983; Honchar et al., 1983; Turski et al., 1984;

Turski et al., 1986). El extenso daño cerebral se caracteriza por la presencia de cuerpos neuronales disminuidos con neuropilos edematosos (denso entramado de terminaciones axónicas, dendritas y prolongaciones de células de la neuroglia, que se encuentra en la materia gris del cerebro y la médula espinal) presentes en el bulbo olfatorio anterior, corteza piriforme y corteza entorrinal. La amígdala y el hipocampo son muy sensibles al daño generado por el SE por administración de pilocarpina. La mayor parte del daño encontrado en el hipocampo dorsal tiene lugar en las áreas CA3, CA1 y en la zona del hilus/giro dentado, siendo la pérdida de interneuronas hilares es una marca distintiva en el modelo de SE por pilocarpina (Mello y Covolan, 1996; Covolan y Mello, 2000; Covolan et al., 2000). La pérdida de células neocorticales se produce principalmente en la capa 2 y 3, con alguna pérdida de células en la capa 5 (Reddy y Kuruba, 2013). El pars reticulata de la sustancia negra aparece dañado extensamente en este modelo (Clifford et al., 1987). El SE inducido por pilocarpina conduce más tarde al desarrollo de convulsiones límbicas espontáneas y a la aparición de fibras musgosas en el giro dentado, características de la esclerosis del hipocampo (Reddy y Kuruba, 2013).

El modelo es sencillo de reproducir y requiere un equipo poco sofisticado. El SE inducido por pilocarpina es similar a SE inducido por kainato, sin embargo, estos modelos difieren en el sitio de cambios de la actividad cerebral inicial (Reddy y Kuruba, 2013). Las áreas afectadas por la pilocarpina y el patrón de daño neuronal son similares a las afectadas por el modelo de ácido kaínico, sin embargo, la pilocarpina provoca mayor daño neocortical (Buckmaster et al., 2002; André et al., 2007). Al igual que en el modelo de ácido kaínico, el SE inducido por pilocarpina conduce al desarrollo de convulsiones espontáneas motoras límbicas y a la aparición de fibras musgosas en el giro dentado (Mello et al., 1993). La reorganización sináptica del hipocampo y el surgimiento de fibras musgosas constituyen una característica común de los tejidos epileptógenos humanos (Sutula et al., 1989; Houser et al., 1990; Babb et al., 1991). El modelo de pilocarpina se suele utilizar para examinar la relación entre reorganización sináptica de las fibras musgosas y la actividad convulsiva espontánea (Mello et al., 1993; Buckmaster y Haney, 2012).

## Litio-Pilocarpina

El pretratamiento de ratas con cloruro de litio 3 mEq/kg (127 mg/kg, i.p.) 16-24 horas antes de la administración de pilocarpina, permite reducir la dosis de ésta última a 30 mg/kg. Esta reducción en la dosis de pilocarpina se traduce en una menor mortalidad y un mayor porcentaje de animales que presentan SE (Clifford et al., 1987). El resto de características son similares al SE inducido con altas dosis de pilocarpina (Reddy y Kuruba, 2013), por lo que ambos modelos se consideran similares.

En definitiva, se puede concluir que los diferentes modelos animales han proporcionado datos muy valiosos para especificar los mecanismos fisiopatológicos de las diversas formas de epilepsia. Sin embargo, se plantea la cuestión sobre cuál de estos resultados experimentales son relevantes para el cerebro epiléptico humano. Por otra parte, el desarrollo de la cirugía hace posible estudiar directamente las propiedades funcionales del tejido cerebral humano *in vitro* y analizar los mecanismos subyacentes de las convulsiones y de la epileptogénesis. Los estudios sobre el tejido humano son necesarios para validar los datos obtenidos en modelos animales. Además, estos estudios permiten el desarrollo de fármacos antiepilépticos con nuevos mecanismos de acción y que podrían ser eficaces en el tratamiento de las epilepsias resistentes a fármacos (Laschet et al., 2008).

## **1.7 La tomografía por emisión de positrones en la epilepsia**

### **1.7.1 Técnica de la tomografía por emisión de positrones**

La tomografía por emisión de positrones es una técnica de imagen molecular *in vivo* (PET, del inglés, *positron emission tomography*). La PET es una técnica mínimamente invasiva que produce imágenes de alta resolución de la función fisiológica. Para ello, esta técnica recurre a la administración de ligandos o fármacos marcados con isótopos emisores de positrones. Estos radiotrazadores

se administran normalmente vía intravenosa para a continuación distribuirse en los distintos compartimentos del organismo. Debido a su naturaleza radiactiva, la captación tisular de estos trazadores puede ser localizada y cuantificada. Por ello, la PET permite estudiar, visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos: determinaciones de perfusión de la sangre, transporte de aminoácidos y de procesos metabólicos, así como la cuantificación de la densidad de receptores, cinética de unión receptor-ligando o enzima-sustrato. Los radionúclidos emisores de positrones no están presentes en la Naturaleza, debido a su periodo de semidesintegración es ultra-corto, por lo que para su obtención se requiere un acelerador de partículas o ciclotrón. En su proceso de estabilización o decaimiento (“*decay*”), el núcleo emite un positrón (Turkington, 2001). El positrón emitido viaja una distancia corta (rango de milímetros), combinándose con un electrón del medio formándose un positronio. Este sistema altamente inestable decae transformándose la masa de ambas partículas (electrón y positrón) en energía en forma de 2 fotones gamma de muy alta energía (proceso de aniquilación), cada uno con una energía de 511 keV que son emitidos simultáneamente en direcciones opuestas (antiparalelos), pudiendo salir del organismo y ser detectados en el exterior (Verel et al., 2005).

Los radionucleidos emisores de positrones son isotopos de elementos comunes en el organismo, por lo que son apropiados para realizar estudios *in vivo*. Además, su reducido periodo de semidesintegración (Tabla 1) hace posible, la realización de múltiples estudios en el mismo sujeto. De los diferentes radionúclidos, el  $^{18}\text{F}$  es el más utilizado por su relativa alta semivida, lo que permite la distribución (y utilización) de los radiofármacos fluorados a sitios relativamente alejados de la radiofarmacia. El resto, debido a su semivida extremadamente corta están obligados al empleo del trazador “*on site*”.

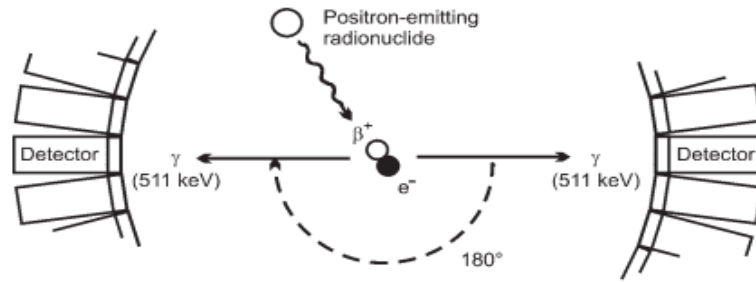
<b>Radioisótopo</b>	<b>Semivida (min)</b>	<b>Emisión (<i>decay</i>)</b>	<b>Energía de positrones (rango -MeV-)</b>
<sup>15</sup> O	2,03	$\beta^+$	5-21
<sup>13</sup> N	9,97	$\beta^+$	10-24
<sup>11</sup> C	20,4	$\beta^+$	6-25
<sup>18</sup> F	109,8	$\beta^+$	3-20

**Tabla 1.** Radioisótopos emisores de positrones más utilizados en PET.

En definitiva, el fundamento de la PET consiste en marcar con un radioisótopo emisor de positrones una molécula (trazador), cuyo comportamiento se desea seguir o “trazar”. De este modo, en función del radiotrazador utilizado, es posible estudiar distintos procesos biológicos. Por ejemplo, el isótopo <sup>15</sup>O se emplea en combinación con H<sub>2</sub>O como trazador para estudiar la perfusión cerebral, o el <sup>11</sup>C con flumazenilo para examinar los receptores cerebrales GABA. En los estudios presentes en esta Tesis Doctoral se empleó el análogo de glucosa marcado con <sup>18</sup>F, [<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglucosa ([<sup>18</sup>F]FDG) cuya cuantificación permite evaluar la actividad metabólica cerebral dependiente de la glucosa.

### **1.7.2 El tomógrafo PET**

El sistema detector se basa en las características del proceso de aniquilación, la detección de dos fotones simultáneos de 511 KeV emitidos sentidos opuestos (180°). La disposición de los detectores (Fig.8) permite la detección de los dos fotones producidos en la aniquilación. Los detectores están conectados a un sistema de coincidencia que determina aquellas detecciones que se producen simultáneamente y que presumiblemente proceden de un mismo suceso de aniquilación (“colimación electrónica”).



**Fig. 8.** Esquema de detección de los fotones gamma antiparalelos generados en el proceso de aniquilación electrón-positrón (Verel et al., 2005)

Todos los pares de fotones con energías que caen dentro de la ventana de energía de adquisición PET (típicamente 350 a 650 keV) y que se detectan en las coincidencias dentro de un período de tiempo determinado (ventana de tiempo coincidencia, aproximadamente 15,5 ns) se llaman coincidencias y se le asocian a una línea de respuesta “LOR” (del inglés, *line of response*) a lo largo de la cual la aniquilación tiene lugar.

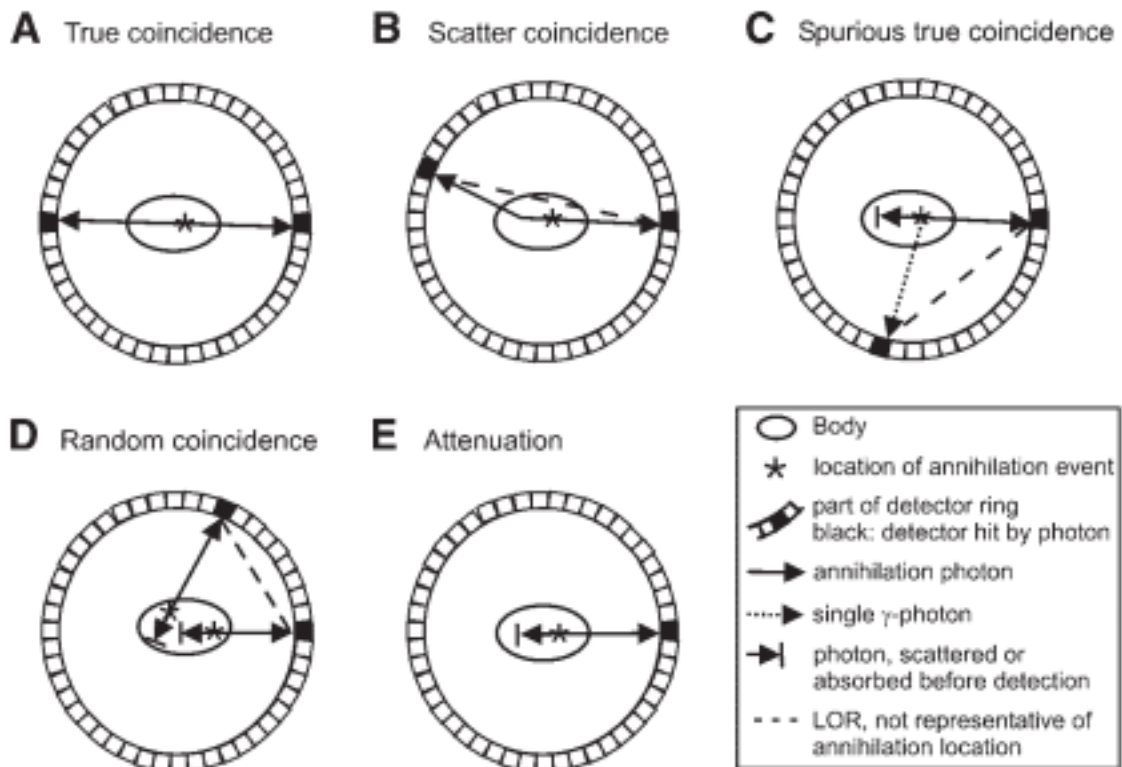
Las LOR se agrupan para obtener los planos de la imagen. En el proceso de reconstrucción tomográfica de las imágenes se utilizan procesos iterativos-estadísticos. Entre los algoritmos de reconstrucción PET mas utilizados se encuentran el MLEM (“*maximum likelihood expectation maximization*”) y OSEM (“*ordered-subsets expectation maximization*”).

A partir de las imágenes tomográficas obtenidas es posible realizar medidas cuantitativas de concentración del radiofármaco en el interior del organismo. La precisión de la cuantificación depende de diversos factores entre los que se encuentran: características técnicas de la cámara PET, tales como número de anillos detectores, composición de los cristales detectores, resolución del sistema, capacidad de discriminar la profundidad de interacción (“*depth of interaction*”), tiempo de vuelo de los fotones (“*time of flight*”) PET, así como la existencia de coincidencias accidentales y de la dispersión, la atenuación de los fotones y el tiempo muerto.

La tasa bruta de coincidencias, además de verdaderas coincidencias puede incluir otras coincidencias provenientes bien de fenómenos de dispersión

("scatter"), o de coincidencias accidentales debidas al azar ("random") y coincidencias verdaderas espurias (cuando un fotón de aniquilación se registra junto con un fotón gamma emitido del mismo evento decaencia y con una energía que cae dentro de la ventana de energía adquisición PET). La existencia de coincidencias de dispersión y coincidencias accidentales no son representativas de la ubicación de la aniquilación y degradan la calidad de imagen. Además, una proporción importante de los fotones de aniquilación no será detectada como resultado de la atenuación y el tiempo muerto. La atenuación es la pérdida de verdaderas coincidencias a través de procesos de absorción Compton y dentro del tejido, causando que uno o ambos de los fotones de aniquilación queden fuera de la ventana de energía de adquisición PET o de la ventana del tiempo de coincidencia. Las pérdidas de tiempo muerto son el resultado de la incapacidad del sistema para procesar un número muy alto de fotones al mismo tiempo.

Las pérdidas de tiempo muerto pueden minimizarse mediante el uso de un sistema con muchos detectores independientes, cristales de centelleo rápido, y mediante mejoras en la electrónica con el fin de permitir un procesamiento rápido. Para llegar a una imagen cuantitativa, los datos de PET en bruto deben ser corregidos por los efectos perturbadores citados (Verel et al., 2005). Finalmente, detecciones múltiples pueden ocurrir cuando tres o más fotones son detectados simultáneamente. Con el fin de evitar ambigüedad en la localización del evento, estas detecciones múltiples son descartadas por el sistema.



**Fig. 9.** (A) Coincidencia verdadera. Dos fotones de aniquilación, emitidos por un mismo evento de aniquilación, viajan en direcciones opuestas y sin interacción con el organismo y son detectados por detectores opuestos. (B) Coincidencia *scatter*. Un fotón de aniquilación viaja sin interacción y otro de los fotones de aniquilación es desviado a causa de la dispersión en el organismo. (C) Coincidencias espurias verdaderas. Un fotón gamma se detecta de forma simultánea con la aniquilación de fotones (u otro fotón gamma), ambos emitidos por un mismo evento de decadencia. (D) Coincidencia *random*. Dos fotones de aniquilación (emitidos por 2 eventos de desintegración separados se detectan por casualidad dentro de la ventana del tiempo de coincidencia. (E) Atenuación. Uno (o ambos) fotones de aniquilación no se detectan como resultado de la dispersión o absorción en el organismo. En las coincidencias *scatter*, espurias y *randoms* la LOR estimada por el sistema no es representativa de la ubicación aniquilación (B-D). Cuando tres o más fotones son detectados en la misma ventana temporal, son rechazados por la electrónica de coincidencia de PET (Tomado de Verel et al., 2005).

Un componente clave de un sistema de PET es la detección de los rayos gamma coincidentes asociados con el decaimiento del positrón. (Lewellen, 2010). Los detectores son la parte más importante y más cara del sistema, ya que son los responsables de la localización y cuantificación de los eventos generados. Un sistema detector consta de cristales inorgánicos de centelleo, que absorben los fotones de 511 KeV y los convierte en pulsos de luz. Estos cristales están

acoplados a fotodetectores muy sensibles, acoplados a su vez en fotomultiplicadores, y ensamblados en módulos. Los módulos son colocados formando un anillo que rodean al sujeto (Turkington y Coleman, 2002; Levin, 2005). El radiotrazador emisor de positrones se introduce en el organismo del sujeto en cantidades traza. Habitualmente, después de un período apropiado (“tiempo de incorporación”), el sujeto se coloca en la cámara PET. Los fotones que son absorbidos por los detectores crean pulsos de luz de centelleo. Los pulsos de luz se convierten en señales electrónicas en los fotomultiplicadores acoplados a la matriz de cristal. Básicamente, cuando los fotones del visible inciden con el fotocátodo de un fotomultiplicador, éste convierte la energía de la luz incidente en electrones emitidos al vacío, los cuales son enfocados hacia los dínodos, donde son multiplicados en un proceso de emisión secundaria. Al final, la señal de salida amplificada se obtiene en el ánodo. Se utiliza una media ponderada de las alturas de pulso para identificar qué elemento de cristal fue alcanzado. La altura total del pulso de centelleo creado para ese evento representa la energía del fotón absorbido. Esta energía se compara con un ajuste de la ventana de energía fotopico predeterminado para que el cristal identificado. Si la altura total del pulso evento está dentro de la ventana, entonces el evento es aceptado, y la ubicación de ese cristal dentro del módulo, se registra la localización del módulo dentro del sistema, y un sello de tiempo para ese evento. Por supuesto, los fotones que se absorben en el cuerpo o no se dirigen a los detectores no contribuyen al conjunto de datos (Levin, 2005). Para su posterior procesamiento, las coincidencias se almacenan en un sinograma, que es una representación gráfica que permite guardar las LOR entre los detectores.

### **1.7.3 Cuantificación de las imágenes PET**

A partir de las imágenes tomográficas se pueden llevar a cabo medidas de la concentración de un radiofármaco en el interior de los diferentes órganos. La PET es una técnica muy sensible que permite determinar in vivo concentraciones inferiores a 1 picomolar en los tejidos. Esto es posible por la elevada actividad específica (del orden de varios Ci/nmol) con la que es posible sintetizar los radiotrazadores y la creciente sensibilidad de los sistemas de detección. Existen

varios factores que afectan a la cuantificación. Tal como se ha mencionado en el apartado anterior, los principales factores que determinan una correcta cuantificación son la atenuación de los fotones gamma, la existencia de coincidencias accidentales y de la dispersión, el tiempo muerto y la resolución y sensibilidad del equipo PET. En contraste con la clínica, cuando se adquieren imágenes de animales pequeños, es cuestionable si la atenuación y las coincidencias dispersas necesitan ser corregidas, ya que la cantidad de tejido que atraviesa la radiación gamma es muy pequeña. En caso de llevarse a cabo tales correcciones, los algoritmos de corrección de atenuación y *scatter* se basan en la disponibilidad de información estructural, la cual puede ser obtenida por el escáner TAC usualmente presente en los equipos PET actuales (Chow et al., 2005; Vanhove et al., 2009).

La resolución espacial afecta a la cuantificación significativamente debido al efecto de volumen parcial. El efecto de volumen parcial introduce un error en la estimación de la concentración del radiotrazador y se debe a la limitada resolución de los equipos de PET. Consiste en la pérdida de actividad aparente en regiones pequeñas (del orden de la resolución del sistema). Depende del tamaño y de la forma de objeto a escanear (Hoffman et al., 1979) y de la concentración relativa de radiotrazador en la estructura con respecto a la de los alrededores (apareciendo más frecuentemente cuando alrededor de la región la actividad es nula). A su vez, la pérdida de la actividad de la región afectada por el efecto de volumen parcial, implica un incremento de la actividad en las regiones adyacentes a la misma (fenómeno de "*spillover*"). Aunque existen métodos para la corrección del efecto de volumen parcial, este efecto se minimiza si el tamaño del objeto es relativamente grande en comparación con la resolución espacial del sistema o si se incrementa la resolución del mismo.

Existe otro efecto que influye en la calidad de la imagen. La detección de coincidencias aleatorias, incrementa el ruido de fondo de la imagen. La detección y substracción de las coincidencias aleatorias de los datos adquiridos se llevan a cabo mediante software (Brasse et al., 2005). Por todo ello, llevar a cabo la cuantificación de imágenes PET requiere reconstruir las imágenes teniendo en

cuenta las correcciones por atenuación, *scatter*, *random*, *decay*, tiempo muerto y por efecto de volumen parcial si se encuentran disponibles.

La cuantificación de la captación tisular del radiotrazador puede llevarse a cabo mediante determinaciones absolutas o relativas, normalizando dicha acumulación en función de la dosis inyectada, peso del sujeto o volumen de la región analizada o en función de la captación por una región de referencia. En los estudios [<sup>18</sup>F]FDG-PET, el valor de captación estandarizado (SUV; *standardized uptake value*) es el parámetro más en utilizado actualmente (Byrnes et al., 2014; Deleye et al., 2014). Este parámetro semicuantitativo se obtiene en función de la concentración del radiotrazador en la estructura determinada por el escáner (en kBq/ml), normalizado a la dosis inyectada (corregida al momento de la adquisición tomográfica, en kBq) y al peso del sujeto (g).

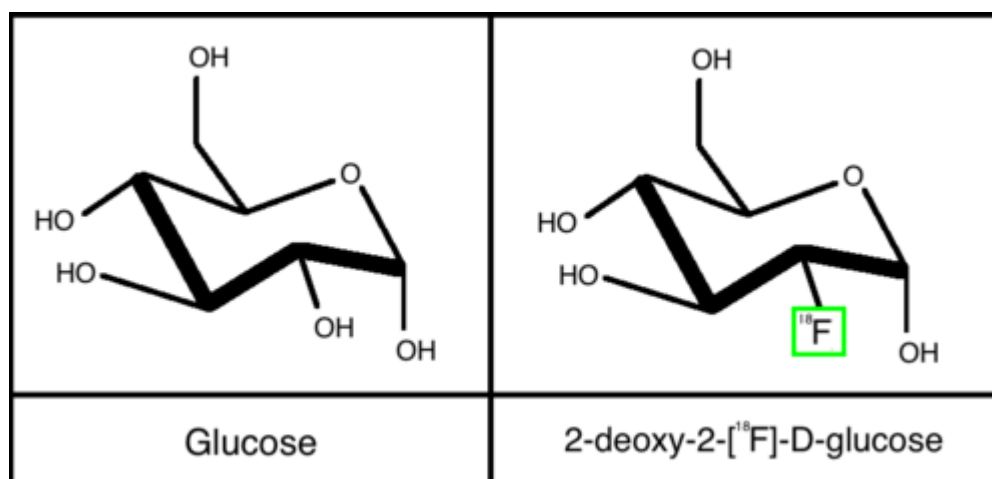
$$SUV = \frac{\text{Captación (kBq/cm}^3\text{)}}{\text{Dosis inyectada (kBq)/Peso corporal (g)}}$$

En caso de que el trazador se distribuyera uniformemente por todo el cuerpo (y asumiendo que la densidad del sujeto es de 1 g/ml), entonces se obtendría un valor de SUV = 1. En cambio, regiones con alta captación presentarían valores de SUV > 1.

#### **1.7.4 18-Flúor-deoxiglucosa ([<sup>18</sup>F]FDG)**

Actualmente, la PET tiene su aplicación clínica más importante oncología por lo que la cuantificación de la actividad metabólica de tumores permite distinguir lesiones benignas o malignas y entre una buena o mala prognosis. Para ello, se utiliza como trazador PET un análogo de glucosa 18-Flúor-deoxi-glucosa ([<sup>18</sup>F]FDG). Debido a sus características, a la rapidez de su síntesis y a la posibilidad de transportar este radiofármaco desde el centro productor hasta los

centros equipados con un tomógrafo PET debido a la relativa elevada semivida del  $^{18}\text{F}$  en comparación con el resto de isótopos emisores de positrones (Tabla 1), ha hecho que la  $^{18}\text{F}$ FDG no se limite a oncología si no que se emplee con mayor en el estudio de patologías muy diversas.



**Fig. 10.** Comparación de las estructuras químicas de la glucosa (izquierda) y de la  $^{18}\text{F}$ FDG. Como se puede observar el grupo hidroxilo de la D-glucosa ha sido sustituido por un átomo de flúor-18 en la molécula de  $^{18}\text{F}$ FDG.

La  $^{18}\text{F}$ FDG utiliza los mismos transportadores que la glucosa (GLUT) para entrar en el interior celular. De forma similar a la glucosa, una vez dentro de la célula se fosforila en el carbono 6 por acción de la hexoquinasa, formándose  $^{18}\text{F}$ FDG-6P. A diferencia de la Glucosa-6P, este compuesto no es un sustrato adecuado para el resto de la vía glucolítica por lo que queda atrapado en el interior celular al presentar una limitada desfosforilación por la enzima Glucosa-6-fosfatasa (Rudroff et al., 2015). De este modo, la captación de  $^{18}\text{F}$ FDG en las células es proporcional a su nivel metabólico. Al tiempo que la  $^{18}\text{F}$ FDG es atrapada en la célula, tiene lugar la desintegración nuclear del radioisótopo  $^{18}\text{F}$ , que da lugar a la liberación de un positrón y su posterior aniquilación, haciendo que su ubicación pueda ser localizada por la cámara PET tal como se ha descrito en los apartados anteriores.

### 1.7.5 PET y epilepsia

#### Humanos

Hipometabolismo en el lóbulo temporal ipsilateral es una característica de los pacientes con ELT. Así se ha encontrado una reducción del metabolismo cerebral en la región epileptiforme en el 60-90% de los pacientes (Breier et al., 1997; Casse et al., 2002). En los pacientes con epilepsia del lóbulo extratemporal, la [<sup>18</sup>F]FDG-PET es capaz de localizar correctamente el foco epiléptico en el 67% de los pacientes (Casse et al., 2002). No se conoce la causa del hipometabolismo que tiene lugar en los periodos interictales. Aún así, ha sido atribuida a factores tales como la pérdida neuronal, la desaferentización o la reducción en la densidad sináptica (Goffin et al., 2008). En la evaluación prequirúrgica de la epilepsia médicamente refractaria, el valor diagnóstico de la [<sup>18</sup>F]FDG-PET es especialmente ventajosa para los pacientes con resultados aparentemente normales de RMN cerebral. En estos casos, la [<sup>18</sup>F]FDG-PET posee una sensibilidad diagnóstica global del 44% en la detección de sustratos epileptógenos sin lesión. Cuando la [<sup>18</sup>F]FDG-PET se lleva a cabo durante o poco después de un ataque de epilepsia, revela a menudo patrones complejos tanto de hipometabolismo como de aumento de la actividad metabólica. Por tanto, se debe tener precaución para evitar la aparición de crisis cerca del momento de la inyección de la [<sup>18</sup>F]FDG que pudiera inducir una eventual alteración de la medida de la actividad metabólica. A su vez, y debido al tratamiento farmacoterapéutico de los pacientes diagnosticados de epilepsia, se debe tener en cuenta dicha circunstancia. Así, se ha descrito que los fármacos antiepilépticos pueden disminuir las tasas metabólicas de glucosa, por lo que en algunos casos puede ser necesario la cuantificación de la actividad metabólica puede verse afectada. En estos casos se ha recomendado analizar la tasa metabólica normalizada a todo el metabolismo del cerebro (Haneef y Chen, 2014).

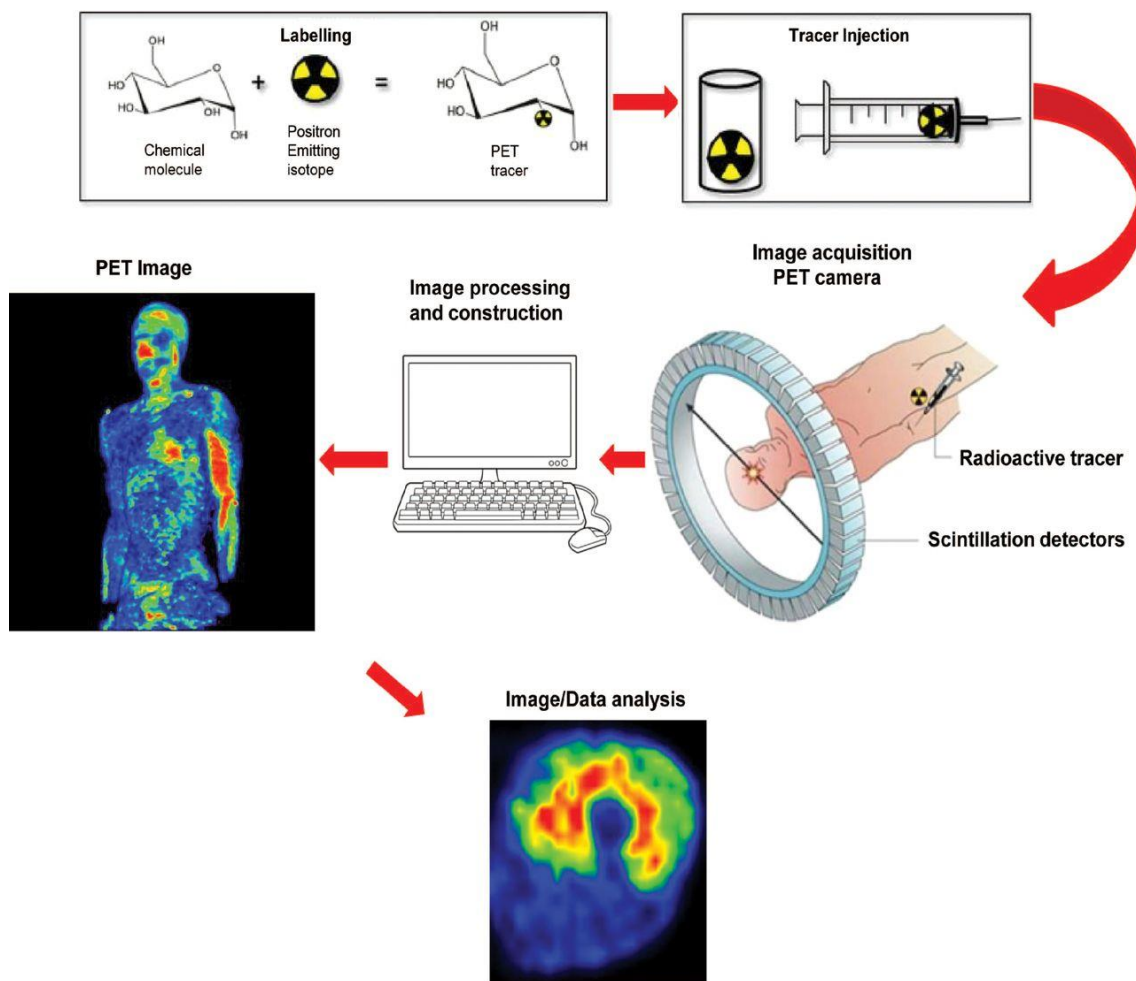
### Modelos animales

La [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET ha sido utilizada con el fin de evaluar las eventuales alteraciones metabólicas que tienen en modelos experimentales de ataques y de epilepsia. Así, hipometabolismo en áreas temporales ha sido repetidamente encontrado en estos modelos, de forma análoga al hipometabolismo encontrado en los periodos interictales en pacientes epilépticos. De los diferentes modelos estudiados mediante neuroimagen metabólica PET se incluyen los modelos por administración de ácido kaínico, pilocarpina (sola o junto con litio), kindling eléctrico o inducido por administración intermitente de pentiléntetrazol (Jupp et al., 2007a; Jupp et al., 2012; Virdee et al., 2012; Bascuñana et al., 2016)

El modelo de SE por administración pilocarpina en ratas ha sido de especial interés debido a que comparte los aspectos temporales y desarrollo de la ELT humano y, por lo tanto, ofrece la ventaja de permitir la evaluación de la línea de base, el desarrollo y estados epilépticos crónicos. A pesar de los diferentes parámetros usados para la cuantificación de la actividad metabólica (SUV, actividad normalizado a cerebelo o mediante *statistical parametric mapping* – SPM-), una intensa reducción de la actividad metabólica cerebral en la fase silente ha sido repetidamente encontrada (Goffin et al., 2009, Guo et al., 2009, Lee et al., 2012).

Una similar reducción del metabolismo cerebral ha sido descrita en los modelos de kindling. Así, en estudios de kindling por estimulación eléctrica de la amígdala se encontró un descenso en la captación de glucosa en el hipocampo ipsilateral respecto al hipocampo contralateral en los animales con kindling (Jupp et al., 2007a). Compartiendo este mismo comportamiento hipometabólico, una temprana reducción de la actividad metabólica hipocampal tiene lugar en las primeras fases de kindling químico por administración del antagonista GABAérgico pentiléntetrazol, lo que sugiere una capacidad predictiva del proceso de kindling (Bascuñana et al., 2016). Una vez finalizado el protocolo de kindling, aquellos animales que mostraron un comportamiento convulsivo, este hipometabolismo se extendió posteriormente de forma generalizada a la mayor parte de las regiones cerebrales.

En definitiva, la PET permite representaciones funcionales de diversos aspectos de la actividad cerebral. Dependiendo del trazador radionuclido utilizado, la PET se ha aplicado con éxito para estudiar la utilización de glucosa local ( $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ) y la cuantificación de determinados receptores como, por ejemplo:  $[^{11}\text{C}]$  flumazenilo para la cuantificación del receptor GABA;  $[^{18}\text{F}]2'$ -metoxifenil-(N-2'-piridinil)-p-fluoro-benzamidoetiipiperazina ( $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ ) para receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>;  $[^{18}\text{F}]$ faliprida para receptores de DA; y ligandos opioides para receptores opioides (Haneef y Chen, 2014).



**Fig. 11.** Principios y procedimientos básicos de la PET (Tomado de Rudroff et al., 2015).

## ***2 OBJETIVOS***

---



El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la implicación de la modulación farmacológica de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica central en las alteraciones comportamentales, metabólicas y neuroquímicas inducidas por el modelo de litio-pilocarpina de SE y el modelo de convulsiones agudas por 4-AP.

Para alcanzar este objetivo general se han diseñado experimentos en los que se ha estudiado **los cambios metabólicos y diversos marcadores de daño neuronal asociados al modelo de SE litio-pilocarpina**. Además estudiaron dichas alteraciones en tres condiciones:

- Estudiar los **efectos del tratamiento con el inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS) fluoxetina** durante 7 días, 4 días antes del inducir el SE de litio-pilocarpina y 2 días después del SE.
- Estudiar el efecto de **la depleción de 5-HT** por administración subaguda de *p*-clorofenilalanina (PCPA), inhibidor de la enzima triptofanhidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de 5-HT.
- Estudiar el efecto del **tratamiento agudo con el antagonista selectivo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>, SCH23390** en las alteraciones comportamentales, metabólicas y neurológicas a este modelo de SE

Adicionalmente, y en relación al modelo de convulsiones por administración 4-AP, se exploraron:

- **Las eventuales alteraciones, tanto metabólicas como neuroquímicas**, desencadenadas por las convulsiones este compuesto despolarizante.
- También se investigó **la implicación del sistema serotoninérgico cerebral en este modelo de crisis**. En este sentido, se evaluó el efecto de un tratamiento subagudo de fluoxetina de 7 días de duración en los cambios neurológicos asociados a este modelo agudo.

Como herramienta esencial en la presente Tesis Doctoral, la actividad metabólica regional cerebral se ha evaluado mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET) con 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucosa ([<sup>18</sup>F]FDG). La PET es una técnica de neuroimagen mínimamente invasiva que permite la realización de estudios longitudinales *in vivo* de diferentes aspectos funcionales. En nuestro caso, la administración del radiotrazador [<sup>18</sup>F]FDG permitió la evaluación del metabolismo como índice de deterioro cerebral asociado a la epileptogenesis.

## ***3 MATERIAL Y MÉTODOS***

---



### 3.1 Animales de experimentación

En los distintos estudios se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Harlan Ibérica o Charles River laboratories, Francia), de aproximadamente unos 250-300 g de peso al inicio de cada estudio. Los animales fueron mantenidos en el animalario del CAI de Cartografía Cerebral en condiciones controladas tanto de temperatura (temperatura  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y de humedad (humedad relativa del 40 al 60%). El ciclo de luz-oscuridad se mantuvo constante con 12 horas luz/12 horas oscuridad (luces encendidas de 8:00 h a 20:00h). Las ratas se estabularon en jaulas de dimensiones estándar (2 ratas/jaula) en un rack ventilado (Tecniplast, Buggiati, Italia). Finalmente, el acceso de los animales al agua y alimento fue *ad libitum*, excepto el día anterior a la prueba de PET, en el que se mantuvieron en ayunas durante al menos 12 horas, con el fin de evitar una posible interferencia de la glucemia en la captación tisular del radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]FDG.

Los procedimientos con animales utilizados para el presente trabajo de Tesis Doctoral fueron llevados a cabo de acuerdo con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos, y el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE 8-2-2013). Una vez que se obtuvo el Informe favorable del Órgano Habilitado de la UCM (Comité de Experimentación Animal) se presentó en la Comunidad de Madrid la Solicitud de autorización de Proyecto (SAF2009-09020), cuyo informe fue también favorable.

Previamente a la ejecución de los procedimientos experimentales, se habituó a los animales a la sala del bioterio durante al menos una semana para reducir así una eventual interferencia del estrés asociado al transporte y la nueva ubicación de los animales. Además, durante este periodo de adaptación, los animales se manipularon con el fin de acostumbrarse al experimentador y a los futuros experimentos. Básicamente consistió en tomar a los animales durante algunos minutos y someterlos a una manipulación similar a la que se realizaría durante los experimentos.

Una vez finalizados los procedimientos experimentales propiamente dichos (inducción de crisis epilépticas, realización de estudios PET, etc.), los animales fueron sacrificados por decapitación con el fin de obtener los cerebros para su procesamiento posterior. Para ello, las ratas fueron previamente anestesiadas profundamente con isofluorano. A continuación, los cerebros se extrajeron e inmediatamente se congelaron, bien por inmersión en isopentano o bien con hielo seco. Los cerebros se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la realización de los diferentes estudios histoquímicos.

### **3.2 Crisis epilépticas: Modelos experimentales**

En la presente Tesis Doctoral se han empleado dos modelos experimentales distintos. Por una parte, se utilizó el modelo de SE por administración de litio-pilocarpina (Löscher y Schmidt, 1988). Dicho modelo es un modelo de epileptogenesis de ELT (Kulkarni y George, 1995), que se caracteriza por provocar la inducción rápida de SE. Tras un periodo de latencia de aproximadamente unos 30 días, las ratas presentan crisis epilépticas espontáneas. Este modelo es uno de los más empleados actualmente en los estudios de epilepsia (Turski et al., 1983; Honchar et al., 1983; Turski et al., 1989; André et al., 2007; Reddy y Kuruba, 2013). La administración previa de litio potencia el efecto convulsivante de la pilocarpina, permitiendo reducir la dosis de esta última. Así, la administración de litio de 16 a 24 h antes de la inducción del SE, la dosis de pilocarpina necesaria para la inducción del mismo se reduce a unos 20-30 mg/kg, en comparación con la dosis usada del protocolo original (en ausencia de LiCl) en la que se requieren dosis de 300-400 mg/kg para la generación del SE (Jope et al., 1986; Reddy y Kuruba, 2013).

Para la generación de SE según el modelo de litio-pilocarpina, se procedió según el siguiente protocolo: Primero se administró a los animales cloruro de litio (3 mEq/kg, 127 mg/kg, disuelto en NaCl al 0,9%, i.p.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 21-24 horas antes de la administración de pilocarpina. Al día siguiente, los animales recibieron metil-escopolamina (2 mg/kg, disuelta en NaCl al 0,9%, i.p.;

Sigma Aldrich, St. Louis, MO). La metil-escopolamina es un antimuscarínico que no atraviesa la BHE, y se administra con el fin de reducir los efectos colinérgicos periféricos adversos (broncoespasmo, incremento de las secreciones, bradicardia, etc) inducidos por pilocarpina. Treinta minutos después de la administración del anticolinérgico, los animales fueron inyectados con pilocarpina a una dosis de 25 mg/kg, i.p. (disuelto en NaCl al 0,9%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Una vez administrada la pilocarpina, los animales se devuelven a su jaula para proceder a la observación de los mismos. En un periodo de unos 30 min empezaba los primeros signos de crisis. El nivel de las crisis alcanzado se evalúa según la escala comportamental de Racine (Racine, 1972; Müller et al., 2014; ver apartado 2.4.1 para una descripción de la escala original de Racine). Se consideró que las ratas alcanzaban el SE cuando presentaban crisis tónico-clónicas (puntuación de 4 ó 5 en la escala de Racine. Transcurridos 45 minutos tras el inicio del SE, éste se detenía mediante la administración del barbitúrico pentobarbital (25 mg/kg, disuelto en NaCl al 0,9%, i.p.). En caso de que al cabo de 30 minutos tras de la administración de pentobarbital las convulsiones no cedieran, las ratas eran inyectadas con una dosis adicional de pentobarbital a la mitad de la dosis anterior (12,5 mg/kg). Los animales controles (aquellos que no fueron inyectados con pilocarpina), siguieron el mismo régimen de tratamiento farmacológico (incluyendo la administración de LiCl, metil-escopolamina y pentobarbital), excepto que la administración de pilocarpina fue sustituida por inyección de solución salina (0,9% NaCl).

El segundo modelo utilizado fue el de crisis agudas por administración periférica de 4-AP. La 4-AP es un compuesto despolarizante cuyo mecanismo de acción consiste en bloquear los canales de K<sup>+</sup> (Rutecki et al., 1987). La 4-AP, administrada tanto de forma periférica como intracerebral induce la aparición rápida de crisis convulsivas (Galvan et al., 1982; Rutecki et al., 1985; Fragoso-Veloz et al., 1990; Medina-Ceja et al., 2000). A diferencia del modelo de epileptogenesis de litio-pilocarpina, la administración de 4-AP no genera epilepsia en las ratas (Bobérly et al., 2015). Este modelo consistió en la administración de una única dosis de 4-AP (3 mg/kg, disuelta en NaCl al 0,9%, i.p; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). En este caso, se consideraron que los

animales presentaban crisis cuando alcanzaron el estado 3 (en inglés, *wet-dog shakes*) según una escala modificada de Racine (Malhotra et al., 1997; Takács et al., 2010; Medina-Ceja et al., 2015).

En todos los casos, el volumen inyectado fue de 1 ml/kg.

### 3.3 Grupos experimentales

#### 3.3.1 Efecto de la administración subcrónica de fluoxetina sobre las alteraciones cerebrales inducidas por pilocarpina

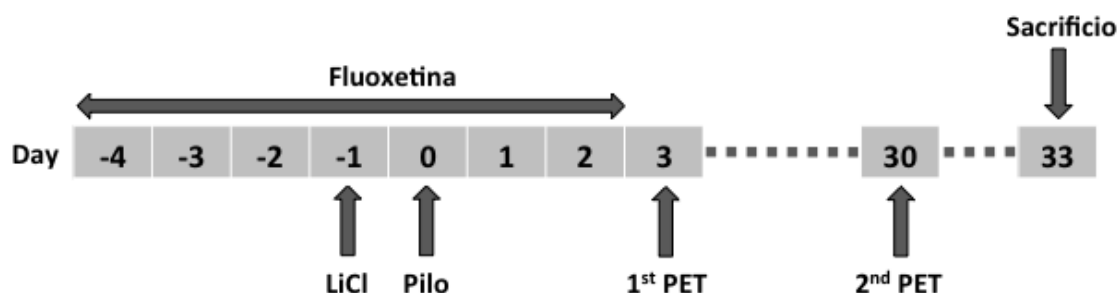
Con el fin de estudiar los eventuales efectos que presenta la administración del ISRS fluoxetina sobre el daño cerebral inducido por el agente epileptogénico pilocarpina se emplearon los siguientes grupos experimentales:

- Animales controles que no recibieron ni fluoxetina ni pilocarpina (**grupo VEH+SAL**).
- Grupo tratado subagudamente con fluoxetina (**grupo VEH+FLUOX**).
- Grupo inyectado con pilocarpina (**grupo VEH+PILO**).
- Por último, el grupo tratado subcrónicamente con fluoxetina a los que se le indujo la aparición del SE por administración aguda de pilocarpina (**grupo FLUOX+PILO**).

Para ello, la fluoxetina (10 mg/kg, disuelta en agua destilada) se administró subcrónicamente durante 7 días, 4 días antes y 2 días después de la inyección de pilocarpina. La hora de la administración de fluoxetina fue aproximadamente las 10:00 am, todos los días. A los animales pertenecientes al grupo control (sin tratamiento farmacológico) se les administró diariamente el vehículo de la fluoxetina (agua destilada; VEH) y el vehículo en el que se disolvía la pilocarpina (suero salino; SAL):

- Grupo **VEH + SAL**.
- Grupo **FLUOX (10 mg/kg x 7d) + SAL**.
- Grupo **VEH + PILO (25 mg/kg)**.
- Grupo **FLUOX (10 mg/kg x 7d) + PILO (25 mg/kg)**.

El protocolo del estudio se esquematiza en la Figura 12.



**Fig.12.** Protocolo experimental. La fluoxetina (10 mg/kg; i.p.) se administró 4 días antes y 2 días después de la administración intraperitoneal de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). los estudios de neuroimagen [<sup>18</sup>F]FDG PET se realizaron en el día 3 y día 30 después del SE, para evaluar los efectos metabólicos, a corto y medio plazo. Todos los animales fueron sacrificados en el día 33 e inmediatamente se extrajo el cerebro para los estudios histoquímicos *in vitro*.

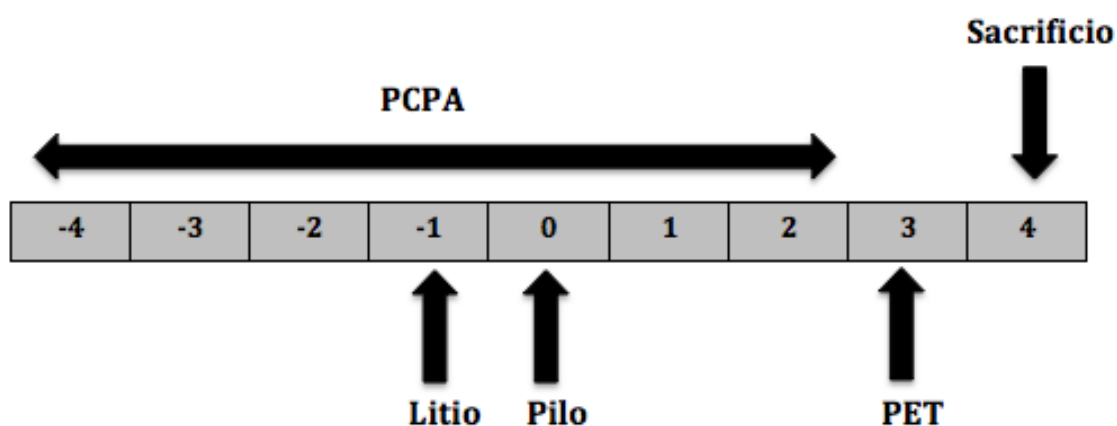
### 3.3.2 Estudio del eventual efecto de la depleción de 5-HT sobre el daño hipocampal inducido por pilocarpina

Con el fin de estudiar el efecto de la depleción de 5-HT sobre los efectos metabólicos e histoquímicos inducidos por el SE inducido por pilocarpina se administró subcrónicamente p-clorofenilalanina (PCPA). Este compuesto es un aminoácido sintético que actúa como inhibidor irreversible de la enzima triptófano-hidroxilasa, enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis de la 5-HT (Saadat et al., 2005). Ya que el presente estudio se realizó en base a los resultados obtenidos en el estudio anterior, los protocolos experimentales de ambos presentan una elevada similitud; es decir se administró el agente deplecionante de manera subaguda tanto antes como después de la inducción del insulto. En este caso, la diferencia radica en que se administró PCPA (a una dosis de 125 mg/kg, disuelto en NaCl al 0,9%, i.p; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en vez de fluoxetina. La dosis y duración del tratamiento con PCPA se eligió en base a estudios previos en los que un tratamiento similar inducía una reducción del contenido de 5-HT superior al 80% (Saadat et al., 2005; Kornum et al., 2006). Los animales control (sin tratamiento) recibieron solución salina (NaCl al 0,9%,

i.p.) en vez de PCPA. Los diferentes grupos experimentales se dividieron de la siguiente manera:

- Grupo **VEH + SAL.**
- Grupo **PCPA (125 mg/kg x 7d) + SAL.**
- Grupo **VEH + PILO (25 mg/kg).**
- Grupo **PCPA (125 mg/kg x 7d) + PILO (25 mg/kg).**

El protocolo seguido se presenta en la Fig. 13.



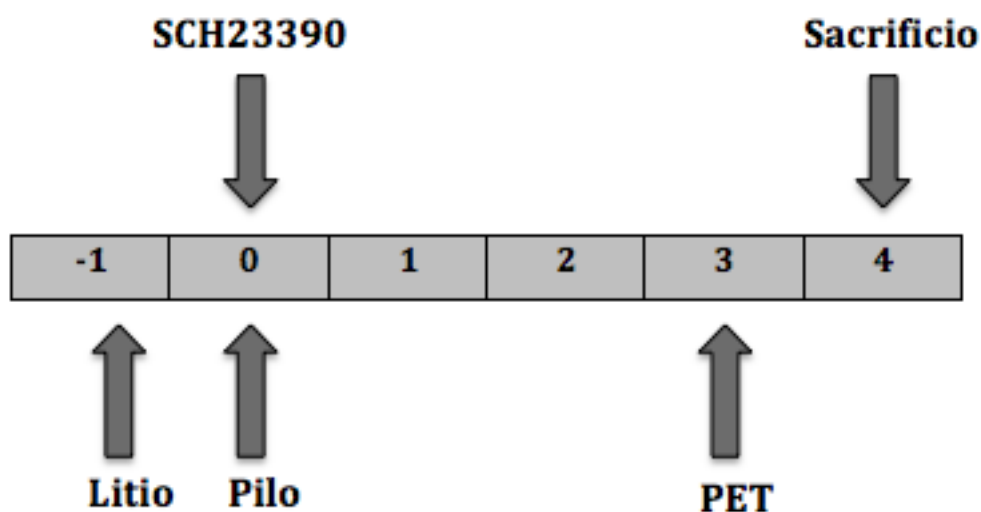
**Fig. 13.** Protocolo experimental del estudio sobre la depleción de 5-HT cerebral sobre los efectos neurológicos inducidos por el SE por administración de pilocarpina. La PCPA (125 mg/kg; i.p.) se administró 4 días antes y 2 días después de la administración intraperitoneal de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). El estudio [<sup>18</sup>F]FDG PET se realizó en el día 3 para evaluar los efectos metabólicos, a corto plazo, del modelo de litio-pilocarpina. Todos los animales fueron sacrificados en el día 4 e inmediatamente se extrajo el cerebro para los estudios histoquímicos.

### **3.3.3 Estudio del efecto de la modulación selectiva aguda del sistema central dopaminérgico sobre el hipometabolismo cerebral y neurogeneración hipocampal inducida por el modelo de SE de litio-pilocarpina en ratas**

Se ha descrito que la respuesta comportamental convulsiva inducida por pilocarpina es modulada de manera diferencial por las dos familias de receptores dopaminérgicos: D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Burke et al., 1990; Barone et al., 1992, Freitas et al., 2006b). El compuesto SCH23390 (R-(+)-7-Cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-

2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina) fue el primer antagonista desarrollado con elevada selectividad por la familia de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, constituidos por los receptores D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>. (Bourne, 2001) En este estudio se procedió a evaluar el efecto agudo de la administración del bloqueo de los receptores D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> en la respuesta convulsiva inducida por el modelo de litio-pilocarpina. Para ello se administró una única dosis de SCH23390 (0,2 mg/kg, disuelto en NaCl al 0,9%, i.p.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) media hora antes de la administración de pilocarpina (justo inmediatamente después de la administración de metil-escopolamina). El protocolo se muestra en la Fig. 14. Tanto la dosis como el tiempo de administración de SCH23390 se basaron en estudios anteriores (Burke et al., 1990). Los grupos experimentales fueron:

- Grupo **VEH + SAL.**
- Grupo **SCH23390** (0,2 mg/kg) + **SAL.**
- Grupo **VEH + PILO** (25 mg/kg).
- Grupo **SCH23390** (0,2 mg/kg) + **PILO** (25 mg/kg).

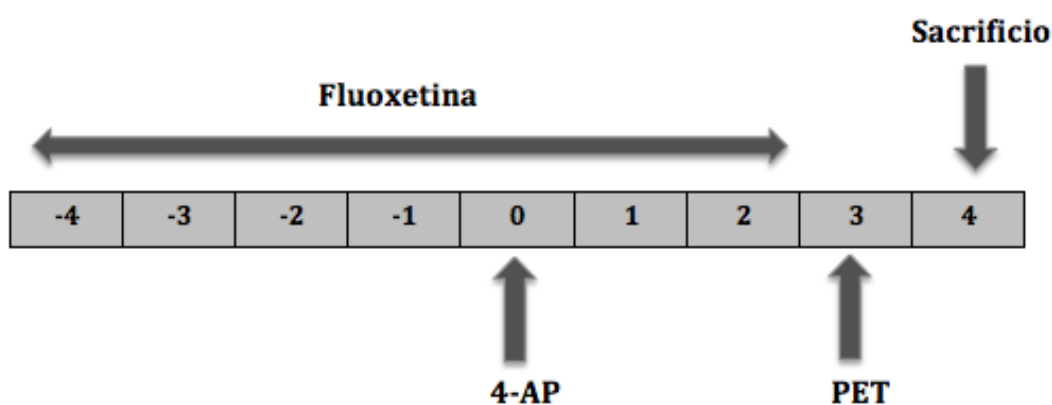


**Fig. 14.** Protocolo experimental. La SCH23390 (0,2 mg/kg; i.p.) se administró 30 minutos antes de la administración intraperitoneal de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). El estudio [<sup>18</sup>F] FDG PET se realizó en el día 3 para evaluar los efectos metabólicos, a corto plazo, del modelo de litio-pilocarpina. Todos los animales fueron sacrificados en el día 4 e inmediatamente se extrajo el cerebro para los estudios histoquímicos (*in vitro*).

### 3.3.4 Efecto de la administración subaguda de fluoxetina sobre la actividad convulsiva inducida por la administración de 4-AP

Las convulsiones fueron inducidas por una única inyección intraperitoneal de 4-AP (3 mg/kg, disuelta en NaCl al 0,9%). Con el fin de investigar los efectos eventuales de un tratamiento subcrónico con fluoxetina en este modelo de convulsiones, ésta se administró diariamente durante 7 días, antes y después de la lesión inducida por 4-AP. Tanto la duración como la dosis del tratamiento con fluoxetina fueron idénticos a los llevados en el estudio con pilocarpina. Igualmente, la hora de la administración de fluoxetina fue aproximadamente la 10:00 am, todos los días (Fig. 15). En este estudio se emplearon los siguientes grupos experimentales:

- Grupo **VEH + SAL.**
- Grupo **FLUOX (10 mg/kg x 7d) + SAL.**
- Grupo **VEH + 4-AP (3 mg/kg).**
- Grupo **FLUOX (10 mg/kg x 7d) + 4-AP (3 mg/kg).**



**Fig. 15.** Protocolo del estudio. La fluoxetina (10 mg/kg; i.p.) se administró 4 días antes y 2 días después de la inyección de 3 mg/kg de 4-AP (día 0). El estudio [<sup>18</sup>F] FDG PET se realizó en el día 3 para evaluar a corto plazo los efectos metabólicos del modelo de convulsiones de 4-AP. Todos los animales fueron sacrificados en el día 4 con el fin de obtener muestras de cerebro para los estudios histoquímicos (*in vitro*).

## 3.4 Evaluación comportamental de la crisis

### 3.4.1 Modelo de Litio-pilocarpina

La evaluación comportamental de la intensidad de las crisis y convulsiones generadas por este modelo de SE, se llevó a cabo mediante la escala original de Racine (1972). Esta escala ordena la severidad de las crisis/convulsiones en una escala de 6 niveles en orden creciente:

- **Estadío 0:** Inmovilidad.
- **Estadío 1:** Asentimiento con la cabeza y estereotipos faciales.
- **Estadío 2:** Ondas convulsivas a través del cuerpo (espasmos).
- **Estadío 3:** Sacudidas mioclónicas en las extremidades anteriores.
- **Estadío 4:** Elevación sobre las patas traseras, convulsiones clónicas en todas las extremidades, caída sobre el costado.
- **Estadío 5:** Convulsiones tónico-clónicas en todas las extremidades, caída sobre la espalda.

Básicamente, la escala de Racine evalúa los estadios de una crisis otorgando una puntuación de 0 a 5. Los niveles 0-3 representan crisis focales (parciales). A partir del estadio 3, la crisis tiende a propagarse hacia nuevas estructuras. Por último, los estadios 4 y 5 representan crisis convulsivas de elevada severidad. Mediante esta escala se representan los aspectos más típicos de las crisis producidas por la administración de pilocarpina. Se considera que la pilocarpina desencadena el SE cuando las ratas alcanzan los estadios 4 y 5 de la escala de Racine (Racine, 1972; Müller et al., 2014).

El comportamiento de los animales se valoró mediante observación continua de los mismos tras administración de la pilocarpina, apuntando el tiempo en el que un determinado sujeto manifestaba un signo característico de haber alcanzado un determinado estadio. En especial, se apuntaba el momento en el que las ratas mostraban signos de SE. Cuarenta y cinco minutos después de que la rata alcanzara un *score* de 4-5 se procedía a la finalización del SE mediante la administración de pentobarbital (25 mg/kg, i.p.).

### 3.4.2 Modelo de generación de crisis por administración de 4-AP

Se procedió a la evaluación de forma similar a como se ha explicado en el apartado anterior (2.4.1). En este caso, para la evaluación del comportamiento se utilizó una versión ligeramente modificada de la escala de Racine (Malhotra et al., 1997; Takács et al., 2010; Medina-Ceja et al., 2015) con el fin de reflejar las diferencias existentes a nivel de comportamiento entre ambos agentes convulsivo. De forma similar esta escala ordena las crisis convulsivas inducidas por 4-AP en una escala de 6 niveles de intensidad creciente, en el que tienen lugar los siguientes signos:

- **Estadio 0:** Inmovilidad, piloerección, y respiración rápida.
- **Estadio 1:** Movimiento de la boca, labios y lengua.
- **Estadio 2:** Clonus de la cabeza y de los ojos.
- **Estadio 3:** Aparición de *wet dog shakes*.
- **Estadio 4:** Elevación sobre las patas traseras con clonus de las extremidades anteriores.
- **Estadio 5:** Crisis clónicas generalizadas, caídas y saltos sin control.

De forma similar a los estudios con pilocarpina se apuntó el tiempo tras la administración de 4-AP en el que alcanzaban un determinado estadio. En este caso y tal como está descrito (Malhotra et al., 1997; Takács et al., 2010; Medina-Ceja et al., 2015), el tiempo de latencia fue el tiempo transcurrido desde la administración de 4-AP hasta el momento en el que los animales alcanzaban el estadio 3 en esta escala (aparición de *wet dog shakes*).

## 3.5 Estudios de imagen *in vivo* ( $[^{18}\text{F}]\text{FDG PET}$ )

### 3.5.1 Equipamiento utilizado

La evaluación de la actividad metabólica cerebral *in vivo* se llevó a cabo mediante  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ . Para este fin se utilizó un escáner PET específico para animales pequeños (microPET) del Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de

Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar UCM. Debido a las actualizaciones y mejoras del sistema microPET llevadas a cabo a lo largo de la realización de la presente Tesis Doctoral, se emplearon dos sistemas distintos, ambos de la línea Albira desarrollados por la compañía Oncovision (Valencia, España). Ambos sistemas se basan en la utilización de módulos constituidos por un cristal continuo acoplado a fotomultiplicadores. En el caso de los estudios en los que se evaluó la implicación del sistema serotoninérgico en las alteraciones metabólicas cerebrales por SE inducido por administración de pilocarpina se empleó el sistema Albira ARS (Fig. 16). Esta cámara consiste en un sistema PET dual-híbrido PET/TAC. Este sistema cuenta con las siguientes especificaciones técnicas: 8 módulos detectores en una configuración de 1 anillo; resolución máxima de 1,5 mm en el centro del FOV y un FOV axial de 40 mm y transaxial de 80 mm (Balcerzyk et al., 2009).



**Fig. 16.** Escáner híbrido PET/TAC Albira ARS (Oncovision, Valencia, España) del CAI de Cartografía Cerebral de la Universidad Complutense de Madrid correspondientes a los estudios de la evaluación de la implicación de la transmisión serotoninérgica en las alteraciones metabólicas inducidas por litio-pilocarpina.

El segundo equipo PET/TAC utilizado, correspondiente a una actualización tanto a nivel *hardware* como *software*, corresponde a un sistema modular Albira de 3ª generación en el que se puede combinar hasta 3 anillos detectores PET, con módulos TAC y SPECT (tomografía computerizado por emisión de fotón único; del inglés *single-photon emission computed tomography*), pudiendo llegar a ser un equipo trimodal. Concretamente, el escáner utilizado en estos estudios constaba un módulo detector PET (formado por 2 anillos) y un módulo TAC (Fig. 17). Este equipo fue el utilizado para el resto de los estudios que se presentan en esta Tesis Doctoral, es decir, los estudios en los que se evaluó el efecto del bloqueo dopaminérgico D<sub>1</sub> en el modelo de litio-pilocarpina, así como en el estudio de las crisis inducidas por administración periférica de 4-AP y su eventual modulación por la administración subcrónica de fluoxetina. Las especificaciones técnicas más destacables correspondientes al módulo PET de este equipo son las siguientes: 16 módulos detectores configurados en 2 anillos; resolución hasta 0,7 mm en el centro del FOV e inferior a 1,2 mm en la totalidad del FOV, y FOV axial y tranaxial de 97 y 80 mm, respectivamente.



**Fig. 17.** Escáner híbrido PET/TAC modelo Albira (Oncovision, Valencia, España) del CAI de Cartografía Cerebral de la UCM. Este equipo fue el utilizado en los estudios de la implicación del sistema dopaminérgico en las alteraciones metabólicas inducidas por litio-pilocarpina, así como en el estudio de 4-AP.

Los protocolos de adquisición y procesamiento de las imágenes tomográficas son los que habitualmente se han venido utilizando en la Unidad (García-García et al., 2014). Debido a las diferencias existentes tanto a nivel de software de ambos escáneres, hay ligeras variaciones en ambos procedimientos. A continuación, en los siguientes apartados, se describen los mismos.

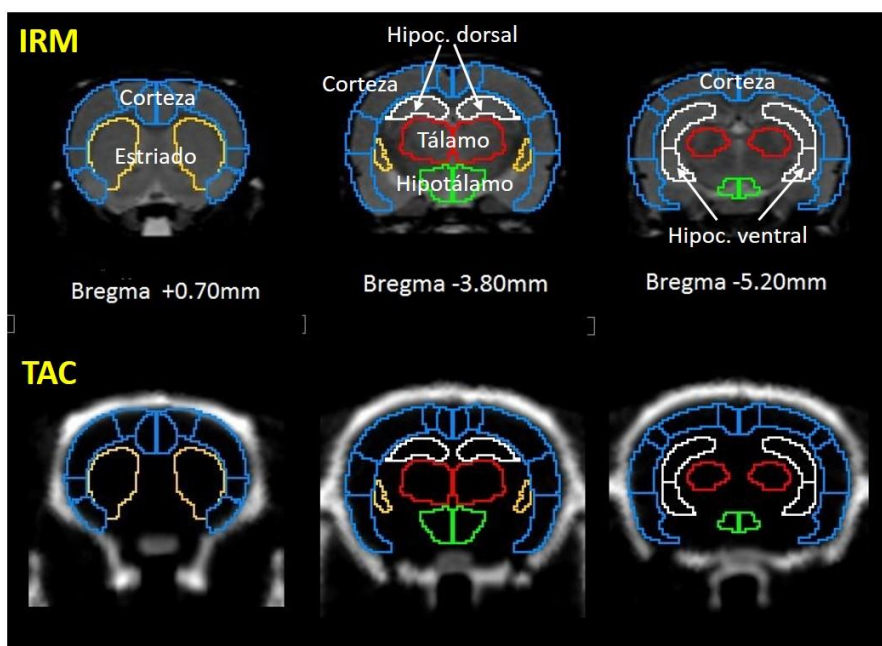
### **3.5.2 Procedimiento de adquisición y reconstrucción de las imágenes tomográficas**

Con el fin de minimizar en la medida de lo posible la interferencia de la glucosa plasmática en la incorporación tisular del radiotrazador, las ratas se mantuvieron en ayunas durante al menos 12 h antes de la adquisición de la imagen metabólica. Para ello, se administró [<sup>18</sup>F]FDG (Instituto Tecnológico PET, Madrid, España) i.v. en la vena caudal. Debido a diferencias en la sensibilidad de los dos equipos utilizados, la dosis administrada en los estudios con el primer equipo era aproximadamente 18,5 MBq (500 µCi), mientras en el caso del segundo equipo, la dosis utilizada era de 13 MBq (aprox. 350 µCi). La actividad a inyectar era medida previamente en un activímetro (Veenstra VDC 505, Comecer, Holanda). En cualquier caso, el radiofármaco se administró en un volumen aproximado de 0,2 ml, disuelto en NaCl al 0,9%. Después de un período de 30 min de incorporación consciente (con el fin de asegurar la biodistribución del radiotrazador y su paso al cerebro), los animales fueron anestesiados por inhalación de una mezcla de isoflurano/oxígeno (5% para la inducción y 2% para mantenimiento) y colocados en la cama del escáner para proceder a las adquisiciones tomográficas. Dichas adquisiciones consistían en una primera adquisición PET (duración de 20 min) que era seguida por una adquisición TAC. Una vez finalizadas las adquisiciones, se procedió a la reconstrucción de las imágenes tomográficas. En este punto existen ligeras diferencias en cuanto al procedimiento y algoritmo utilizado para la reconstrucción de las imágenes PET. Mientras que en los primeros estudios el algoritmo empleado fue el OSEM (*ordered-subsets expectation maximization*) con el fin de reducir el tiempo requerido para reconstruir las imágenes; en los estudios llevados a cabo con el segundo equipo se recurrió al denominado MLEM (*maximum likelihood*

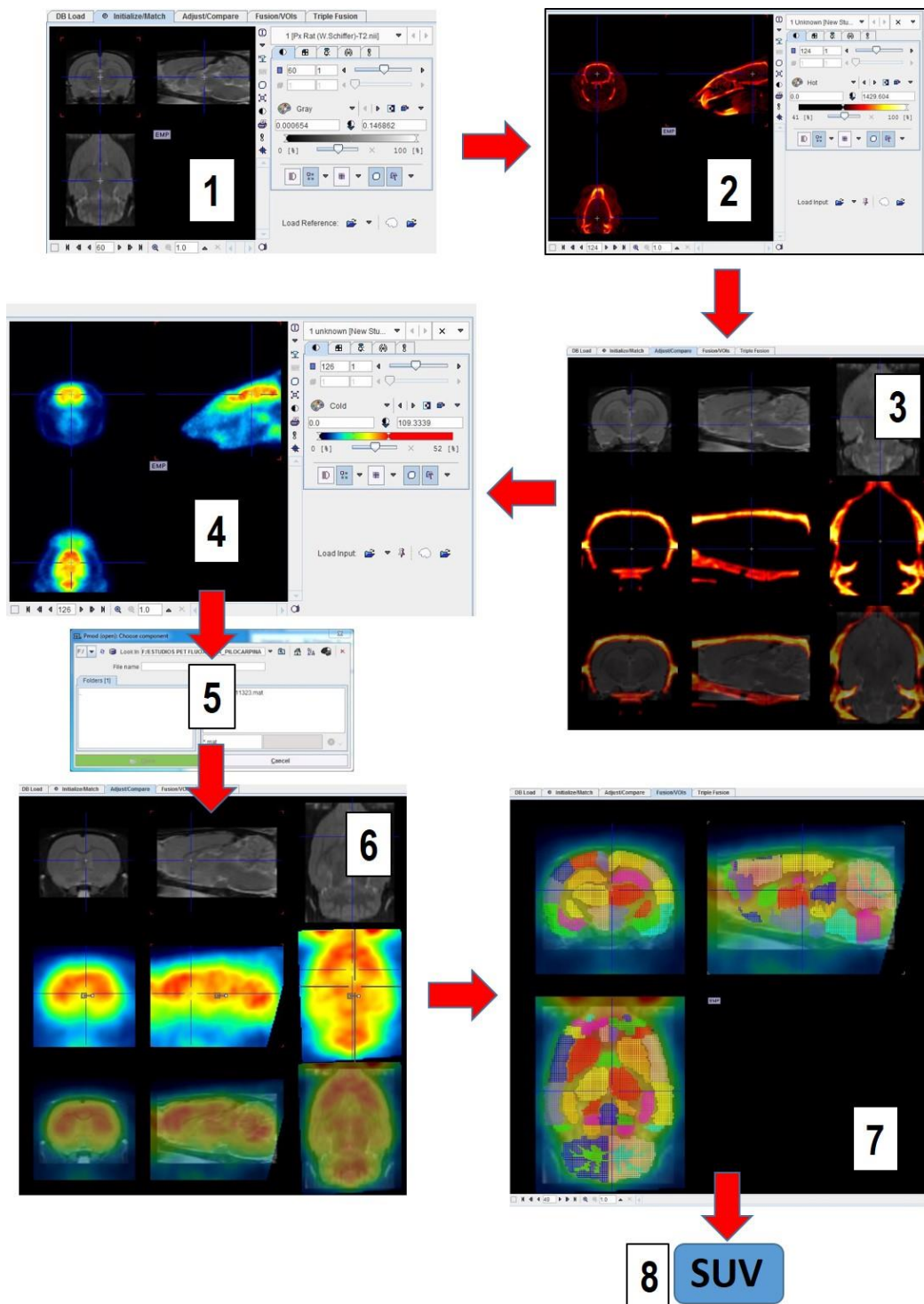
*expectation maximization*) gracias a la mayor potencia computacional del equipo. En ambos casos, las reconstrucciones se hicieron activando las diferentes correcciones que permite el sistema; esto es, con corrección por *decaimiento*, *random* y *por scatter*. Por último, para la reconstrucción de las imágenes TAC se recurrió a la retroproyección filtrada (*filtered back projection*, FBP).

### 3.5.3 Cuantificación de la actividad metabólica regional

Todos los procesos necesarios para la cuantificación metabólica cerebral regional se llevaron a cabo utilizando el software PMOD (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Suiza) en sus versiones 3.0 y 3.2. Para la determinación de la actividad metabólica, primero se procedió al corregistro de las imágenes tomográficas obtenidas con las de una imagen *template* de resonancia magnética (IRM) de cerebro de rata en las que las regiones de interés (ROI) constituidas por las distintas áreas cerebrales estaban previamente ya delimitadas. Concretamente, el atlas de conteniendo ROIs fue el desarrollado originalmente por Schiffer et al. (2006). El corregistro consistió en los ajustes manuales necesarios tanto de la orientación espacial como en el escalado del tamaño de la imagen TAC en los diferentes ejes hasta que ajustara perfectamente en el *template* de resonancia (Fig. 18).



**Fig. 18.** Fila sup.: Cortes coronales de la plantilla (*template*) de IRM del cerebro de rata con los ROIs de diferentes áreas cerebrales. Fila inf: TAC de cráneo de rata corregistrado con la IRM superior, mostrando los distintos ROIs



**Fig. 19.** Esquema del proceso de cuantificación de la actividad metabólica regional cerebral. (1) Template IRM de cerebro de rata; (2) Incorporación de la imagen TAC de la región craneal de los animales; (3) Corregistro manual IRM/TAC y grabación de la transformación realizada; (4) Carga de la imagen metabólica PET original fusionada con la TAC; (5) Aplicación de la transformación a la imagen PET; (6) Se observa que la imagen PET automáticamente se corregistra a la IRM; (7) aplicación de lo ROIs y (8) Normalización por peso y dosis inyectada para la obtención del cuantificador SUV.

Una vez corregistrada la imagen TAC, se grabó la transformación matemática correspondiente a dicho corregristo. Debido a que el sistema proporciona las imágenes PET y TAC en el mismo espacio, la aplicación de esta transformación permite el correcto ajuste de la imagen PET con el *template* (Jupp y O'Brien, 2007). Como índice de actividad metabólica regional se obtuvo el SUV, que normaliza la captación del trazador al peso y a la dosis de trazador inyectada:

$$SUV = \frac{\text{Captación (kBq/cm}^3\text{)}}{\text{Dosis inyectada (kBq)/Peso corporal (g)}}$$

Todo este proceso se encuentra esquematizado en la Fig. 19.

### **3.6 Procesamiento de las muestras cerebrales**

Tal como se ha mencionado anteriormente, una vez finalizados los estudios PET se obtuvieron los cerebros de los animales, con el fin de obtener cortes para llevar a cabo diferentes estudios neuroquímicos. Con la ayuda de un criostato (Leica CM1850, Leica Biosystems, Alemania) se obtuvieron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor a nivel del hipocampo tanto a nivel de hipocampo dorsal como a nivel del hipocampo ventral. Los cortes obtenidos se colocaron en portaobjetos (4 cortes/portaobjetos, 8 series por estructura; Superfrost Plus, Thermo Scientific, Alemania) y se almacenaron  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de los ensayos.

### **3.7 Estudios neuroquímicos**

#### **3.7.1 Doble marcaje con Fluoro-Jade C y DAPI**

Con el fin de estudiar la eventual neurodegeneración inducida por las crisis activadas por la administración de agentes convulsivantes y/o epileptogénicos se llevaron a cabo tinciones con Fluoro-Jade C. Este compuesto fluorescente es

un marcador reconocido de neuronas en proceso de neurodegeneración (Schmued et al., 2005). Para facilitar la localización de dichas neuronas, habitualmente se hacía un marcaje conjunto con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual se une al ADN bicatenario tanto de células vivas como de células fijadas, permitiendo por ello el marcaje celular que facilita el reconocimiento de las diferentes estructuras cerebrales. Debido a los diferentes perfiles de absorción y emisión de Fluoro-Jade C y DAPI, hace posible el doble marcaje, permitiendo la visualización de las neuronas marcadas con Fluoro Jade C (emisión en color verde-amarillento) junto con el resto de células (emisión en color azul) en el mismo tejido. Para la tinción se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Fijación: formaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, durante 10 minutos.
2. Lavado: 2 veces en tampón fosfato.
3. Alcohol básico (NaOH al 1% en etanol 80%) durante 5 minutos.
4. Etanol 70% durante 2 minutos.
5. Agua destilada durante 2 minutos.
6. Permanganato potásico 0,06% durante 10 minutos.
7. Agua destilada durante 90 segundos.
8. Fluoro Jade C (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) al 0,0001% y DAPI (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 0,0001% en ácido acético al 0,1% durante 10 minutos. Para ello se prepara una solución stock de Fluoro Jade C al 0,01% en agua destilada, y una solución stock de DAPI al 0,01%. Finalmente, se mezcla 1 ml de la solución stock de Fluoro Jade C al 0,01% con 1 ml de la solución stock de DAPI al 0,01% y 98 ml de ácido acético al 0,1%.
9. Agua destilada 3 veces durante 1 minuto.
10. El exceso de agua es retirada con papel y los portaobjetos se secan con aire a 50°C durante al menos durante 5 minutos.
11. A continuación, las muestras se aclaran en xileno durante 1 minuto.
12. Finalmente, se cubren con DPX (Fluka, Suiza). Este es un medio de montaje constituido por una resina sintética que es una mezcla de un poliestireno, fosfato de tricresilo y xileno). Las muestras conservadas a

temperatura ambiente y en oscuridad mantienen su fluorescencia estable durante al menos 1 año (Schmued et al., 2005).

Las muestras histológicas se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51, Olympus Europa Holding, Alemania). Para visualizar la doble tinción con Fluoro-Jade C y DAPI se utilizó el filtro del isotiocianato de fluoresceína (FITC; excitación a 495 nm y emisión a 521 nm) y un filtro de color azul/cian (excitación con luz UV y emisión a 461 nm), respectivamente. Las imágenes de fluorescencia se procesaron utilizando el software ImageJ 1.46r (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

### **3.7.2 Inmunohistoquímica de GFAP**

La proteína fibrilar ácida de la glía, (en inglés, *Glial fibrillary acidic protein*; GFAP), es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann. La GFAP se expresa predominantemente en los astrocitos maduros, siendo el marcador clásico utilizado para la evaluación de astrogliosis. Su expresión se encuentra altamente regulada, y se ha comprobado que aumenta en diversas patologías del SNC en lo que tiene lugar gliosis reactiva frecuentemente asociada a proliferación glial.

En este caso y a diferencia del resto de estudios inmunohistoquímicos realizados, los ensayos para la determinación de GFAP se llevaron a cabo mediante una técnica de un solo paso, sin la utilización de anticuerpo secundario. Para ello, en la inmunohistoquímica de GFAP se usó un anticuerpo monoclonal anti-GFAP conjugado con el fluoróforo de cianina Cy3 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), el cual tiene un perfil de excitación a ~550 nm y emisión a ~570 nm. Esto permite la detección directa de la proteína, sin la necesidad de requerir un anticuerpo marcado anti-IgG. Para la inmunohistoquímica de GFAP se siguió el siguiente protocolo:

1. Fijación: Los cortes se fijaron con acetona fría durante 5 minutos y, posteriormente, se dejaron secar al aire durante 15-20 minutos.

2. Lavado con TBS durante 30 minutos.
3. Se bloquea incubando las secciones con TBS conteniendo BSA (albúmina de suero bovino; Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 3% y tritón X-100 al 0,1%, durante 45-60 minutos.
4. Se incuban los cortes con el anticuerpo anti-GFAP-Cy3 (dilución 1:500) en TBS con BSA al 1% a 4°C en cámara húmeda, durante toda la noche.
5. Se lava 3 veces con TBS conteniendo Tween 20 al 0,1% durante 5 minutos.
6. Se lava 3 veces con TBS durante 5 minutos.
7. Se cubre con medio de montaje acuoso. Para ello se usó fluoroshield o Fluoromount con DAPI (Sigma-Aldich, Madrid, España). Una vez puestos los cubreobjetos, al día siguiente éstos se rodearon con laca de uñas para sellar los bordes de los cubreobjetos. En los últimos estudios se usó como medio de montaje Mowiol de preparación propia. Este es un medio de montaje “*antifade*” que se endurece a las 24 horas evitando el uso de laca sellante, que está constituido por mowiol 4-88, glicerol, Tris-HCl (pH 8,5). El protocolo utilizado para la preparación de Mowiol fue obtenido en <http://web.qbi.uq.edu.au/microscopy/mowiol>)

Las cortes se examinaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) utilizando el filtro de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). En aquellos casos en los que se hizo el marcaje conjunto con DAPI también se utilizó el correspondiente filtro. De forma similar, las capturas digitales obtenidas se procesaron posteriormente con el software 1.46r ImageJ.

### **3.7.3 Inmunohistoquímica de Caspasa-9**

La caspasa 9 es la caspasa iniciadora responsable de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, y su determinación permite evaluar una activación de dicha vía (Shiozaki et al., 2002). Para la inmunohistoquímica de caspasa 9 se siguió el siguiente protocolo:

1. Las secciones se fijaron con acetona fría durante 5 minutos y, posteriormente, se dejaron secar al aire durante 15-20 minutos.
2. Lavado con PBS durante 5 minutos.
3. Los cortes se permeabilizan mediante incubación en Triton X-100 al 0,1% (en PBS) durante 5 min, a temperatura ambiente.
4. Se lavan 3 veces en PBS durante 5 minutos.
5. Se bloquea mediante incubación en PBS conteniendo BSA (albúmina de suero de bovino) al 5% y Tween 20 al 0,1%, durante 2 horas en cámara húmeda.
6. Se enjuagan 1 vez en PBS. Y a continuación, los cortes se incuban durante toda la noche con el anticuerpo anti-caspasa-9 (dilución 1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en tampón de bloqueo, a 4°C y en cámara húmeda.
7. Al día siguiente, los cortes se lavan 3 veces durante 10 minutos.
8. Después se incuban con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit (desarrollado en cabra; dilución 1:500; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) para caspase-9 durante 2 horas, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, protegidos de luz.
9. Los cortes se lavan 3 veces en PBS conteniendo Tween 20 al 0,1%, durante 5 minutos cada vez.
10. Se cubren con Mowiol.

Los cortes de cerebro se examinaron al microscopio de fluorescencia con filtro de FITC (Olympus IX51). Se obtuvieron capturas digitales que se procesaron mediante el software 1.46r ImageJ.

#### **3.7.4 Inmunohistoquímica de NeuN**

Neu es una proteína neuronal nuclear que puede ser utilizada como marcador temprano y específico de la mayoría de las neuronas. Sin embargo, está ausente en las células de Purkinje en el cerebelo, las mitrales del bulbo olfatorio y fotorreceptoras retinianas. No todos los tipos neuronales poseen el mismo grado

de expresión de NeuN, lo que podría asociarse al grado de diferenciación y de función neuronal (Daumas et al., 2005). Para la inmunohistoquímica de NeuN se siguió el siguiente protocolo:

1. Los cortes se fijan con acetona helada durante 5 minutos y, posteriormente, se dejan secar al aire durante 15-20 minutos.
2. Se lavan durante 5 minutos en PBS.
3. Se incuban con PBS conteniendo suero de caballo al 10% y tritón X-100 al 2%, durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lavan en PBS durante 5 minutos.
5. Se incuban con el anticuerpo primario anti-NeuN (dilución 1:200, Millipore, Darmstadt, Germany) en PBS con tritón al 0,2%, a 4°C y en cámara húmeda durante toda la noche.
6. Se lavan en PBS durante 5 minutos.
7. Se incuban con el anticuerpo secundario goat anti-mouse para NeuN (dilución 1:200, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a temperatura ambiente, durante 2 horas y en cámara húmeda.
8. Se lavan durante 5 minutos en PBS.
9. Se cubren con medio de montaje acuoso de Mowiol.

Los cortes de cerebro se examinaron al microscopía de fluorescencia con filtro de FITC (Olympus IX51). Se obtuvieron capturas digitales que se procesaron con el software 1.46r ImageJ.

### **3.7.5 Tinción de Nissl (violeta de cresilo)**

El violeta de cresilo es un colorante básico se fija a los denominados cuerpos o gránulos de Nissl, que se encuentran formados por retículo endoplásmico rugoso. Estos cuerpos de Nissl se encuentran distribuidos por todo el cuerpo celular a excepción de los axones. El retículo endoplásmico rugoso presenta una elevada afinidad hacia los colorantes básicos, tiñéndose fuertemente ya que presenta una elevada concentración de ribosomas y por tanto de ARN. Entre los colorantes usados para realizar la tinción de Nissl se encuentra el azul de

toluidina, la tionina y el violeta de cresilo. En nuestro caso, para la tinción de Nissl se empleó violeta de cresilo. Esta tinción es ideal para la localización de los cuerpos celulares, así como la identificación ciertos detalles morfológicos neuronales como los somas y las dendritas. Para la tinción de Nissl se siguió un protocolo estándar:

1. Fijación: Los cortes se fijaron con formaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, durante 10 minutos.
2. Lavado con tampón fosfato 0,1 M (2 x 1 minutos).
3. Se incuban en una solución de ácido acético que contiene 0,5% de acetato de violeta de cresilo, durante 30 minutos.
4. Después se lavan en agua destilada.
5. Se deshidratan en series de etanol en graduación creciente (70%, 95% y 100%, respectivamente).
6. Se aclaran en xileno (1 minuto).
7. Se cubren con medio de montaje DPX (Fluka, Suiza).

Las imágenes histológicas se capturaron con una cámara digital (DFC425, Leica, Alemania) acoplada a un microscopio de luz transmitida (Leitz Laborlux S, Leica, Alemania).

## **3.8 Estudios autorradiográficos**

### **3.8.1 Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]Flumazenilo**

El flumazenilo es un ligando que se se fija al lugar de unión de benzodiazepinas, presentes en los receptores GABA-A. Por ello, la autorradiografía con el ligando tritiado [<sup>3</sup>H]Flumazenilo ([<sup>3</sup>H]RO15-1788; Perkin Elmer, EE.UU.) permite la evaluación de la densidad receptorial de los receptores GABA-A. El protocolo utilizado para la realización de la autorradiografía de los receptores GABA-A fue el siguiente (Chadha et al., 2000):

1. Los cortes de cerebro se pre-incubaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), durante 20 minutos, a temperatura ambiente.

2. Posteriormente, se incubaron en presencia del ligando tritiado ( $[^3\text{H}]\text{RO15-1788}$ ) a una concentración de 2 nM durante 60 minutos a 4°C.
3. Con el fin de eliminar el ligando unido inespecíficamente, los portaobjetos se sumergieron 2 veces durante 2 minutos en la solución de pre-incubación a 4°C y posteriormente en agua destilada también a 4°C.

Después del lavado, los portaobjetos se secaron en una corriente de aire caliente y se colocaron en un *cassette*. Los cortes se expusieron a película autorradiográfica (Kodak BioMax MR) durante un periodo de unas 4 semanas, tras las cuales se procedió a su revelado.

### **3.8.2 Autorradiografía de $[^3\text{H}]\text{AMPA}$**

Para el marcaje de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA se utilizó el ligando tritiado  $[^3\text{H}]\text{AMPA}$  (Perkin Elmer, EE.UU), siguiendo el siguiente protocolo (Cremer et al., 2009):

1. Preincubación con tiocianato potásico 100 mM disuelto en tampón Tris-acetato 50 mM (pH 7,2) a 4°C. La pre-incubación se repitió 3 veces durante 10 minutos cada una de ellas.
2. A continuación, se realizó la incubación de los cortes con la misma solución añadiendo el ligando tritiado  $[^3\text{H}]\text{AMPA}$  (concentración final de 10 nM) durante 45 minutos a 4°C.
3. Por último, se lavaron 4 veces en el tampón de incubación durante 4 segundos cada vez y, posteriormente, 2 veces en una solución de glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 segundos.

Una vez que los cortes estuvieron secos, éstos se dispusieron en *cassettes* junto con una película autorradiográfica (KodaK BioMax MR) durante 12-14 semanas. Tras ese tiempo, se revelaron las películas de forma manual, tal como se menciona a continuación en el apartado correspondiente.

### 3.8.3 Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]MK801

Este ligando se une a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. El protocolo seguido fue el siguiente (Cremer et al., 2009):

1. Preincubación de los cortes en una solución de glutamato 50  $\mu$ M, glicina 30  $\mu$ M y espermidina 50  $\mu$ M en tampón Tris-HCl 50 mM, (pH 7,2) a 4°C.
2. Después de la pre-incubación, los cortes se sumergieron en la solución de incubación (50 M de glutamato, 30 M de glicina y 50 M de espermidina en tampón Tris clorhídrico 50 mM a pH de 7,2) con el ligando a ([<sup>3</sup>H]MK801 3,3 nM) durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Tras la incubación, se lavaron los cortes con la solución de incubación sin glutamato, 2 veces durante 5 minutos cada lavado y, finalmente, con agua destilada a 4°C durante 1 segundo.

Una vez finalizado el protocolo, los portaobjetos se secaron y se expusieron a una película Kodak BioMax MR durante unas 12 semanas antes de proceder al revelado.

### 3.8.4 Autorradiografía de [<sup>3</sup>H]Kainato

El [<sup>3</sup>H]-kainato se utilizó como ligando para la determinación autorradiográfica de los receptores del mismo nombre. Los cortes se pre-incubaron en una solución de tampón Tris citrato 50 mM y acetato cálcico 10 mM a pH de 7,1 a 4°C. La pre-incubación se repitió 3 veces durante 10 minutos cada repetición. Tras ese tiempo se incubaron los cortes en esa misma solución, esta vez con el ligando radiactivo a una concentración de 9,4 nM durante 45 minutos a 4°C. Una vez finalizada la incubación, se realizó el lavado en el tampón de incubación sin ligando, 3 veces durante 4 segundos a 4°C y otras 2 veces con glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 segundos cada una de ellas.

Tras el protocolo de incubación, los portaobjetos se secaron en estufa a 37°C. Una vez secos se pusieron en un *cassette* junto con una película fotográfica de

alta resolución. Tras 12 semanas de exposición, la película fue revelada de forma manual.

### **3.8.5 Revelado de las películas de ligandos tritiados**

Todas las películas autorradiográficas se revelaron manualmente siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Revelador (Agfa G153A/G153B) reconstituido según las instrucciones del fabricante: 5 min.
2. Lavado en agua corriente: 2 min.
3. Fijador (Agfa G354): 5 min.

Una vez reveladas las películas, éstas se colocaron en un transiluminador, para a continuación digitalizar los cortes con una cámara Leica DFC425, que estaba acoplada a una lupa binocular y conectada a un ordenador. Para la cuantificación, se obtuvieron imágenes a las que se substrajo el fondo. Por último, los valores de densidad óptica (DO) de las diferentes áreas cerebrales fueron medidos de manera que cada valor individual provenía de la media aritmética de 4 cortes diferentes. Estos pasos fueron llevados a cabo gracias a las funciones incorporadas en ImageJ 1.46r.

## **3.9 Análisis estadístico de los resultados**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (ESM). Para llevar a cabo las comparaciones entre los cuatro grupo experimentales, los datos fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías, seguidos por el test de Tukey como post-hoc test, en caso de encontrar diferencias significativas. El análisis de los estudios histoquímicos que evaluaban el efecto del tratamiento farmacológico (bien administración de fluoxetina, PCPA o del antagonista D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> SCH23390) sobre los marcadores de daño inducido por la

administración del agente convulsivante o sobre el periodo de latencia a las crisis, se realizó mediante el test de la t de Student. Por último, el análisis de la tasa de mortalidad fue llevado a cabo por el test z para evaluación de frecuencias y proporciones.

En cualquier caso, se consideró que las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Sigmaplot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, EE.UU.).

***4 EFECTOS DE LA MODULACIÓN  
SEROTONÉRGICA EN EL DAÑO  
CEREBRAL INDUCIDO POR EL  
MODELO DE LITIO-PILOCARPINA***

---



El conocimiento del papel de la 5-HT y el de los agentes que aumentan la actividad serotoninérgica en el control de la epileptogénesis todavía es controvertido (Theodore, 2003). Así, por ejemplo, los fármacos antidepresivos que aumentan la disponibilidad de monoaminas en la hendidura sináptica se han asociado con efectos tanto pro-convulsivos como anticonvulsivos, aunque es mayoritaria la opinión de que presentan efectos antiepilépticos (Favale et al., 2003; Hamid y Kanner, 2013; Jobe y Browning, 2005).

Se han llevado a cabo dos estudios, uno primero con el objetivo de dilucidar los efectos del ISRS fluoxetina administrada subcrónicamente (con el fin de aumentar los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica) y posteriormente los efectos del PCPA, inhibidor irreversible de la enzima triptófano-hidroxilasa (para reducir los niveles de este neurotransmisor) sobre el eventual hipometabolismo inducido por el modelo de litio-pilocarpina.

El modelo de litio-pilocarpina se caracteriza por un estado de SE seguido de un período latente de aproximadamente 30 días en el que generaliza un hipometabolismo cerebral (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009; Lee et al., 2012) y daños neuronales que aparecen principalmente en el hipocampo (Mello et al., 1993; Müller et al., 2014; Rossi et al., 2013; Wang et al., 2008; Wei et al., 2015). En cuanto a la actividad metabólica, el hipometabolismo cerebral aparece poco después del inicio del SE, volviendo a los valores basales en el período subagudo (Lee et al., 2012).

#### **4.1 Estudio de la administración subaguda de fluoxetina sobre el daño hipocampal inducido por pilocarpina**

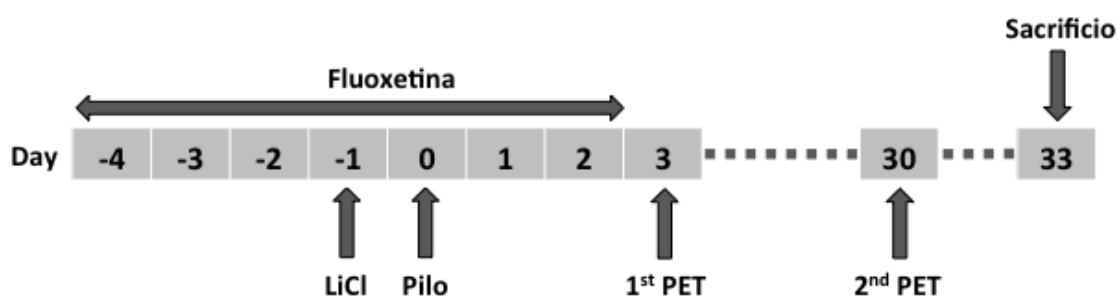
Este estudio tuvo como objetivo estudiar los efectos farmacológicos de un tratamiento subagudo con fluoxetina (ISRS prototipo) sobre las alteraciones metabólicas e histoquímicas descritas que tienen lugar en el modelo de litio-pilocarpina de SE en ratas. En primer lugar, y antes de proceder a evaluar un posible efecto neuroprotector de la fluoxetina, estos estudios tenían como

objetivo replicar el hipometabolismo a corto plazo previamente descrito (Lee et al., 2012).

Con este fin, tal como se ha mencionado en la sección de materiales y métodos los animales se dividieron en 4 grupos experimentales:

- Grupo **VEH+SAL** (n=9).
- Grupo **FLUOX+SAL** (n=9).
- Grupo **VEH+PILO** (n=17).
- Grupo **FLUOX+PILO** (n=17).

El protocolo experimental seguido es el esquematizado en la siguiente Fig. 20:



**Fig. 20.** Protocolo experimental seguido para evaluar el efecto de la administración subaguda de fluoxetina sobre los efectos inducidos por el modelo de litio-pilocarpina.

De forma resumida, la fluoxetina (10 mg/kg; i.p. x 7d) se administró 4 días antes y 2 días después del SE, que se indujo por la administración intraperitoneal de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). Los estudios [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET se realizaron en el día 3 y día 30 con el fin de evaluar las eventuales alteraciones metabólicas que tienen lugar tanto en la fase inicial (día 3), así como en la fase final (día 30) del periodo silente. Una vez finalizados los estudios PET, los animales fueron sacrificados (día 33) para evaluar diferentes marcadores de daño neuronal.

### 4.1.1 Resultados

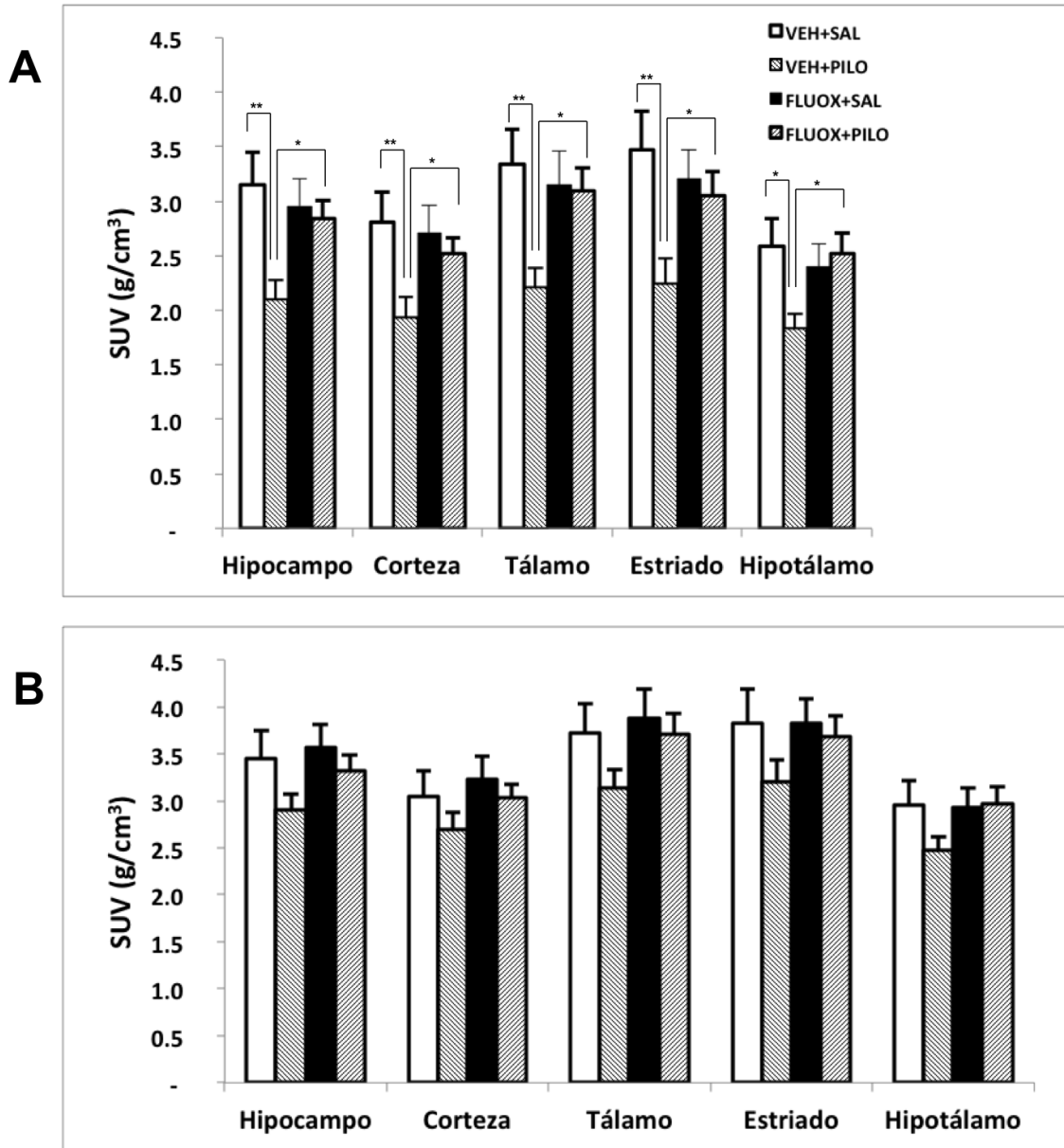
#### Metabolismo de la glucosa cerebral mediante [<sup>18</sup>F]FDG-PET

Los animales tratados con litio-pilocarpina (grupo VEH+PILO) mostraron un hipometabolismo cerebral generalizado, cuando se analizó 3 días después de la inducción de las crisis (Fig. 21A). De esta manera, la pilocarpina causó una reducción significativa del metabolismo en todas las áreas cerebrales analizadas ( $p < 0,05$  en hipotálamo;  $p < 0,01$  en el resto de las áreas) en comparación con el grupo control (VEH+SAL). Esta reducción de la captación de [<sup>18</sup>F]FDG fue de aproximadamente un 30% en la mayor parte de las áreas cerebrales analizadas. En concreto, la disminución de la captación de [<sup>18</sup>F]FDG (en unidades de SUV) alcanzó un 33,2% y 33,1% en hipocampo y corteza, respectivamente. Al analizar los efectos a medio plazo (día 30 después del insulto), aunque se observó una tendencia al hipometabolismo cerebral, no se encontraron diferencias significativas en ninguna región en comparación con el grupo control (Fig. 22B);  $p > 0,05$ ), indicando una recuperación de la actividad metabólica cerebral.

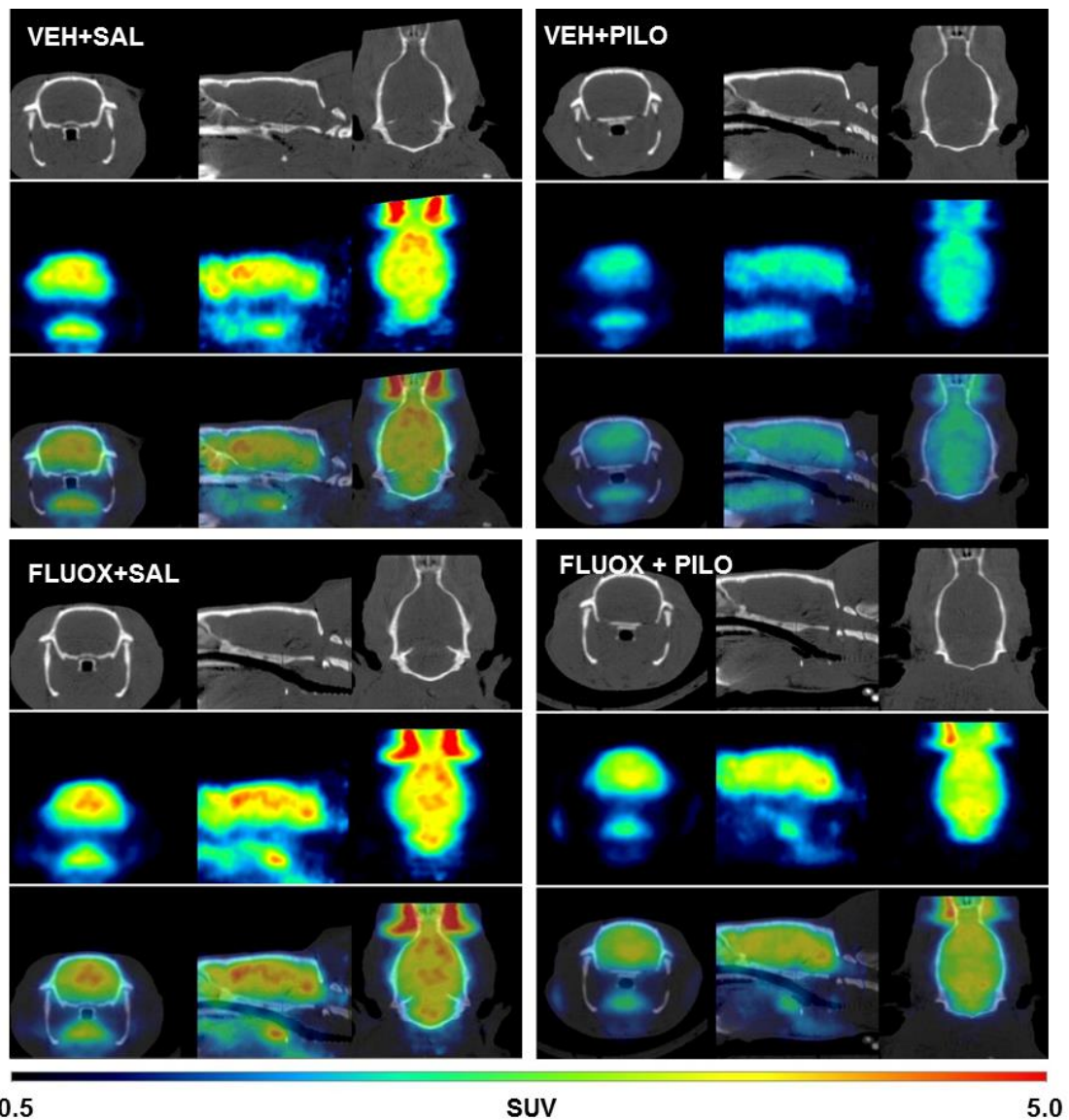
En cuanto a los efectos de la fluoxetina (grupo FLUOX+SAL), cuando éste fármaco se administró durante 7 días (10 mg/kg/día), no modificó el metabolismo de la glucosa cerebral en ninguna de las regiones cerebrales analizadas, tanto en el día 3 como en el día 30 (Fig. 21A y B) cuando se comparó con el grupo control. Así, el grupo FLUOX+SAL no mostró diferencias significativas en los valores de [<sup>18</sup>F]FDG SUV en comparación con el grupo control (VEH+SAL) en los dos puntos temporales analizados (Fig. 21A y B). Por ejemplo, a nivel del hipocampo los valores de SUV en el día 3 fueron los siguientes: SUV<sub>hipocampo</sub> grupo VEH+SAL (control) =  $3,15 \pm 0,30$  g/ml vs. grupo FLUOX+SAL =  $2,96 \pm 0,25$  g/ml;  $p > 0,05$ ).

Aunque la fluoxetina no indujo por sí misma alteraciones metabólicas, en cambio sí que se observó que la administración subcrónica de la misma evitó el hipometabolismo a corto plazo (en el día 3) inducido por la inyección de pilocarpina ( $p < 0,01$ ) en todas las regiones cerebrales estudiadas (Fig. 21A). De nuevo, refiriéndonos al día 3, SUV<sub>hipocampo</sub> grupo VEH+PILO =  $2,10 \pm 0,18$  g/ml

vs. grupo FLUOX+PILO =  $2,84 \pm 0,17$  g/ml;  $p < 0,05$ ). Tal como se muestra en la Fig. 21A, los animales inyectados con pilocarpina a los que se administró subagudamente fluoxetina (grupo FLUOX+PILO) mostraron valores de [ $^{18}$ F]FDG SUV similares a las ratas que no fueron inyectadas con pilocarpina (grupo FLUOX+SAL).



**Fig. 21.** Cambios en el metabolismo de la glucosa cerebral regional (evaluado por PET) en los diferentes grupos experimentales en el día 3 (A) y en el día 30 (B) después de la administración de pilocarpina (o solución salina). La fluoxetina (o vehículo) se administró de forma subaguda durante 7 días (desde el día -4 al día 2). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4-8$  ratas/grupo; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA de dos vías).

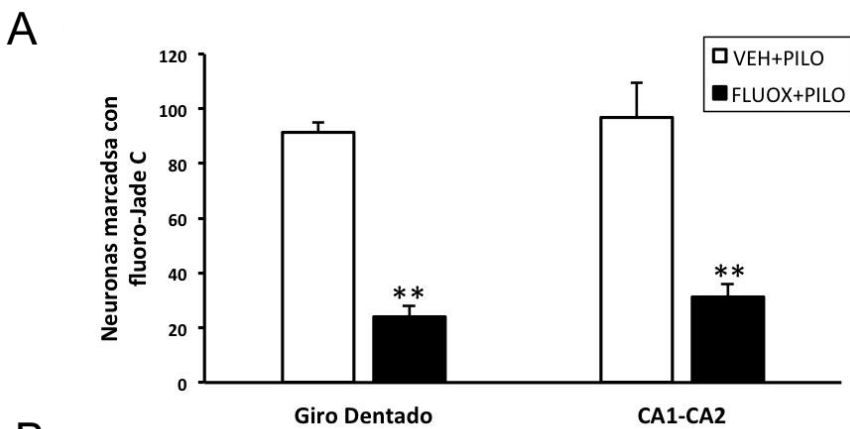


**Fig. 22.** Imágenes representativas de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  PET (vistas coronal, sagital y trans-axial) 3 días después del SE de los diferentes grupos experimentales. Se puede observar la reversión producida por fluoxetina del hipometabolismo cerebral a corto plazo inducido por pilocarpina. Las filas superiores muestran las imágenes TAC; las filas del medio muestran las imágenes PET (escaladas a SUV) y las filas inferiores muestran la fusión de ambas imágenes tomográficas.

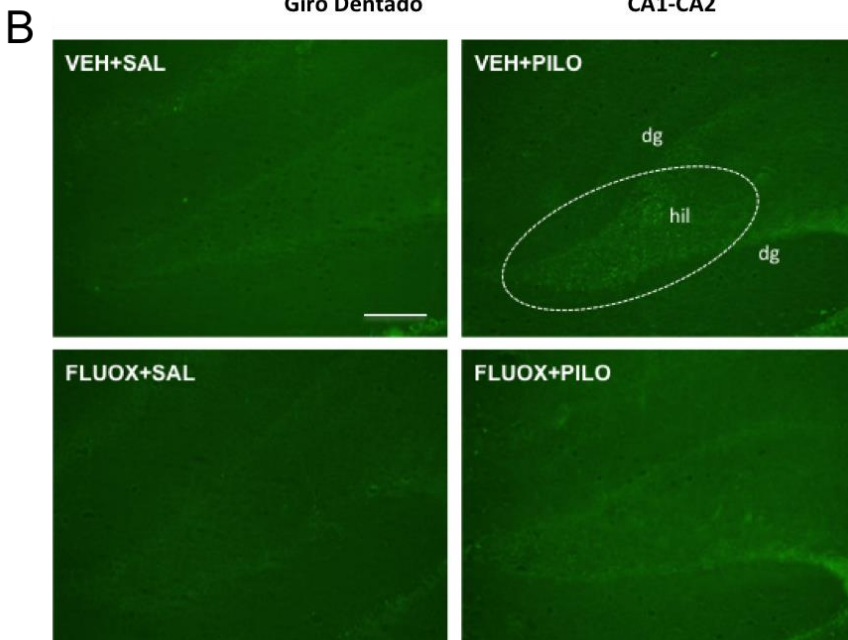
### Evaluación de la neurodegeneración mediante tinción con Fluoro-Jade C

Los resultados obtenidos con la tinción con Fluoro-Jade C muestran claros signos de neurodegeneración a los 33 días después de la administración de pilocarpina. Esta respuesta fue marcada en el área del hipocampo, como se

muestra en las micrografías de fluorescencia (Fig. 23B). Además, cuando se realizó el análisis cuantitativo (Fig. 23A), se pudo determinar que la administración de fluoxetina disminuyó significativamente el número de células marcadas con Fluoro-Jade C, tanto en el hilo (reducción del 73,5%;  $p < 0,01$ ) como en las regiones CA1-CA2 del hipocampo (reducción del 66,7%;  $p < 0,01$ ). Como era de esperar, las ratas que no recibieron pilocarpina (grupos VEH+SAL y FLUOX+SAL) no mostraron signos de neurodegeneración ya que no se observaron células marcadas con Fluoro-Jade C (Fig. 23B).



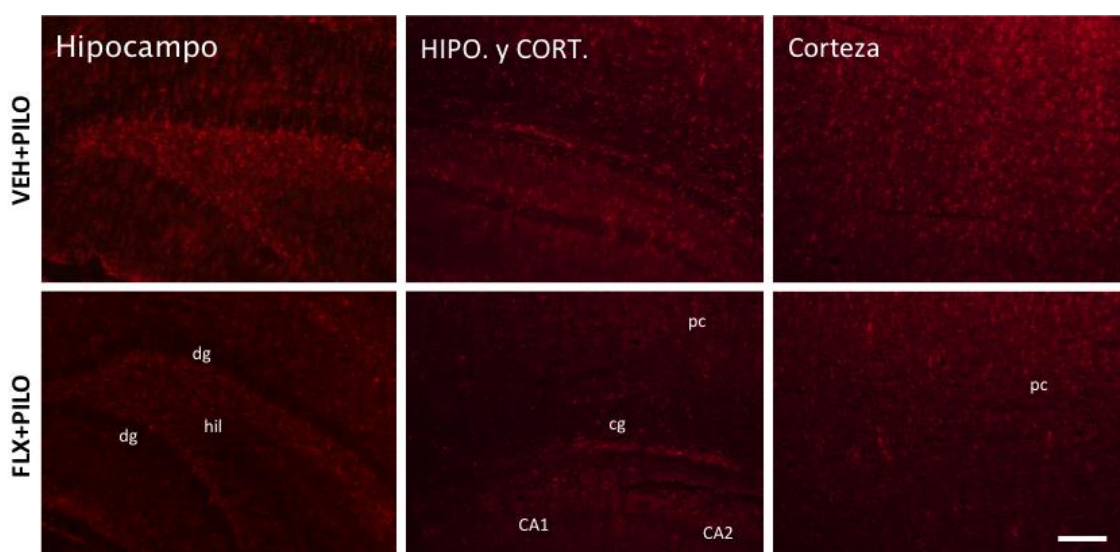
**Fig. 23.** (A) La cuantificación de la neurodegeneración inducida por pilocarpina se evaluó contando células positivas para Fluoro-Jade C en el giro dentado y en las áreas CA1-CA2. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 7$  ratas/grupo;  $**p < 0,01$ ; Student t-test).



(B) Micrografías representativas de fluorescencia con Fluoro-Jade C a nivel del giro dentado/región hilar de los cuatro grupos experimentales. Las imágenes muestran células Fluoro-Jade C positivas en el área del *hilus* después de la administración de pilocarpina, siendo este efecto evitado por la administración de fluoxetina. hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

### Inmunohistoquímica de GFAP

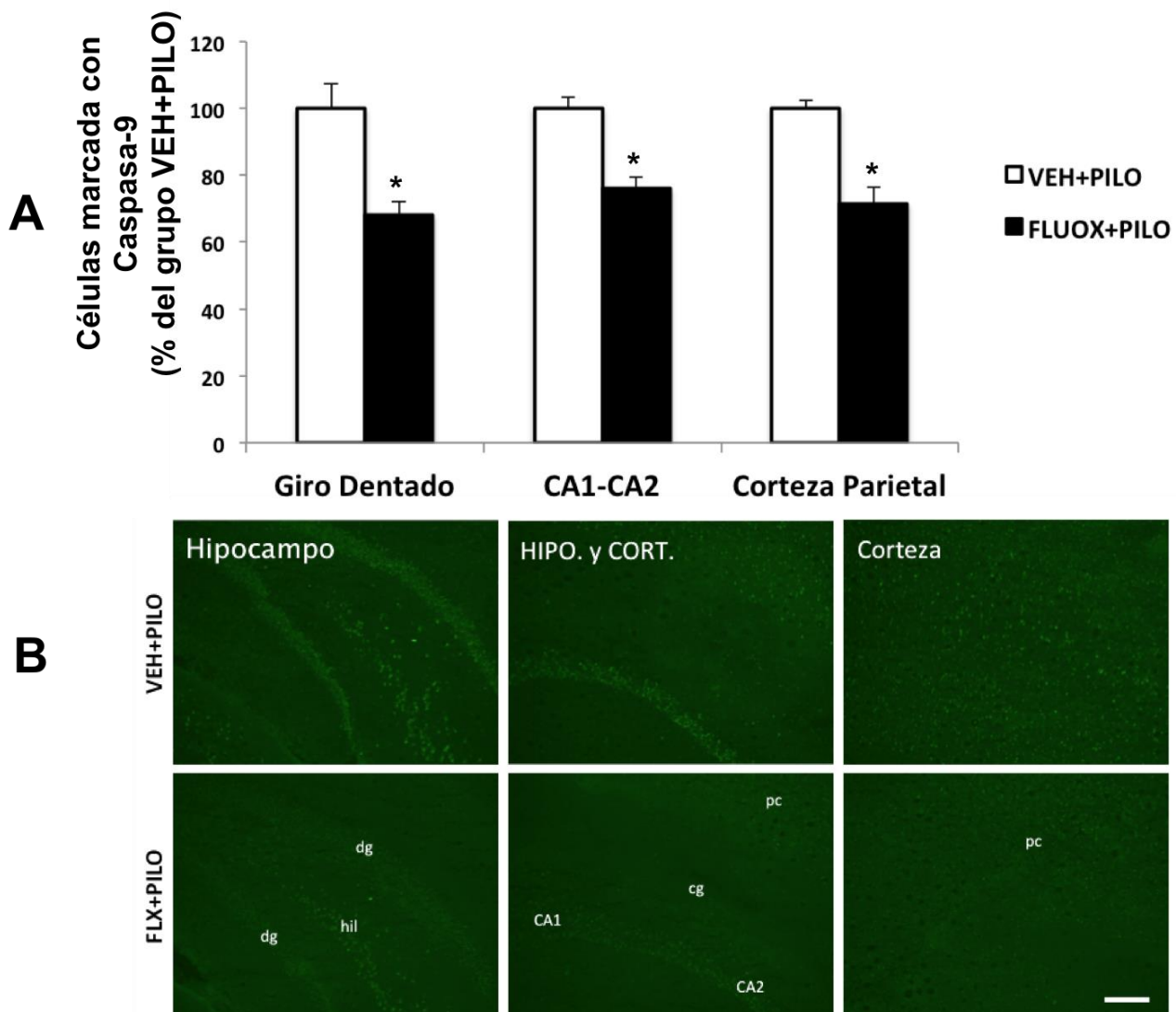
Con el fin de evaluar la activación astrogliar asociada al eventual daño cerebral inducido por el SE y su eventual modificación por la administración de fluoxetina, se llevó a cabo inmunohistoquímica de GFAP. Como se muestra en la fila superior de la Fig. 24, se detectó un incremento en el inmunomarcaje de GFAP tanto en corteza parietal como en hipocampo (giro dentado, *hilus*, y áreas CA1 y CA2), 33 días después de la administración de pilocarpina. Esta gliosis reactiva observada en estas áreas cerebrales se redujo de manera evidente cuando se administró fluoxetina (Fig.24; fila inferior). Como era de esperar, no se observó activación glial en ratas que no recibieron pilocarpina (grupos VEH+SAL y FLUOX+SAL).



**Fig. 24.** Inmunohistoquímica de GFAP en cortes de cerebro coronales a nivel del hipocampo dorsal y la corteza parietal, 33 días después de la inyección de pilocarpina. Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de cortes de cerebro coronales a nivel hipocampal de giro dentado (columna izquierda), sectores CA1 CA2 (columna central) y corteza parietal (columna derecha) en ratas tratadas con pilocarpina (fila superior) y ratas tratadas previamente con fluoxetina (fila inferior). Se observa una fuerte activación glial generada por la pilocarpina, la cual se redujo por la administración subaguda de la fluoxetina. hil: *hilus*, dg: giro dentado, cg: Cíngulo, pc: corteza parietal. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

### Inmunohistoquímica de Caspasa-9

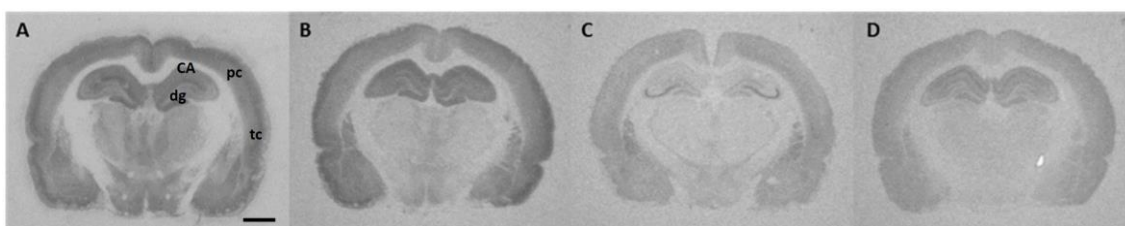
La inmunohistoquímica de caspasa-9 se llevó a cabo para valorar una eventual activación de la vía mitocondrial de la apoptosis inducida por el SE generado por el modelo del litio-pilocarpina. Como se muestra en las micrografías de fluorescencia (Fig. 25B), se produjo un aumento evidente de la expresión de caspasa-9 en corteza e hipocampo, cuando se evaluó en el día 33. Esta sobreexpresión se redujo notablemente en aquellos animales a los que se administró fluoxetina durante 7 días (Fig. 25B). El análisis cuantitativo de las mismas (Fig. 25A), mostró una disminución estadísticamente significativa en el número de células inmunomarcadas de caspasa-9 tanto en hipocampo como en corteza en el grupo FLUOX+PILO cuando se comparó con el grupo VEH+PILO (reducción de 31,8% en giro dentado; 24,0% en las áreas de CA1-CA2; y 28,6 9% en corteza parietal;  $p<0,05$ ). Como ocurrió en la evaluación de la neurodegeneración y la gliosis, los animales que no fueron inyectados con pilocarpina apenas mostraron expresión de caspasa-9.



**Fig. 25.** A) Cuantificación de células inmunorreactivas de caspasa-9 que muestra el efecto de la administración subaguda de fluoxetina en ratas tratadas con pilocarpina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  ratas/grupo;  $*p < 0,05$ ; Student t-test). (B) Las imágenes de inmunohistoquímica de caspasa-9 representan cortes de cerebro coronales a nivel hipocampal de giro dentado (columna izquierda), sectores CA1 CA2 (columna central) y corteza parietal (columna derecha) de ratas tratadas con pilocarpina (fila superior) y ratas previamente administradas con fluoxetina (fila inferior). El aumento de las células inmunorreactivas de caspasa-9 inducido por pilocarpina se ve disminuido de manera significativa por la administración subaguda de fluoxetina. hil: *hilus*, dg: giro dentado, cg: Cíngulo, pc: corteza parietal. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

### Autorradiografía cuantitativa de los receptores GABA<sub>A</sub> e ionotrópicos de glutamato

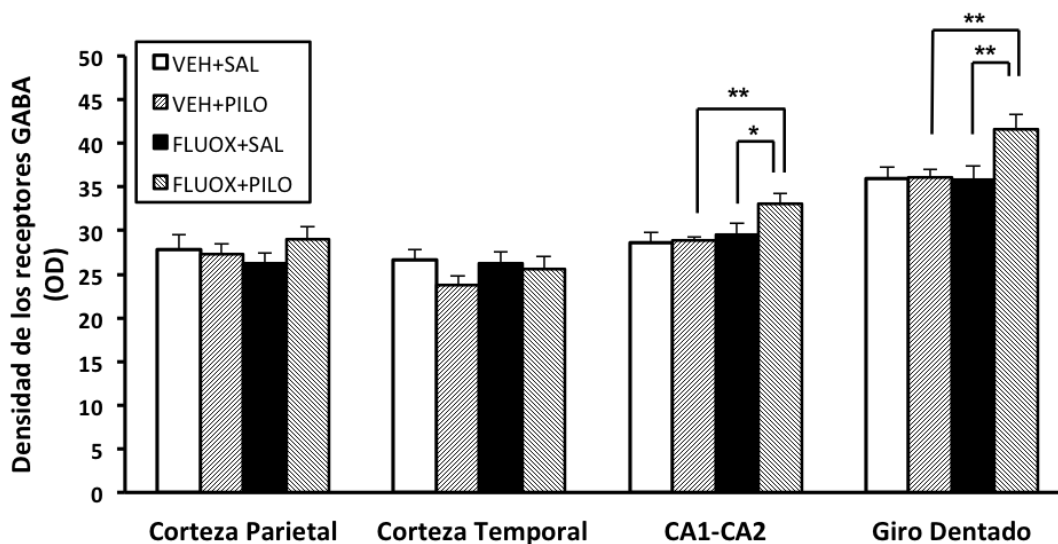
Con el fin de evaluar posibles alteraciones en la expresión de receptores GABAérgicos y glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA, kainato y NMDA) se realizaron estudios autorradiográficos. Para ello, y tal como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos se usaron los siguientes ligandos tritiados: [<sup>3</sup>H]Flumazenilo (receptor GABA<sub>A</sub>), [<sup>3</sup>H]AMPA (receptor AMPA), [<sup>3</sup>H]kainato (receptor de kainato) y [<sup>3</sup>H]MK801 (receptor NMDA). La Fig. 26 muestra autorradiogramas representativos de cortes del cerebro coronales a nivel de bregma -3,30 mm, mostrando el patrón de distribución de los cuatro receptores diferentes ensayados. Como se puede observar, presentan una elevada expresión a nivel cortical e hipocampal



**Fig 26.** Autorradiogramas representativos de secciones coronales a nivel de bregma -3,30 mm que muestran el patrón de distribución regional de los receptores de (A) GABA<sub>A</sub>, (B) AMPA, (C) kainato y (D) NMDA, tal como son detectados por autorradiografía. pc: corteza parietal; tc: corteza temporal; CA: áreas CA1-CA2; dg; giro dentado. Barra de escala: 2 mm.

La densitometría de las autorradiografías con [<sup>3</sup>H]Flumazenilo mostró que la administración de pilocarpina (25 mg/kg, i.p.) no modificó la expresión del receptor GABA<sub>A</sub> en ningún área estudiada, cuando se evaluó 33 días después de la inducción de la epileptogénesis (Fig. 27). Por otra parte, se encontraron incrementos en dicha expresión, estadísticamente significativos, en las áreas CA1-CA2 (12,3%) y en giro dentado (16,2%) en el grupo de animales tratados subcrónicamente con fluoxetina y que posteriormente fueron inyectados con pilocarpina (grupo FLUOX+PILO) en comparación con los animales tratados con fluoxetina y sin pilocarpina (grupo FLUOX+SAL), tal como se muestra en la Fig.

27. En el caso de los receptores ionotrópicos de glutamato (kainato, AMPA y NMDA), no encontramos diferencias en la expresión con ningún tratamiento farmacológico y en ninguna región de las analizadas.



**Fig. 27.** Cuantificación de la densidad de receptores GABA<sub>A</sub> en corteza parietal, corteza temporal, CA1-CA2 y giro dentado de los cuatro grupos experimentales según la evaluación de la autorradiografía de [3H] flumazenilo. Los datos se expresan como la media del porcentaje del grupo VEH+SAL ± SEM. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA de dos vías).

### Tasa de mortalidad

Se calculó la tasa de mortalidad durante las primeras 24 h después de la inducción de SE y justo antes del segundo estudio [<sup>18</sup>F]FDG-PET (que se llevó a cabo el día 30). Como se muestra en la Tabla 2, y tal como está descrito en la bibliografía, este modelo está asociado a una elevada tasa de mortalidad, que principalmente tiene lugar en el periodo crítico de las primeras 24 horas tras el SE. En cuanto a los efectos de la administración de fluoxetina, aunque se observa una tendencia a la reducción de la mortalidad (del 59% al 33% al final del estudio; día 30), una vez realizado el análisis estadístico, la diferencia en la

tasa de mortalidad encontrada entre los grupos VEH+PILO y FLUOX+PILO no fue estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ).

**Tabla 2.** Efecto del tratamiento a corto plazo de fluoxetina en las tasas de mortalidad medidas a las 24 horas y 30 días después de la administración de pilocarpina

Grupo	Número de ratas experimentales	Ratas supervivientes (primeras 24 h)	Ratas supervivientes (30 días)	Mortalidad total
VEH+PILO	17	10	7	10/17 (59%)
FLUOX+PILO	17	12	11	6/17 (35%)

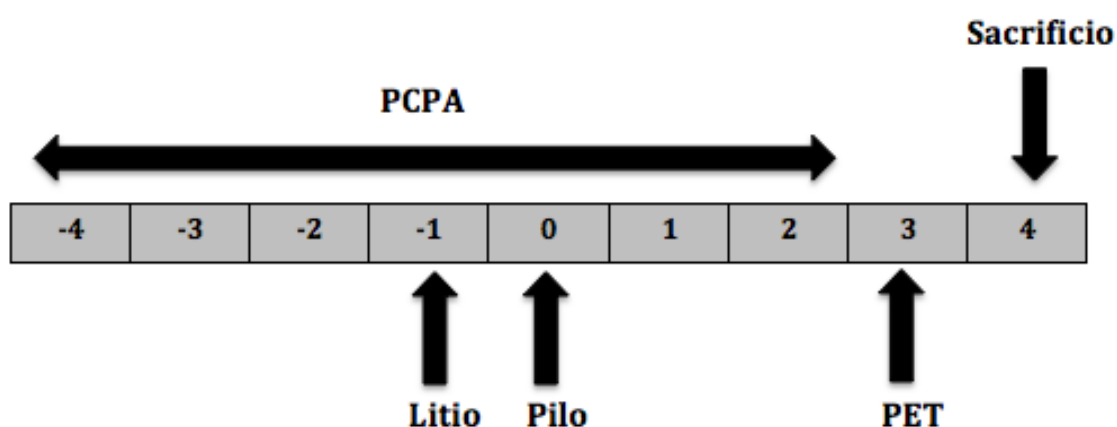
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales ( $p>0,05$ ; z-test for rates and proportions, tasas y proporciones).

#### 4.2 Estudio del eventual efecto de la depleción de 5-HT por administración de PCPA sobre el daño hipocampal inducido por pilocarpina

Una vez analizados los datos de la administración de fluoxetina y demostrado y efecto neuroprotector de este ISRS (y eventualmente de la 5-HT) frente al daño inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE, se llevó a cabo un estudio similar pero con un protocolo en el que se produjera una disminución de la actividad serotoninérgica cerebral, con el fin de adquirir un conocimiento del control serotoninérgico en este modelo experimental de epilepsia. Ya que los resultados obtenidos con el estudio anterior y los publicados por otros grupos apuntaban que el hipometabolismo inducido por la pilocarpina es de corta duración, retornando a valores basales 7 días después del insulto (Lee et al., 2012), decidimos realizar un único estudio PET en el día 3, para sacrificar a los animales un día después (Fig. 28).

Por ello, el principal objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la depleción de 5-HT sobre el hipometabolismo cerebral a corto plazo y en las alteraciones histoquímicas evocadas por la administración de pilocarpina en ratas. Para ello, se administró *p*-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la

enzima triptófano hidroxilasa (Koe y Weissman, 1966), a ratas sometidas a SE por administración de litio-pilocarpina. Con el fin de que la depleción de 5-HT estuviera presente antes y después del SE, la PCPA (125 mg/kg, 7 d) se administró 4 días antes y 2 días después la inyección de pilocarpina. La actividad metabólica cerebral se evaluó *in vivo* mediante [<sup>18</sup>F]FDG-PET, mientras que la neurodegeneración por la tinción de Fluoro-Jade C y la gliosis reactiva mediante inmunohistoquímica de GFAP. Todos los protocolos están descritos en los apartados correspondientes en la sección “Material y Métodos” de la presente Tesis Doctoral.



**Fig. 28.** Protocolo experimental del estudio del efecto de la depleción de 5-HT sobre el hipometabolismo y el daño neuronal inducido por pilocarpina. PCPA (125 mg/kg; i.p.) se administró 4 días antes y 2 días después de la administración intraperitoneal de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). Los estudios [<sup>18</sup>F]FDG PET se realizaron en el día 3.

De forma análoga al estudio anterior, las ratas se dividieron en cuatro experimentales:

- Grupo **VEH+SAL** (n=7).
- Grupo **PCPA+SAL** (n=7).
- Grupo **VEH+PILO** (n=12).
- Grupo **PCPA+PILO** (n=12).

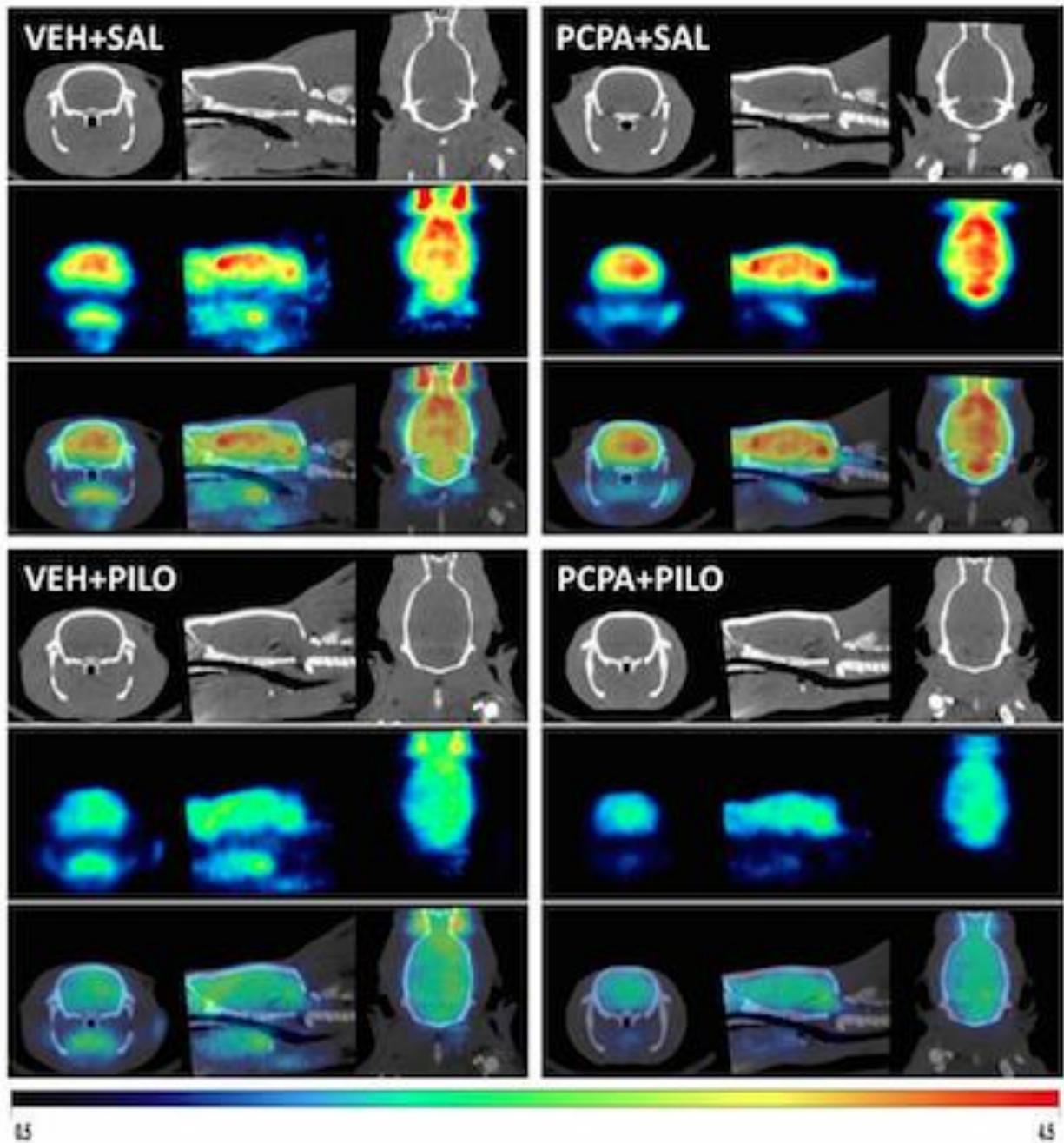
## 4.2.1 Resultados

### Metabolismo de la glucosa cerebral mediante [<sup>18</sup>F]FDG PET

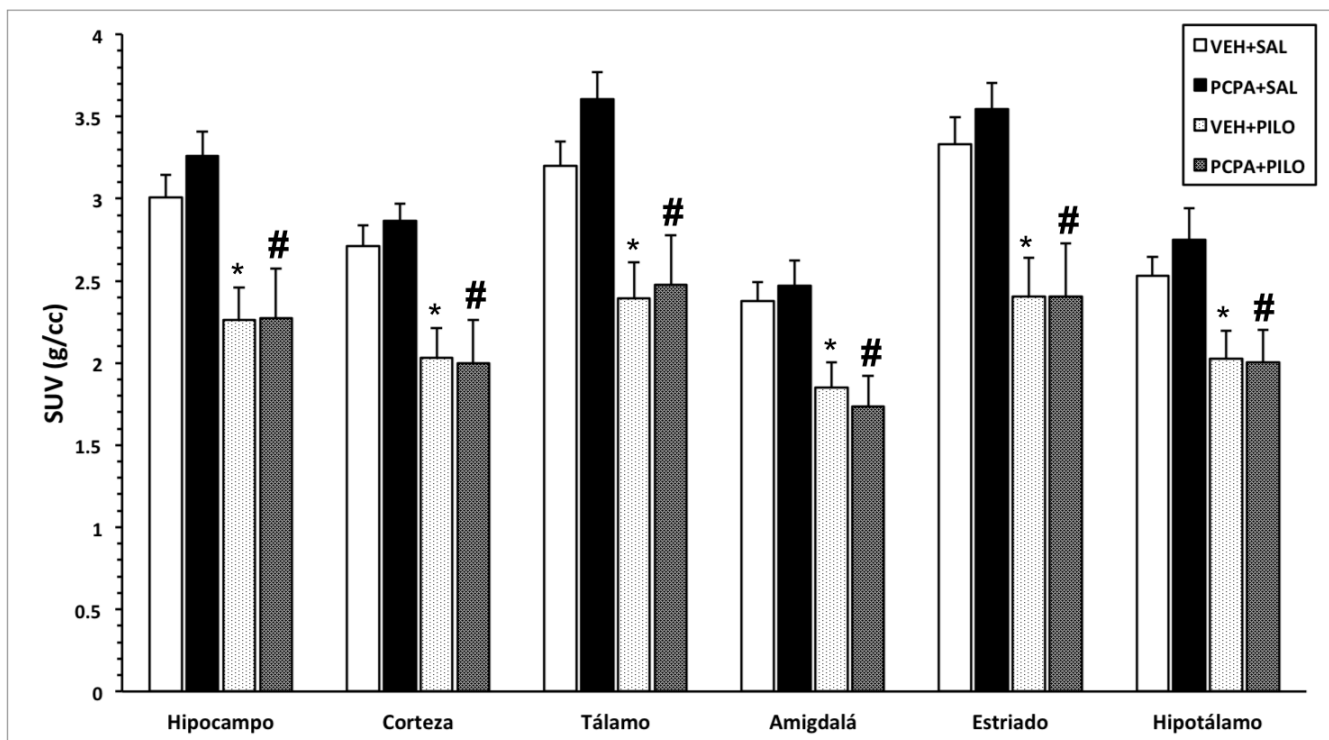
En la Fig. 29 se muestran imágenes fusionadas PET/CT, representativas de los cuatro grupos experimentales. El análisis cuantitativo de los resultados mostró un hipometabolismo de glucosa estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), tres días después de la administración de pilocarpina (grupo VEH+PILO), en todas las regiones cerebrales analizadas (Fig. 30), de magnitud similar a la obtenida en el anterior estudio realizado con fluoxetina y a la bibliografía existente (Goffin et al., 2009, Guo et al., 2009, Lee et al., 2012). La reducción del metabolismo glucídico fue aproximadamente un 20%. Así, el SUV se redujo desde un 19,9% en hipotálamo hasta un máximo de 27,8% en cuerpo estriado. Cuando se analizó el hipocampo, esta reducción alcanzó el 24,7%.

Con respecto al efecto de la depleción de 5-HT sobre la actividad metabólica cerebral, el tratamiento con PCPA no modificó la captación de [<sup>18</sup>F]FDG basal ( $p > 0,05$ , Fig. 30). Por ejemplo, en hipocampo,  $SUV_{VEH+SAL} = 3,00 \pm 0,14$  g/ml, mientras que  $SUV_{PCPA+SAL} = 3,26 \pm 0,15$  g/ml ( $p > 0,05$ ).

Por último, además de la falta de efectos de la administración de PCPA sobre la captación cerebral de [<sup>18</sup>F]FDG, el hipometabolismo a corto plazo inducido por pilocarpina (grupo VEH+PILO) tampoco se vió alterado por la depleción de 5-HT (grupo PCPA+PILO). Por ejemplo, en hipocampo:  $SUV_{VEH+PILO} = 2,26 \pm 0,20$  g/ml vs.  $SUV_{PCPA+PILO} = 2,27 \pm 0,30$  g/ml ( $p > 0,05$ ).



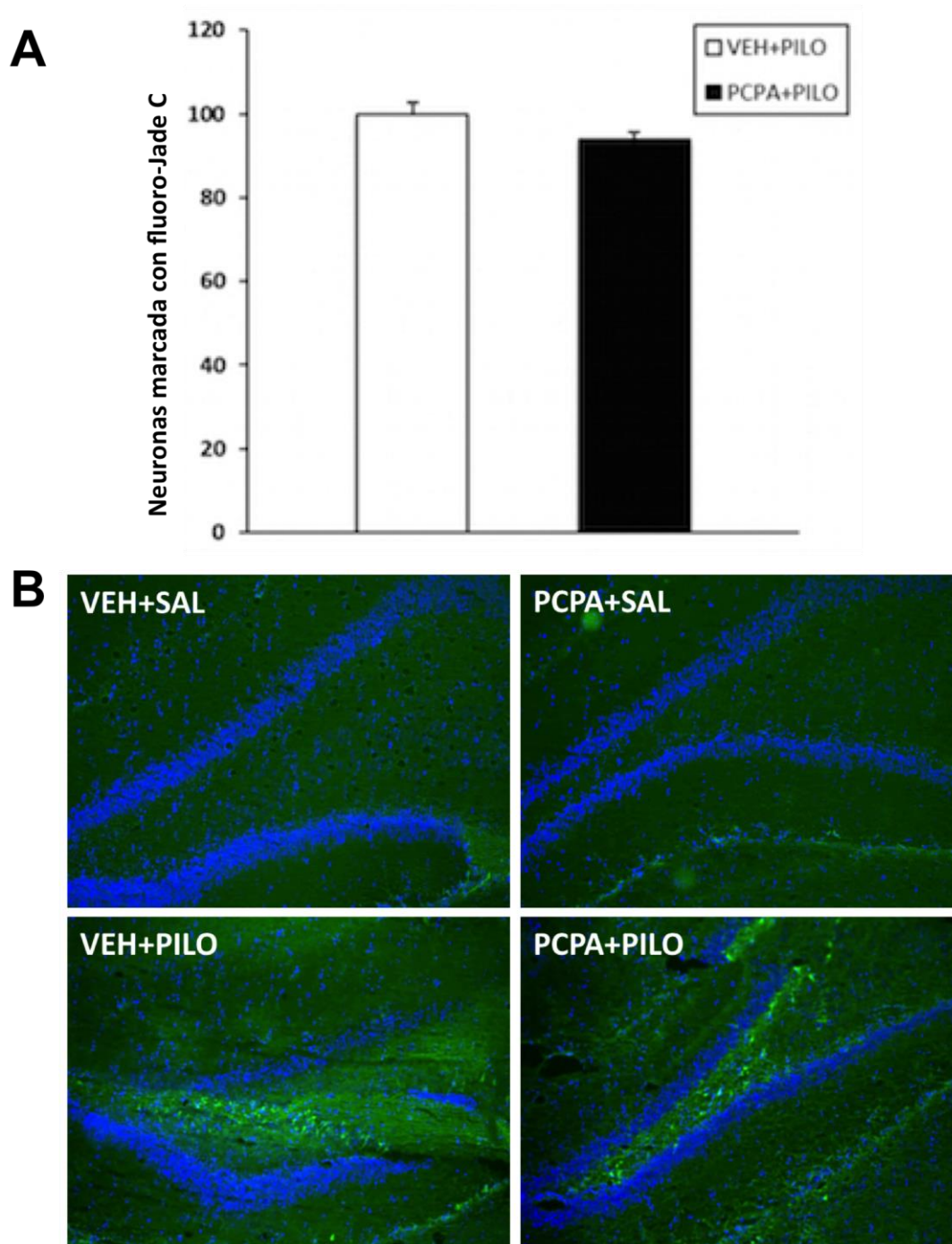
**Fig. 29.** Imágenes representativas de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET (vistas coronal, sagital y trans-axial) 3 días después del SE de los diferentes grupos experimentales. Se puede observar el hipometabolismo generalizado inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE (grupo VEH+PILO) y que éste no se afectó por la administración subaguda de PCPA (grupo PCPA+PILO). Por otra parte, la captación basal de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  no se afectó por la depleción de 5-HT (grupo PCPA+SAL). Las filas superiores muestran las imágenes TAC; las filas del medio muestran las imágenes PET (escaladas a SUV) y las filas inferiores muestran la fusión de ambas imágenes tomográficas.



**Fig. 30.** El hipometabolismo cerebral a corto plazo inducido por pilocarpina no fue modulado por la depleción de 5-HT cuando se evaluó 3 días después del SE. El metabolismo de la glucosa cerebral regional [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET (en unidades de SUV, "Standardized Uptake Value") se evaluó 3 días después del SE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. VEH+SAL (n = 11), PCPA+SAL (n = 4), VEH+PILO (n = 11), PCPA+PILO (n = 7). \* $p < 0,05$  vs. grupo VEH+SAL, # $p < 0,05$  vs. grupo VEH+PILO; ANOVA de dos vías.

### Evaluación de la neurodegeneración mediante la tinción de Fluoro-Jade C

La administración de litio-pilocarpina produjo una neurodegeneración notable en la región hilar del hipocampo, según la tinción con Fluoro-Jade C (Fig. 31B). Estos resultados muestran que la neurodegeneración que tiene lugar por el SE inducido por este modelo experimental es de aparición temprana (día 4). Por otra parte, los resultados obtenidos en el experimento previo con fluoxetina, en el que las ratas fueron sacrificadas 33 días después del SE, indican que la neurodegeneración se mantiene durante todo el periodo silente.



**Fig 31.** Efecto del tratamiento con PCPA en la neurodegeneración inducida por litio-pilocarpina 4 días después de la lesión. **(A)** La cuantificación de la neurodegeneración inducida por pilocarpina en el hilo se evaluó contando neuronas marcadas con Fluoro-Jade C. Los datos se expresan como porcentaje de la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$  ratas/grupo) del grupo VEH+PILO. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales ( $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías). **(B)** Micrografías representativas de fluorescencia DAPI/Fluoro-Jade C a nivel del giro dentado/hilio del hipocampo de los cuatro grupos experimentales. Las imágenes muestran neurodegeneración en el hilus 4 días después del inicio del SE, y que no fue por la administración de PCPA. hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 250 micras.

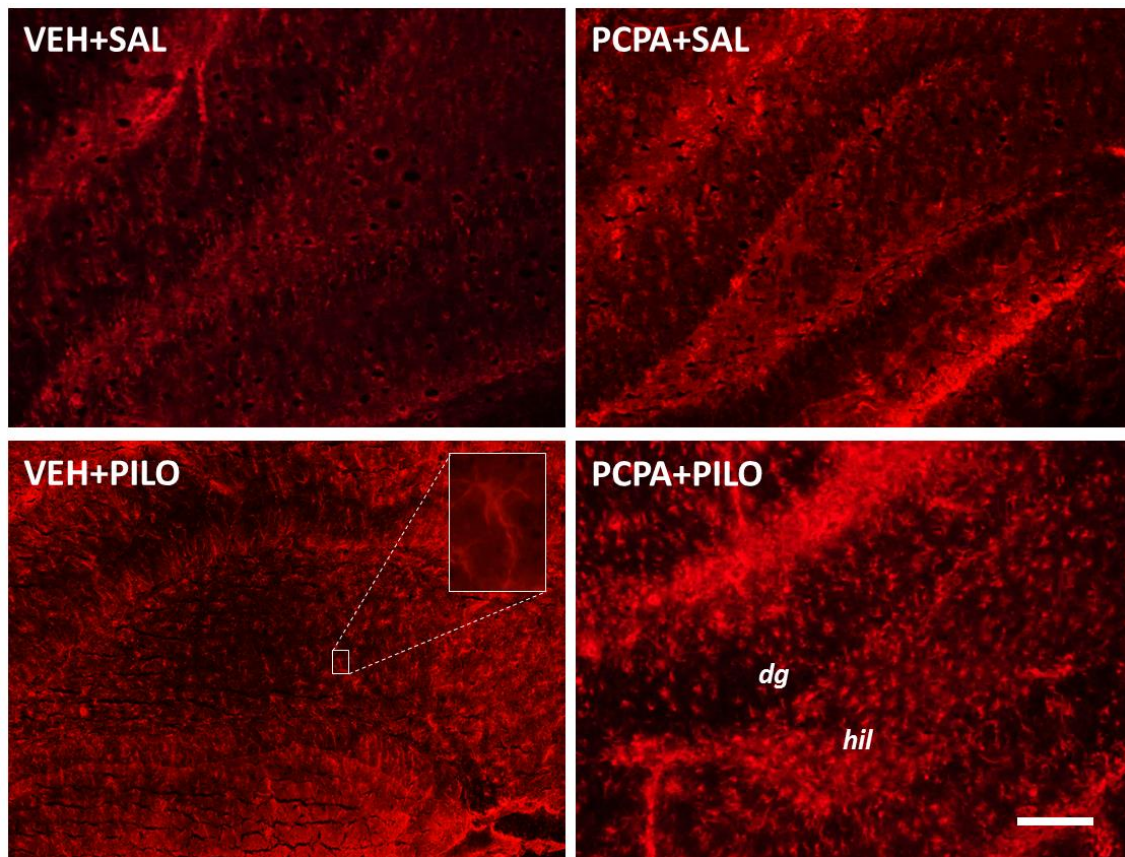
Este marcador de neurodegeneración no se vio afectado por el tratamiento con PCPA (Fig. 31A y B;  $p>0,05$ ). Como era de esperar, las ratas no tratadas con pilocarpina no mostraron signos de neurodegeneración (grupos; VEH+SAL y PCPA+SAL; Fig. 31B). Este último resultado muestra que a corto plazo, la depleción de 5-HT cerebral por una administración de prolongada de PCPA, no indujo por sí misma neurodegeneración hipocampal.

### Inmunohistoquímica de GFAP

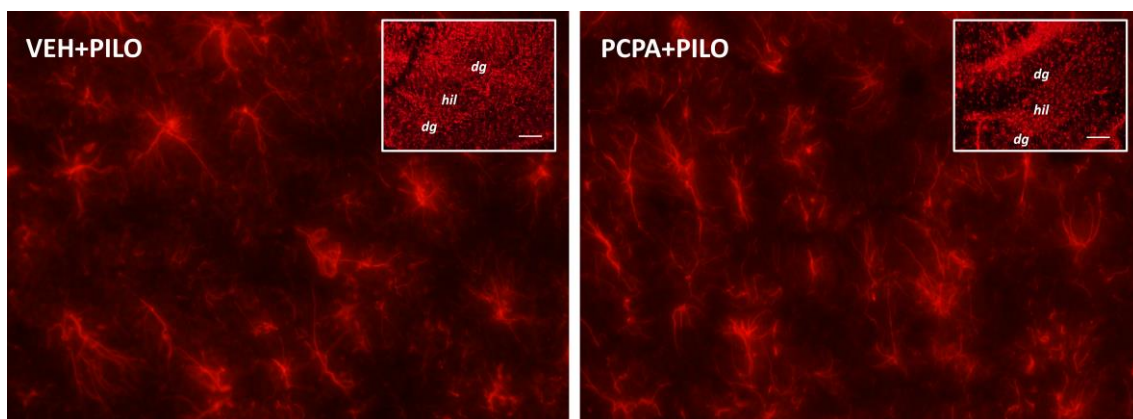
Se realizó estudio de inmunohistoquímica de GFAP con el fin de evaluar:

1. Si el daño temprano neuronal estaba asociado a una reacción glial temprana. Los estudios con fluoxetina habían mostrado que dicha reacción se mantenía al menos 33 días después del insulto.
2. Una posible modulación de la astrogliosis inducida por el SE por la depleción de 5-HT.

Nuestros resultados muestran una intensa gliosis en las áreas del *hilus* y el giro dentado 3 días después de la administración de pilocarpina (Fig. 32 y 33). Por otra parte, Además, las micrografías muestran que esta respuesta glial inducida por pilocarpina no fue modulada por el tratamiento subagudo con PCPA, ni incrementando ni reduciendo dicha respuesta. Por otra parte, las ratas que no recibieron pilocarpina (grupos VEH+SAL y PCPA+SAL) mostraron niveles muy bajos de inmunomarcaje de GFAP, independientemente de si fueron tratado con PCPA o no (Fig. 32).



**Fig. 32.** La activación glial inducida por pilocarpina a nivel de hipocampo no se vió afectada por la reducción de los niveles de 5-HT según la evaluación inmunohistoquímica de GFAP. Imágenes de fluorescencia representativas de cortes de cerebro coronales a nivel del hipocampo (giro dentado/*hilus*) de los cuatro grupos experimentales. *hil*: *hilus*, *dg*: giro dentado. Barra de escala: 250 micras.



**Fig. 33.** Las imágenes (Objetivo 40X) muestran micrografías representativas de inmunohistoquímica de GFAP ( $n = 6$  ratas/grupo) a nivel del hilio VEH+PILO (panel izquierdo) y PCPA+PILO (panel derecho). La gliosis hipocampal inducida por el modelo de litio-pilocarpina de SE no se ve afectada por el tratamiento PCPA.

### Tiempo de latencia y Tasa de mortalidad

La tasa de mortalidad se calculó a las 24 y 72 h después de la inyección de pilocarpina. Como se muestra en la Tabla 3, ni el tiempo de latencia del SE ni la tasa de mortalidad fueron alterados significativamente por la administración subaguda de PCPA ( $p>0,05$ ).

**Tabla 3.** Efecto del tratamiento subagudo con PCPA en las tasas de mortalidad a las 24 y 72 h, y en el tiempo de latencia del SE inducido por la administración de pilocarpina

Grupo	n	Ratas supervivientes (primeras 24 h)	Ratas supervivientes (3 días)	Mortalidad total	Tiempo de latencia SE (min)
VEH+PILO	12	6	4	8/12 (67%)	25.2 ± 3.8
PCPA+PILO	12	8	8	4/12 (33%)	33.5 ± 5.5

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales ( $p>0,05$ ; z-test de frecuencias y proporciones y test de la t de Student para la tasa de mortalidad y el tiempo de latencia de SE, respectivamente).

### 4.3 Discusión

El objetivo de estos estudios fue doble. Por una parte, estudiar las eventuales alteraciones metabólicas e histoquímicas inducidas por el modelo de litio-pilocarpina de SE, a lo largo del periodo silente, en el que las ratas no muestran actividad convulsiva espontánea. Por otra parte, se estudió si dichas alteraciones eran alteradas mediante la modulación farmacológica de la actividad serotoninérgica central. Para ello, se exploraron por primera vez los efectos de la administración subaguda (7 días) de fluoxetina (prototipo de ISRS) y de p-clorofenilalanina (PCPA) (inhibidor de la triptófano hidroxilasa), sobre las alteraciones metabólicas cerebrales inducidas en el modelo de SE de litio-

pilocarpina en ratas. Para el cumplimiento de este objetivo, se llevaron a cabo dos estudios longitudinales de [<sup>18</sup>F]FDG-PET a corto y medio plazo (días 3 y 30) en el caso de fluoxetina, y solamente uno a corto plazo en el caso del PCPA (3 días), después de la inducción del SE. Además, al final de los estudios (3 días después del estudio de PCPA y 33 días después del estudio de fluoxetina), se llevaron a cabo diversas evaluaciones histoquímicas con el fin de comprobar una asociación entre el eventual hipometabolismo y el daño cerebral inducido por pilocarpina tanto a corto como a medio plazo. Además, se exploraron si las alteraciones neurológicas inducidas por pilocarpina podrían ser alteradas y/o modificadas por el tratamiento farmacológico. En este contexto, se evaluaron marcadores de neurodegeneración (Fluoro-Jade C), de gliosis reactiva (inmunohistoquímica de GFAP), de activación de la vía mitocondrial de apoptosis (inmunohistoquímica de caspasa-9) y de morfología y patología de neuronas (tinción de violeta de cresilo). Finalmente, se determinó la expresión de receptores ionotrópicos de glutamato (kainato, AMPA y NMDA) y receptores GABA<sub>A</sub> mediante autorradiografía con ligando tritados con el fin de relacionar los efectos anteriores con una potencial modificación de la actividad neuronal de los dos principales neurotransmisores clásicamente asociados a la aparición de crisis y convulsiones.

El desarrollo de la epilepsia se asocia comúnmente con los cambios neuronales progresivos. Entre estos cambios destacan el desequilibrio neuroquímico, la neurodegeneración, la modificación de la sinapsis y la reorganización de áreas cerebrales específicas (Houser, 1992; Beach et al., 1995; Borges et al., 2003; Bertram, 2013). Además, se ha descrito que estos cambios inducen depresión en muchos pacientes que sufren de epilepsia (Favale et al., 2003; Hamid y Kanner, 2013). Por ello, los fármacos ISRS como la fluoxetina, son prescritos habitualmente a estos pacientes. En este sentido, el efecto de la fluoxetina en el trastorno de la epilepsia ha sido ampliamente corroborado por estudios previos (Wada et al., 1995; Hernández et al., 2002; Bagdy et al., 2007) y se ha puesto de manifiesto un efecto neuroprotector de la fluoxetina en algunos modelos animales.

Para el estudio de los efectos de la fluoxetina en este modelo, la dosis y la duración del tratamiento (10 mg/kg/día x 7 días) fueron elegidas sobre la base de su uso ampliamente aceptado en ratas, descrito y de sus numerosos efectos farmacológicos y neuroquímicos (Lauzurica et al., 2013; Hrdina y Vu, 1993; Johnson et al., 2009), entre los que destaca un efecto inhibitor sobre las descargas hipocampales elicadas por estimulación eléctrica en ratas (Wada et al., 1995).

Por otro lado, hemos estudiado el efecto de la depleción de 5-HT sobre el daño cerebral a corto plazo provocado en el modelo de litio-pilocarpina de SE en ratas. Estos estudios se realizaron con posterioridad a los estudios con fluoxetina, en las que se demostró que las alteraciones neurológicas inducidas por el SE eran prevenidas por la administración de fluoxetina, sugiriendo un eventual efecto protector de este fármaco y eventualmente de la 5-HT. La dosis y la duración de PCPA (125 mg/kg/día x 7 días) se eligieron con el fin de conseguir una marcada disminución de 5-HT cerebral tanto durante el SE como en la fase aguda de la epileptogénesis. Aunque no medimos los niveles de 5-HT cerebral, está descrito que tratamientos con dosis similares pero de menor duración (3-4 días) inducen una depleción del 80-90% del contenido de este neurotransmisor (Saadat et al., 2005 y Kornum et al., 2006). Por ello, es esperable que la reducción del contenido de 5-HT obtenido con nuestro tratamiento fuera superior al 90%. Por otra parte, tratamientos más prolongados con PCPA (15 días) se han asociado con numerosas alteraciones cerebrales, incluyendo gliosis reactiva (Ramos et al., 2000). Por todo ello, elegimos una duración idéntica a la del tratamiento con fluoxetina (7 días), con el fin de conseguir una reducción intensa de la concentración de 5-HT peri sin llegar a producir daño cerebral. Así, en nuestro estudio, el tratamiento con PCPA no indujo signos de neurodegeneración, de astrogliosis, ni alteración del consumo basal de glucosa cerebral.

Estudios de [<sup>18</sup>F]FDG-PET en pacientes diagnosticados de epilepsia, normalmente muestran una actividad metabólica reducida de en la región epileptógena (Wong et al., 2010; Kumar A y Chugani, 2013; Ding et al., 2014) durante el período interictal. Además, el hipometabolismo en áreas temporales parece ser una característica que es común en diferentes modelos animales de

epilepsia (Jupp et al., 2007; Jupp et al., 2012; Virdee et al., 2012). Concretamente, en el caso del modelo de litio-pilocarpina de SE, se ha encontrado de forma consistente una reducción intensa, del metabolismo cerebral (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009; Lee et al., 2012). Esta reducción no está restringida a áreas temporales, sino que afecta a la mayor parte del cerebro. Esto puede ser explicado en parte por los límites físicos y técnicos de las cámaras PET actuales (Moses 2011), que especialmente son importantes cuando se explora el cerebro de los animales de experimentación en comparación con el tamaño los humanos. Es importante señalar, que entre los diferentes índices de metabolismo de cuantificación, la medida semicuantitativa SUV es actualmente el parámetro cuantificador PET más utilizado, tanto en entornos clínicos como experimentales (Byrnes et al., 2014; Deleye et al., 2014). Independientemente del método de cuantificación utilizado (SUV en la presente Tesis Doctoral, tasa metabólica de glucosa regional normalizada a pons en los estudios de Guo et al., (2009), captación regional de [<sup>18</sup>F]FDG calculada como % de la dosis inyectada por gramo normalizado a pons en el estudio de Lee et al. (2012) o bien análisis SPM en los estudios de Goffin et al., 2009), nuestros resultados mostrando hipometabolismo cerebral están de acuerdo con los resultados previamente publicados. Además, las alteraciones metabólicas inducidas por la pilocarpina son de carácter transitorio ya que se ha descrito que 7 días después de la lesión la actividad metabólica cerebral, la captación de [<sup>18</sup>F]FDG retornaba a los niveles basales (Lee et al. 2012). En este sentido, nosotros encontramos que el la reducción de la actividad metabólica cerebral que encontramos a los 3 días después del SE (Fig. 21A y 29), se recuperaba a los 30 días (Fig. 21B), retornando los valores de SUV a valores similares al del grupo control. Esta reducción transitoria del metabolismo cerebral está en línea con los resultados previamente descritos por Lee et al. (2012). A pesar de que se realizaron adquisiciones basales antes del tratamiento, las comparaciones de los valores de la captación regional de [<sup>18</sup>F]FDG no se realizaron frente a éstas, sino que se compararon con los valores obtenidos con los controles correspondientes, con el fin de evitar eventuales variaciones *inter-scan* (García-García et al., 2014). Por tanto, los grupos control (VEH+SAL o FLUOX+SAL) fueron escaneados en los mismos dos puntos temporales que las ratas inyectadas con pilocarpina (VEH+PILO y FLUOX+PILO). Por último, la

cuantificación mediante SUV puede sufrir variaciones en función de la glucemia. Estas variaciones individuales son minimizadas en caso de los animales estén en ayuno al menos 12 h antes de la adquisición PET (Deleye et al., 2014). Por ello, en todos nuestros estudios se realizaron dejando a los animales en ayunas la tarde anterior.

El Fluoro-Jade es un colorante fluorescente que permite detectar y localizar neuronas en degeneración, a partir de su alta afinidad por moléculas que se expresan mayormente en las membranas de neuronas degenerantes. De los diferentes tipos de Fluoro-Jade desarrollados, el Fluoro-Jade C es el que presenta la mayor relación señal/fondo así como la mayor resolución (Schmued et al., 2005), traduciéndose en una tinción de máximo contraste y afinidad para las neuronas en proceso de neurodegeneración. Es extremadamente específico aunque en raras ocasiones se ha observado la tinción de astrocitos y eritrocitos (Schmued et al., 2005). La tinción con Fluoro-Jade C no solo es ampliamente reconocida para la localización de cuerpos de células nerviosas degeneradas, sino también de dendritas distales, axones y terminales, independientemente de ser el resultado de un trauma cerebral, accidente cerebrovascular o insulto neurotóxico (Schmued et al., 2005). Así, esta tinción se llevado a cabo en el modelo de litio-pilocarpina, observándose degeneración neuronal, especialmente durante la fase temprana del SE (Mello et al., 1993; Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013). Nuestros hallazgos corroboran dichos resultados, pero además apuntan a que la neurodegeneración inducida por la pilocarpina no se limita exclusivamente a la fase aguda de la epileptogenesis (Fig. 31), sino que fue detectada incluso 33 días después del SE inicial (Fig. 23). Por lo tanto, el hipometabolismo agudo desencadenado por la pilocarpina induce daño neuronal que no se limita a dicho periodo de reducción de la actividad metabólica sino que se prolonga al menos durante todo el periodo silente.

La activación de glial y neurodegeneración, por lo general, se presentan como dos eventos próximos inseparables. La astrogliosis se considera que es un marcador de lesión neuronal (Ridet et al., 1997). Así, la gliosis se ha descrito en varios modelos de neuropatologías, incluyendo la epilepsia (Borges et al., 2003;

Zhang et al., 2010; Do Nascimento et al., 2012), así como en lesiones inducidas por neurotoxinas (Thomas et al, de 2004, García-García et al., 2014). Esta gliosis reactiva parece jugar un papel esencial en el daño neuronal temprano mediante el aumento de la generación de especies reactivas del oxígeno (Thomas et al., 2004) y aumento de citocinas proinflamatorias (Choi et al., 2015; Gómez et al., 2014). Además, interesantemente, el hipocampo es una de las regiones cerebrales en las que el SE induce la producción de citocinas (de Simoni et al., 2000). Nuestros datos muestran que la pilocarpina causó una marcada astrogliosis en las regiones afectadas en la ELT, a corto (Fig. 32 y 33) y medio plazo (Fig. 24). En relación con nuestro estudio, Liu et al. (2010) describieron que el estrés oxidativo media la muerte de las neuronas del hipocampo en ratas después del SE provocado por litio-pilocarpina. Después de un ataque cerebral, una respuesta lenta de los astrocitos puede mantener la activación de la microglía y, finalmente, dar lugar a una lesión cerebral crónica (Gao et al., 2013). Esto puede explicar por qué el grupo VEH+PILO mostró una reacción glial prolongada en comparación con los animales que no recibieron pilocarpina, que se mantuvo durante todo el periodo silente (Fig. 24). También se observó a corto plazo neurodegeneración (Fig. 31) y astrogliosis (Figs. 32 y 33) en hipocampo poco después (en el día 4) del SE inducido por pilocarpina. Estos signos de daño en hipocampo (neurodegeneración y gliosis reactiva) también se han detectado unas pocas horas después de SE (Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013). A diferencia del metabolismo de la glucosa, estos marcadores de daño cerebral permanecen más tiempo, como muestran nuestros resultados, ya que eran detectables incluso 33 días después de la SE. Por otra parte, aunque nuestros estudios se centraron fundamentalmente en el daño a nivel hipocampal, se ha descrito que las lesiones inducidas por pilocarpina no se limitan exclusivamente al hipocampo, ya que la aparición de neurodegeneración y gliosis tienen lugar en otras áreas cerebrales, incluyendo corteza cerebral (Fig.24), amígdala, cuerpo estriado y septum (Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013).

Paralelamente a la activación glial y a la neurodegeneración, se evaluó la expresión de caspasa-9 como marcador de células en proceso de apoptosis. La activación de las caspasas es un proceso que se ha descrito en la epilepsia (Narkilahti et al., 2003; Niquet, 2007; Tzeng et al., 2013). Estudios previos en

ratones (Wang et al., 2008a) han demostrado que la neurodegeneración y la activación de la caspasa-9 alcanzan su punto máximo 3 días después del SE inducido por pilocarpina, para descender gradualmente a los 7-14 días. Sin embargo, nuestros datos indican que la activación de caspasa-9 en ratas lesionadas con litio-pilocarpina, tanto en hipocampo como en corteza, dura al menos 33 días después del SE (es decir todo el periodo silente), tal como muestra la Fig. 25. Este hallazgo apoya la participación de la vía de la apoptosis mitocondrial en el proceso de neurodegeneración provocado por SE, tal como se ha propuesto (Henshall et al., 2000; Wang et al., 2008a.). Por último, una alteración de la vía de señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)-TrkB ha sido involucrada en las lesiones inducidas por la epileptogénesis (Altar et al., 2003, Kong et al., 2014).

Como se muestra en la Tabla 2, nuestro protocolo de tratamiento con fluoxetina no redujo de forma estadísticamente significativa la mortalidad asociada al SE inducido por pilocarpina. Este resultado concuerda con los datos descritos por Freitas et al. (2006). Estos autores encontraron que una única dosis de fluoxetina (10 o 20 mg/kg) administrada 30 min antes de la administración de pilocarpina no redujo la mortalidad en las primeras 24 horas cuando se comparó con ratas a las que solo se inyectó pilocarpina. Más aun, estos mismos autores encontraron que la fluoxetina reducía el tiempo de latencia al SE e incrementaba la aparición de crisis ataques convulsivos.

Sin embargo, el tratamiento subagudo con fluoxetina mostró tener propiedades neuroprotectoras. Así, evitó el hipometabolismo inducido por pilocarpina a corto plazo (Fig. 21A), mostrando una tasa metabólica cerebral similar a las ratas control (grupo VEH+SAL). Además, a medio plazo (33 días después del insulto) cuando los análisis histoquímicos se llevaron a cabo, se comprobó que la fluoxetina redujo la neurodegeneración (reducción de un 70% en el número de células teñidas con Fluoro-Jade C en la zona del giro dentado/*hilus*, Fig. 23), la gliosis reactiva (GFAP, Fig. 24) y la apoptosis (las células inmunomarcadas con caspasa-9 se redujeron en un 30% en corteza e hipocampo, Fig. 25) provocadas por pilocarpina. Estos marcadores se vieron disminuidos en áreas del cerebro que se sabe que están gravemente afectadas por el SE inducido por pilocarpina,

como son el hipocampo y corteza cerebral. Esta función protectora de la fluoxetina no parece estar limitada a la epilepsia, ya que también se ha constatado con otros daños cerebrales asociados con respuestas inflamatorias gliales (Dhami et al., 2013; Ohira et al., 2013; Vizi et al., 2013).

Finalmente, encontramos un aumento en la densidad de receptores GABA<sub>A</sub> en hipocampo (CA y giro dentado) en el grupo FLUOX+PILO (Fig. 27). Se ha encontrado (Wang et al., 2008a) que un gran porcentaje (alrededor del 88%) de neuronas degenerativas positivas para Fluoro-Jade C son GABAérgicas, lo que implica que la función inhibitoria del sistema GABAérgico podría estar afectada por los daños graves en los cerebros sometidos a SE en el modelo de litio-pilocarpina. Ohira et al. (2013) encontraron que la fluoxetina estimula la neurogénesis de las interneuronas GABAérgicas en ratones adultos sometidos a isquemia cerebral, lo que podría tener un efecto supresor sobre la apoptosis inducida por dicha isquemia. Por tanto, el aumento de la función GABAérgica en sectores CA1-CA2 y en giro dentado podría contribuir al efecto supresor del comportamiento epiléptico y sobre todo de la neurodegeneración observada por los ISRS en diferentes modelos animales de epilepsia (Sitges et al., 2012), mediante la restauración del equilibrio entre GABA/glutamato.

En general es ampliamente aceptado que los efectos neuroprotectores de la fluoxetina estén mediados por el aumento de 5-HT extracelular (Mahar et al., 2014; Malberg et al., 2000; Pasini et al., 1996). De todas formas, algunas acciones protectoras de la fluoxetina se han asociado con acciones directas, a través de mecanismos independientes de 5-HT, como interacción con receptores, canales iónicos dependientes de voltaje y enzimas. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que la fluoxetina inhibe selectivamente receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B, mostrando efectos neuroprotectores frente a la excitotoxicidad glutamatérgica (Vizi et al., 2013). Además, se ha demostrado que inhibe canales de calcio tipo P/Q, provocando una reducción de la exocitosis del glutamato incrementada por 4-AP (Wang et al., 2003), reconocido agente proconvulsivo y despolarizante (Lévesque et al., 2013). Otra acción directa de la fluoxetina que puede participar en tales efectos beneficiosos es la reducción de la excitabilidad neuronal mediante la inhibición de la actividad

de los canales de Na<sup>+</sup> (Lenkey et al., 2006). Finalmente, acciones directas de fluoxetina sobre sistemas enzimáticos también pueden contribuir tanto a sus efectos antidepresivos y neuroprotectores. Por ejemplo, recientemente se han descrito acciones directas de la fluoxetina sobre el sistema ceramida esfingomielinasa disminuyendo el contenido de ceramida (Gulbins et al., 2013) y sobre el metabolismo del ácido retinoico (Hellmann-Regen et al., 2015).

En conjunto, nuestros resultados muestran que efecto neuroprotector de la fluoxetina tiene lugar cuando la regeneración neuronal es requerida pero no antes. De esta manera se explica porqué la fluoxetina no modificó la mortalidad pero previno el hipometabolismo así como diferentes marcadores de daño neuronal generado por el SE.

En cuanto a los efectos de la depleción de 5-HT cerebral en el comportamiento convulsivo asociado a la epilepsia, se han descrito resultados contradictorios. Así, la depleción de esta amina se ha asociado tanto con ausencia de efectos (Amabeoku, 1993), efectos anticonvulsivantes (Racine y Coscina, 1979; Lazarova et al., 1981; Stach et al., 1981; Bercovici et al., 2006) y proconvulsivantes (Racine y Coscina., 1979; Cavalheiro et al., 1981; Lazarova et al., 1981; Tagashira et al., 1983). Es probable que los aspectos metodológicos del modelo animal de epilepsia, los sustratos neuroquímicos y neuroanatómicos que subyacen a cada modelo concreto, la especie animal, edad, sexo, e incluso la metodología desencadenante para la depleción de 5-HT (por administración de fármacos o por lesión del núcleo del rafe en el cerebro medio), y la dosis y duración del tratamiento con PCPA pudieran explicar estas discrepancias encontradas.

Aunque se ha descrito que ciertas respuestas comportamentales inducidas por pilocarpina son moduladas por PCPA (por ejemplo, la masticación sin propósito inducida por bajas dosis de pilocarpina en ratas es antagonizada parcialmente por el tratamiento previo con PCPA; Stewart et al., 1987), ningún estudio ha evaluado el efecto de la depleción de 5-HT en las convulsiones inducidas por la administración de una dosis convulsiva única de este fármaco colinérgico.

En nuestro caso, y en relación a la tasa de mortalidad y tiempo de latencia al SE, la depleción serotoninérgica no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ambos parámetros (Tabla 3). Aún así, pudimos observar una tendencia reducida en la mortalidad asociada a la pilocarpina en aquellos animales pretratados con PCPA (mortalidad VEH+PILO = 50% vs. PCPA+PILO = 33%,  $p>0,05$ ) y una latencia al SE incrementada en 8 min en las ratas administradas con PCPA (latencia SE VEH+PILO =  $25.2 \pm 2.8$  vs. PCPA+PILO =  $33,5 \pm 5,5$  min;  $p>0,05$ ).

Aunque tal como hemos mostrado anteriormente, el tratamiento con fluoxetina mostró neuroprotección frente al daño cerebral inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE al prevenir el hipometabolismo y reducir ciertos marcadores de daño neuronal; paradójicamente, la depleción de 5-HT no exacerbó ninguno de estos signos de daño cerebral a corto plazo asociadas con este modelo. En este sentido, la captación regional cerebral reducida de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (Figs 29 y 30), el aumento del número de células positivas para Fluoro-Jade C (Fig. 31) y la gliosis reactiva (Figs. 32 y 33) asociada al SE no se vieron modificados por la administración subaguda de PCPA.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en los estudios de fluoxetina y de PCPA, en donde a) la fluoxetina mostró efectos neuroprotectores en el modelo de SE de litio-pilocarpina; b) la administración de PCPA no agravó el daño neuronal inducido por este mismo modelo; y c) la existencia de acciones directas (no serotoninérgicas) mediadas por la fluoxetina. Todo ello sugiere que al menos en la fase temprana de la epileptogenesis inducida por pilocarpina, la fluoxetina ejerza, al menos parcialmente, sus efectos neuroprotectores a través de las acciones independientes de la 5-HT.



***5 EFECTOS DEL BLOQUEO DEL  
RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D<sub>1</sub>  
EN LAS ALTERACIONES INDUCIDAS  
POR EL MODELO DE LITIO-  
PILOCARPINA***

---



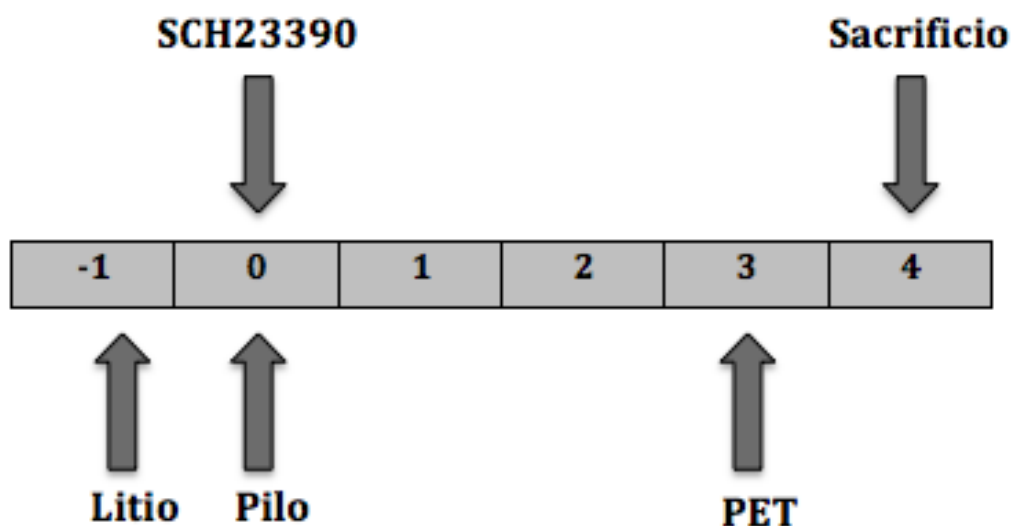
Poco se conoce de la implicación del sistema central dopaminérgico en la epileptogénesis y su mantenimiento. Ya que el sistema dopaminérgico presenta numerosas proyecciones hacia estructuras límbicas y corticales, estructuras clave en la epilepsia se ha propuesto la implicación de la DA en al menos la modulación de esta enfermedad. Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC, donde son responsables de las diversas acciones fisiológicas de la DA. Se han descrito dos grandes familias de receptores dopaminérgicos denominadas D<sub>1</sub> (que estimulan la formación de AMPc) y D<sub>2</sub> (que inhibe la formación de AMPc, aumenta la permeabilidad al K<sup>+</sup> y reducen la entrada de Ca<sup>2+</sup>). Debido al diferente mecanismo de señalización y a la distribución diferencial de ambos subtipos de receptores, el eventual efecto modulador del sistema dopaminérgico en las crisis depende fundamentalmente del subtipo de receptor activado y de las regiones del cerebral en donde dicha activación tiene lugar. Particularmente, la DA juega un papel importante en el control de las convulsiones que surgen en el sistema límbico. Estudios realizados en una amplia variedad de modelos animales han permitido ilustrar las acciones opuestas de la señalización del receptor D<sub>1</sub> excitatorios y del receptor D<sub>2</sub> inhibitorios en la epileptogénesis del sistema límbico. De hecho, la activación de los receptores D<sub>1</sub> parece ser generalmente pro-convulsiva, mientras que la señalización del receptor D<sub>2</sub> parece ejercer un efecto anticonvulsivo (Burke, 1990). Sin embargo, este punto de vista podría parecer bastante simplista ya que la acción neuromoduladora de la DA en el control de la epileptogénesis requiere probablemente un equilibrio fisiológico en la activación de los circuitos modulados por estos dos subtipos principales de receptores (Bozzi y Borrelli, 2013).

El principal objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a corto plazo de la administración aguda del bloqueante dopaminérgico selectivo de los receptores D<sub>1</sub>, SCH23390, en las alteraciones neurológicas (metabólicas e histoquímicas) inducidas en el modelo experimental de SE por administración de litio-pilocarpina.

Para ello, los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales, en los que había dos factores: tratamiento con SCH23390 y tratamiento con pilocarpina. Así, los grupos experimentales y el número de sujetos de cada uno de ellos fueron:

- Grupo **VEH+SAL** (n=7).
- Grupo **SCH23390+SAL** (n=7).
- Grupo **VEH+PILO** (n=13).
- Grupo **SCH23390+PILO** (n=13).

El protocolo seguido se muestra en la Fig. 34. Debido a los resultados previamente obtenidos, nos centramos en evaluar los diferentes marcadores a corto plazo (PET a los 3 días después del SE). En cambio, a diferencia de los estudios anteriores en los que la modulación de la actividad serotoninérgica se hizo de forma subcrónica, en este estudio se evaluó el efecto agudo de la modulación de la actividad dopaminérgica. Esta decisión fue consecuencia de que está descrito que antagonistas dopaminérgicos selectivos de cada uno de los principales tipos de receptores dopaminérgicos eran capaces de modular la respuesta convulsiva, cuando éstos eran administrados poco antes del SE (Barone et al., 1992; Freitas et al., 2006b).



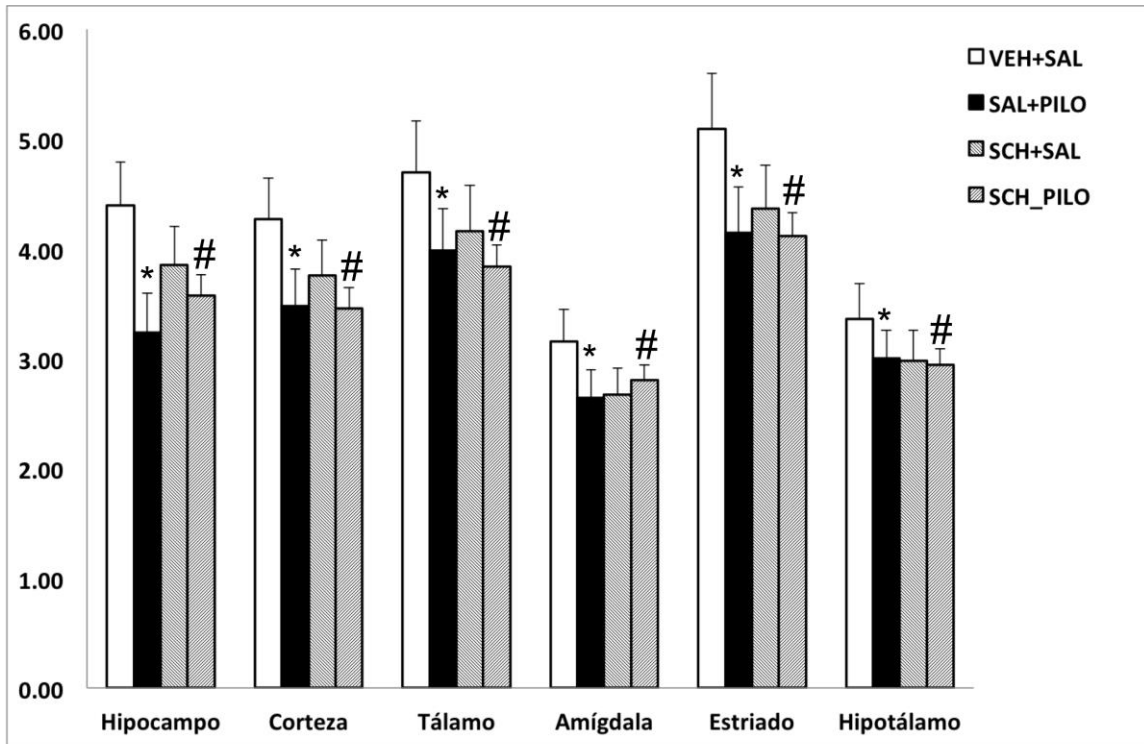
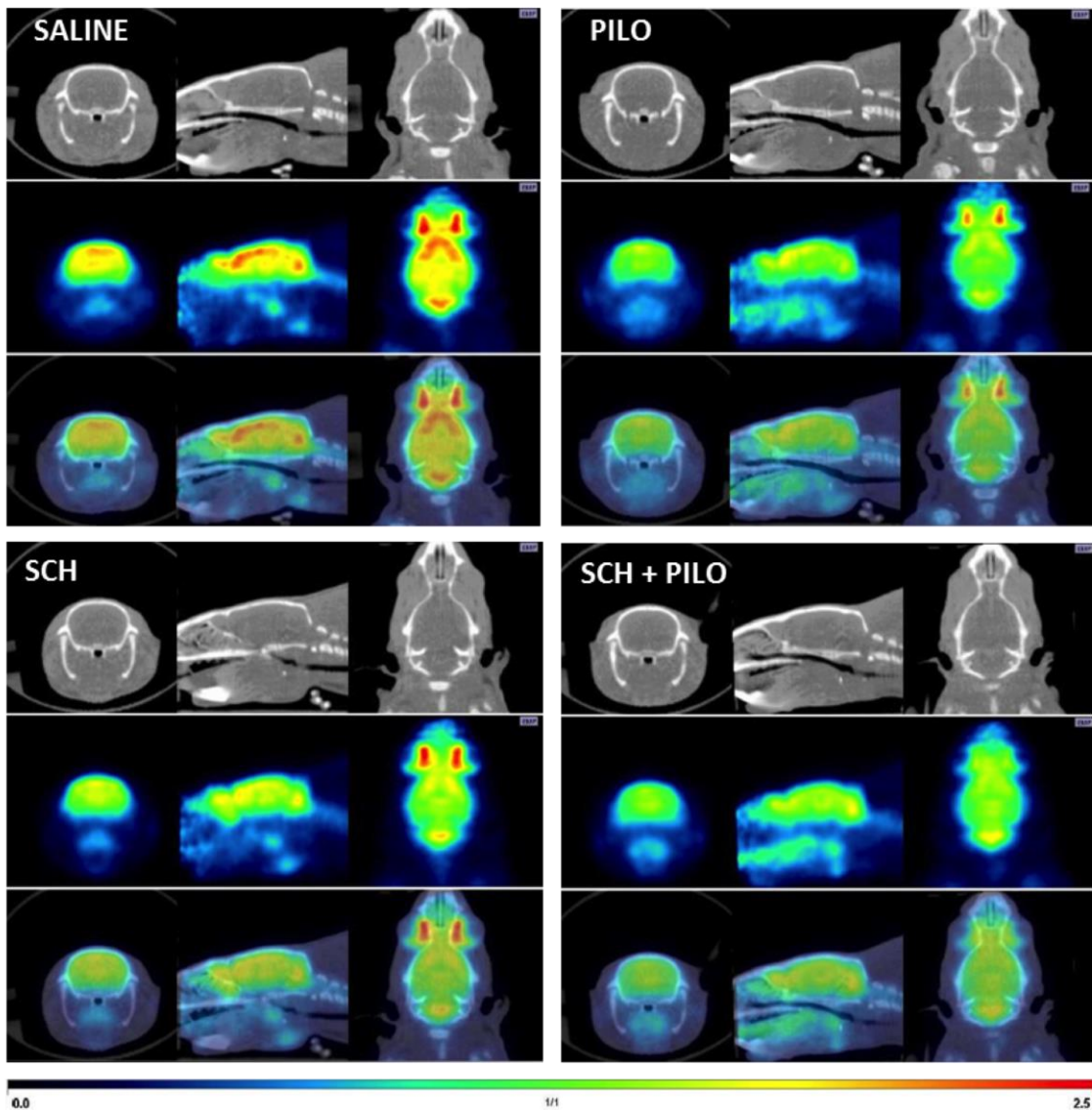
**Fig. 34.** Protocolo experimental. SCH23390 (0,2 mg/kg; i.p.) se administró 30 min antes de la administración i.p. de pilocarpina (25 mg/kg) (día 0). El estudio [<sup>18</sup>F]FDG PET se realizó en el día 3 y los animales se sacrificaron al día siguiente para la evaluación de los marcadores histoquímicos.

## 5.1 Resultados

### Metabolismo de la glucosa cerebral mediante [<sup>18</sup>F]FDG-PET

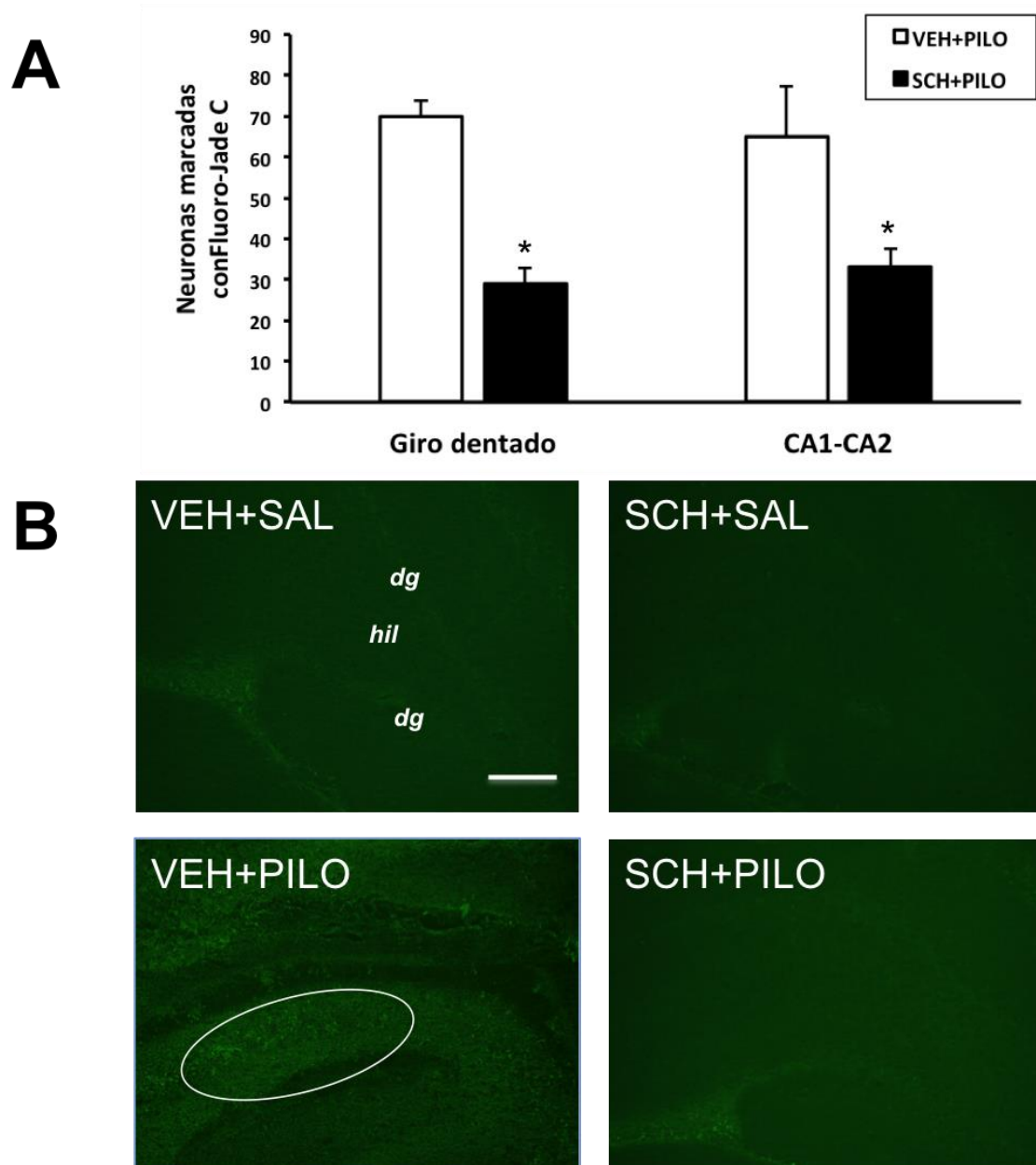
Tres días después de la administración de pilocarpina (grupo VEH+PILO), se detectó un hipometabolismo de glucosa estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en todas las regiones cerebrales analizadas (Fig. 35A). La disminución SUV varió de 10,8% en el hipotálamo hasta el 18,6% en el cuerpo estriado. Cuando se analizó el hipocampo, esta reducción alcanzó el 26,4%. El grado de reducción metabólica fue similar al realizado en los estudios anteriores y están en línea con los obtenidos por otros grupos (Goffin et al., 2009, Guo et al., 2009) a pesar del diferente cuantificador utilizador (SUV en nuestro caso). Con respecto al efecto del bloqueo agudo del receptor D<sub>1</sub> en el metabolismo de la glucosa cerebral, el tratamiento con SCH23390 no modificó la captación cerebral basal de [<sup>18</sup>F]FDG ( $p > 0,05$ , Fig. 35A). Por ejemplo, en el hipocampo,  $SUV_{VEH+SAL} = 4,39 \pm 0,39$  g/ml, mientras que  $SUV_{SCH+SAL} = 3,85 \pm 0,35$  g/ml ( $p > 0,05$ ), aunque se observa una tendencia hacia la reducción de la actividad metabólica. Además, esta falta de efectos de SCH 23390 en la captación cerebral de [<sup>18</sup>F]FDG en situación basal, se repitió cuando se evaluó en ratas sometidas al modelo de litio-pilocarpina de SE. Así, el hipometabolismo inducido por pilocarpina no se alteró por el tratamiento de SCH23390 (por ejemplo, en hipocampo:  $SUV_{VEH+PILO} = 3,24 \pm 0,36$  g/ml vs.  $SUV_{SCH+PILO} = 3,57 \pm 0,19$  g/ml;  $p > 0,05$ ). En la Fig. 35B se muestran imágenes representativas PET/TAC cerebrales de los cuatro grupos experimentales.

**Fig. 35. (página siguiente)** El hipometabolismo cerebral a corto plazo (día 3) inducido por pilocarpina no fue modulado por el bloqueo del receptor D<sub>1</sub>. (A) Actividad metabólica cerebral regional evaluado por [<sup>18</sup>F]FDG PET de los cuatro grupos experimentales. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (en unidades SUV). VEH+SAL (n = 7), SCH+SAL (n = 7), VEH+PILO (n = 11), SCH+PILO (n = 7). \* $p < 0,05$  frente el grupo, VEH+SAL, ANOVA de dos vías. (B) Imágenes representativas [<sup>18</sup>F]FDG-PET (en vistas coronal, sagital y trans-axial) de los cuatro grupos experimentales, adquiridas 3 días después del SE inducido por litio-pilocarpina. Las imágenes TAC, PET y fusionadas se muestran en las filas superior, media e inferior, respectivamente.

**A****B**

### Evaluación de la neurodegeneración mediante marcaje con Fluoro-Jade C

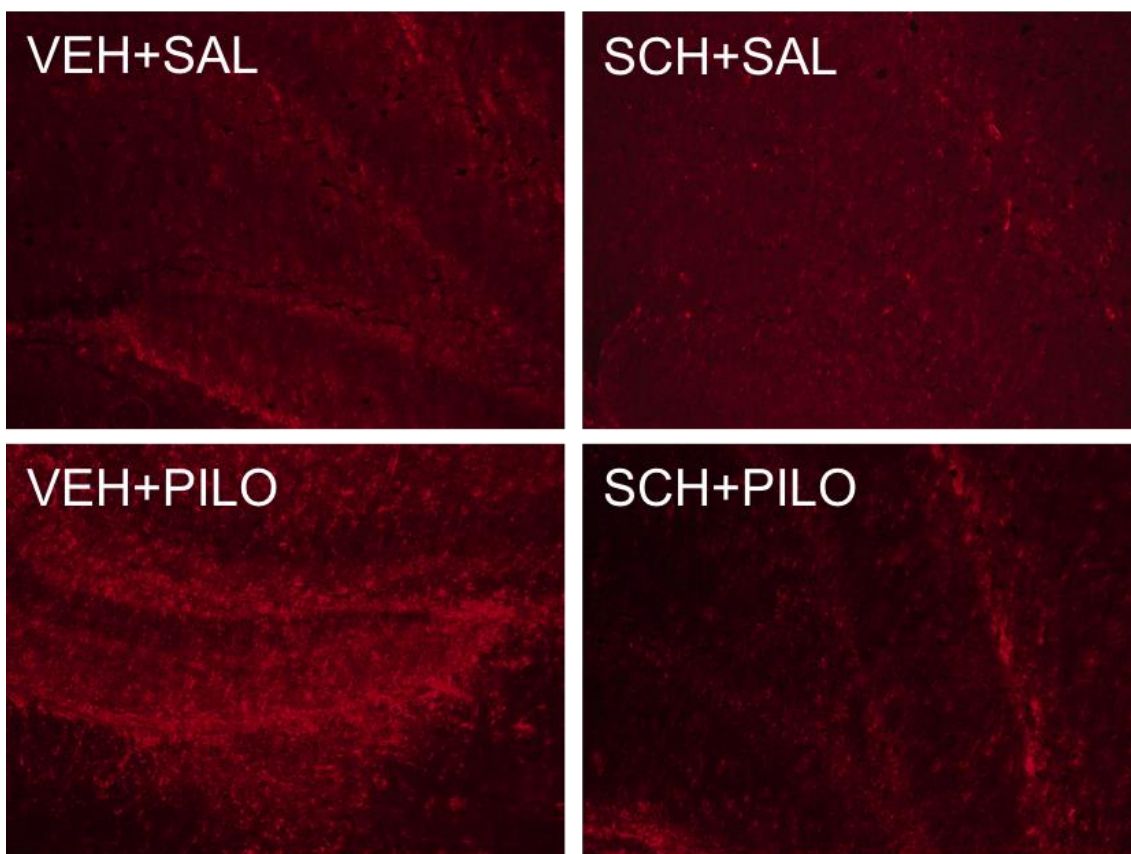
Se observaron claros signos de neurodegeneración 3 días después de la administración de pilocarpina, según se muestra en las imágenes de fluorescencia con Fluoro-Jade C. Esta respuesta fue evidente en el área del hipocampo (Fig. 36B). Además, cuando se realizó el análisis cuantitativo (Fig. 36A), se comprobó que la administración de SCH23390 disminuyó significativamente, en un 58% y 49% el número de células marcadas con fluoro-Jade C, tanto en el *hilus* del hipocampo como en los sectores CA1 y CA2, respectivamente ( $p < 0,01$ ). Como era de esperar, las ratas que no recibieron pilocarpina (grupos; VEH+SAL y SCH+SAL) no mostraron signos de neurodegeneración ya que no se observaron células marcadas con Fluoro-Jade C (Fig. 36B).



**Fig. 36.** (A) La cuantificación de la neurodegeneración inducida por pilocarpina se evaluó contando células positivas para Fluoro-Jade C en el giro dentado y en las áreas de CA1-CA2. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$  ratas/grupo;  $*p < 0,05$ ; Student t-test). (B) Micrografía representativa de fluorescencia con Fluoro-Jade C en el nivel hipocampal de giro dentado de los cuatro grupos experimentales. Las imágenes muestran células Fluoro-Jade C positivas en el área del hilio después de la administración de pilocarpina, siendo este efecto prevenido o evitado por la administración de SCH23390. hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

### Imunohistoquímica de GFAP

Con el fin de evaluar la activación astrogliar asociada a un eventual daño neuronal, se realizó inmunohistoquímica de GFAP no cuantitativa. Como se muestra en la Fig. 37, se detectó un incremento en el inmunomarcaje de GFAP en hipocampo (zona del *hilus* y giro dentado), 3 días después de la administración de pilocarpina. Esta gliosis reactiva en ambas áreas cerebrales se redujo cuando se administró SCH23390 (Fig. 37). No se observó activación glial en ratas que no recibieron pilocarpina.



**Fig. 37.** Micrografías representativas de GFAP de los 4 grupos experimentales, mostrando que la gliosis generada por el SE (grupo VEH+PILO) fue prevenida por la administración del antagonista D<sub>1</sub> SCH23390 (grupo SCH+PILO).

### Inmunohistoquímica de Caspasa-9

La inmunohistoquímica de caspasa-9 se llevó a cabo para valorar la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis inducida por pilocarpina y su eventual modulación por el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>. Como se muestra en las micrografías de fluorescencia (Fig. 38A), se produjo un marcado aumento de la expresión de caspasa-9 en el hipocampo, 3 días después de la administración de pilocarpina, como estaba previsto. Esta inducción se redujo notablemente cuando se administró una única dosis de SCH23390 (Fig. 38A). El análisis cuantitativo (Fig. 38B) reveló que la reducción en la expresión de caspasa-9 en los animales sometidos al SE, a los que previamente se les había bloqueado los receptores D<sub>1</sub> por administración de SCH23390, era un 51% inferior en la zona del giro dentado/*hilus* y un 35% menor en áreas de CA1-CA2 ( $p < 0,05$ ).

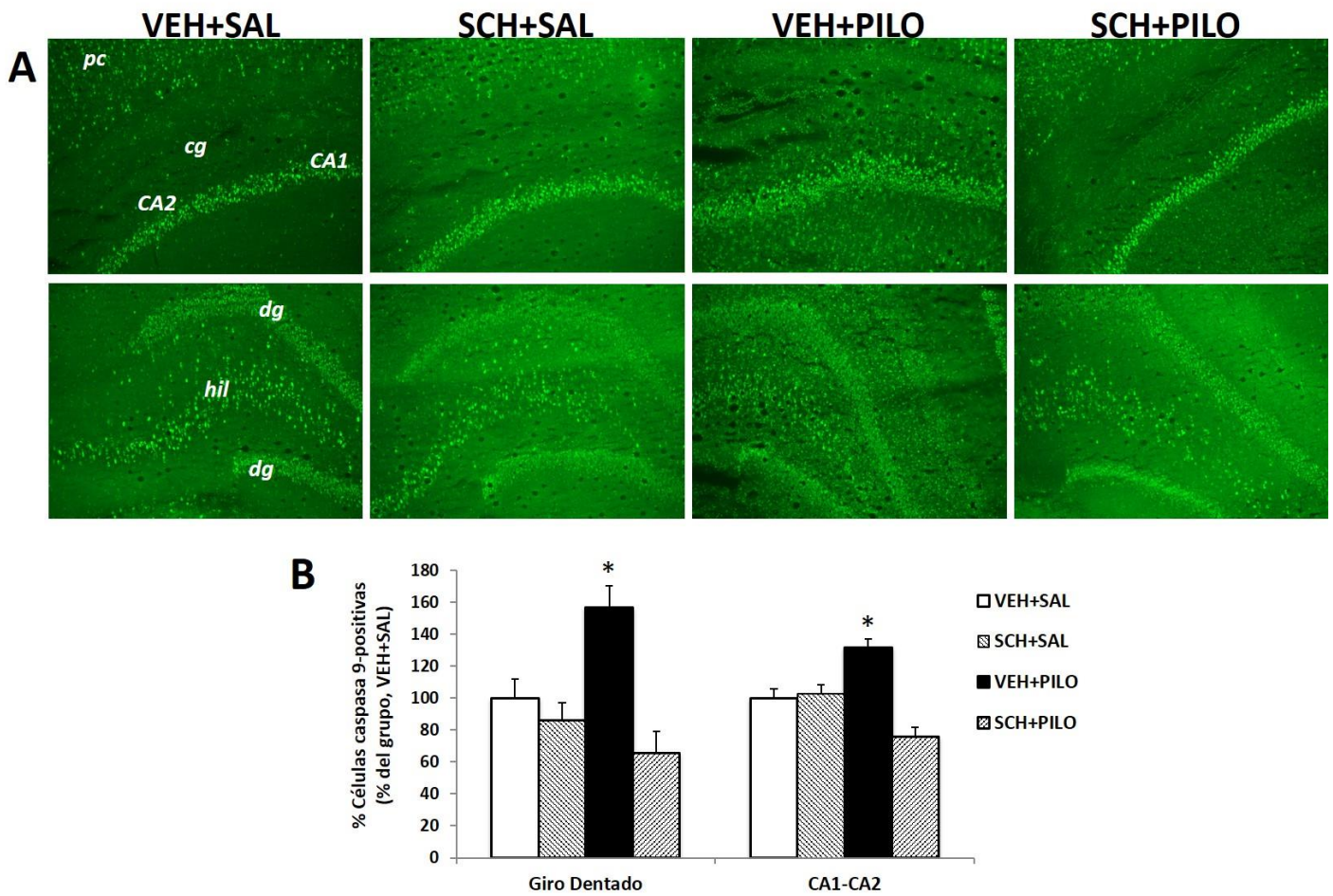
### Comportamiento: Tasa de mortalidad y tiempo de latencia

La tasa de mortalidad se calculó a las 24 y 72 h después de la inyección de pilocarpina. Como se muestra en la Tabla 4, tanto el tiempo de latencia como la tasa de mortalidad no fueron alterados de forma estadísticamente significativa por la administración de SCH23390 ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 4.** Efecto del tratamiento con única dosis de SCH en las tasas de mortalidad a las 24 y 72 h, y en el tiempo de latencia del SE inducido por la administración de pilocarpina

Grupo	n	Ratas supervivientes (24 h)	Ratas supervivientes (3 días)	Tasa de mortalidad	Tiempo de latencia SE (min)
VEH+PILO	13	10	9	4/13 (31%)	24.2 ± 3.1
SCH+PILO	13	9	9	4/13 (31%)	30.3 ± 4.4

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales ( $p > 0,05$ ; test z para frecuencias y proporciones para la evaluación de la mortalidad y test de la t de Student para el análisis del tiempo de latencia de SE).



**Fig. 38.** (A) Las imágenes de inmunohistoquímica de caspasa-9 representan cortes de cerebro coronales a nivel hipocampal de giro dentado (columna izquierda) y los sectores CA1 CA2 (columna derecha) de los 4 grupos experimentales. (B) Cuantificación de células inmunorreactivas de caspasa-9 que muestra el efecto de la administración de una única dosis de SCH23390 en ratas tratadas con pilocarpina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  ratas/grupo;  $*p < 0,05$ ; ANOVA de dos vías). El aumento de las células inmunorreactivas de caspasa-9 inducida por pilocarpina se ve disminuido de manera significativa por la administración de SCH. hil: *hilus*, dg: giro dentado, cg: cíngulo, pc: corteza parietal. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

## 5.2 Discusión

En el presente estudio, se estudió el efecto de la administración de una dosis de SCH23390 en el modelo de SE de litio-pilocarpina en el daño cerebral a corto plazo, en ratas macho. En segundo lugar, se evaluó si el SCH23390 fue capaz

de alterar, de alguna manera, la respuesta de comportamiento y los signos de daño neuronal, a largo plazo, inducidos por pilocarpina. Para el cumplimiento de este objetivo, se llevó a cabo un estudio *in vivo* [<sup>18</sup>F]FDG-PET al cabo de 3 días después del SE con el fin de medir el metabolismo cerebral regional a corto plazo. Al día siguiente (día 4), se sacrificaron las ratas para llevar a cabo diferentes estudios histoquímicos con el fin de evaluar el daño neuronal y su eventual reversión por el bloqueo dopaminérgico. Para ello, se utilizó la tinción de Fluoro-Jade C con el fin de evaluar la neurodegeneración; la inmunohistoquímica de caspasa-9 para determinar la activación de la vía de apoptosis mitocondrial y, finalmente, la inmunohistoquímica de GFAP para evaluar la astrogliosis.

El papel del sistema neurotransmisor dopaminérgico en la epilepsia no está del todo aún dilucidado. Se ha observado que la modulación farmacológica selectiva de los receptores dopaminérgicos presentó efectos diferenciales en la respuesta convulsiva en función del modelo experimental utilizado (Burke et al., 1990). Así, el pretratamiento con agonistas D<sub>1</sub> potenció las convulsiones tónico-clónicas elicítadas por pilocarpina, pero en cambio no presentó ni acción anti- ni proconvulsivante en las crisis inducidas por administración de estriquina o picrotoxina. Este efecto facilitador fue abolido por el antagonista D<sub>1</sub> SCH23390 (0.2 mg/kg). Además el SCH23390 por sí mismo protegió a los ratones frente a las crisis inducidas por pilocarpina. A su vez, la estimulación de los receptores inhibitorios D<sub>2</sub> con h LY 171555 (0.167-4.5 mg/kg) protegió a los ratones frente a las convulsiones por pilocarpina (Burke et al., 1990). Otros estudios también en ratón confirmaron un efecto anticonvulsivante para el SCH23390 y revelaron un efecto proconvulsivante para el haloperidol, antagonista dopaminérgico con preferencia por los receptores D<sub>2</sub> en el anterior modelo en ratones (Freitas et al., 2006) Así, estos estudios sugieren un papel diferencial de los distintos receptores dopaminérgicos sobre crisis convulsivas; de manera que se ha postulado un un papel proconvulsivante a los receptores D<sub>1</sub> y papel anticonvulsivante para la familia de receptores D<sub>2</sub>.

El SCH23390 es un antagonista potente del receptor D<sub>1</sub> de DA, de acción corta, con una semivida de eliminación de alrededor de 25 min tras la administración de 0,2 mg/kg, i.p. en ratas. Durante las dos últimas décadas, la comprensión de la función del receptor de DA y su ubicación neuronal se ha visto favorecida por la utilización de este fármaco. Por ejemplo, ha sido una herramienta ampliamente utilizada tanto en estudios de unión de radioligandos como de comportamiento. Además, diversos estudios farmacológicos, han demostrado actividad anticonvulsiva en algunos modelos experimentales (Hyttel ,1983; Iorio et al., 1983; Kilts et al., 1985; Bourne et al., 2001).

El modelo de SE de pilocarpina o litio-pilocarpina en ratas y ratones ha sido ampliamente utilizado y es válido para el estudio de convulsiones secundarias generalizadas iniciadas en el hipocampo. Estudios previos han demostrado que el antagonista del receptor D<sub>1</sub>, SCH23390 (tratamiento previo con 0,1-0,3 mg/kg, i.p., en ratas) dependiente de la dosis inhibió las convulsiones provocadas por una dosis baja de pilocarpina (Barone et al., 1992). Sin embargo, las convulsiones motoras evocadas por una dosis alta de pilocarpina (600 mg/kg, i.p.) eran más difíciles de suprimir, ya que el antagonista SCH23390 resultó ser completamente ineficaz en esta situación (Turski et al., 1987). Burke et al. (1990) demostraron que el pretratamiento de ratones con SCH23390 (0,8 mg/kg, i.p.), 60 min antes de una dosis de pilocarpina de 400 mg/kg, mostró un claro efecto anticonvulsivo (solamente el 14,3% de los animales mostraron convulsiones) y consecuentemente se redujo la tasa de mortalidad., en comparación con lo observado en ratas tratadas exclusivamente con pilocarpina. En nuestro estudio hemos seleccionado una dosis de SCH23390 de 0,2 mg/kg, i.p., administrada media hora antes de las crisis. La dosis y la duración del tratamiento se establecieron sobre la base de su uso ampliamente aceptado en ratas y en ratones, y de sus numerosos efectos farmacológicos y neuroquímicos (Turski et al., 1987; Barone et al., 1992; Freitas et al., 2006b; Burke et al., 1990). En nuestras manos, sorprendentemente, el antagonista SCH23390 no fue capaz de reducir las convulsiones provocadas por una dosis de 25 mg/kg de pilocarpina, ni modificó el tiempo de latencia de las crisis, como se muestra en la Tabla 4. Esto podría explicarse por las diferencias metodológicas presentes entre nuestro estudio y el resto, incluyendo la especie y raza animal, protocolo inducción del

SE (en nuestro caso usamos el modelo de litio-pilocarpina a diferencia de los anteriores que emplearon el modelo de pilocarpina), entre otras posibles causas.

Tal como hemos mencionado, es característico el hipometabolismo cerebral durante el periodo interictal, tanto en seres humanos como en animales (Lamusuo et al., 2001; Nelissen et al., 2006; Wong et al., 2010). En el caso de los modelos animales de epileptogénesis, aunque aún no está aceptado, se cree que en parte, el hipometabolismo cerebral inducida es debida a muerte neuronal, especialmente en áreas temporales (Guo et al., 2009; Jupp et al., 2012; Virdee et al., 2012). En el caso del modelo de litio-pilocarpina, se observa una intensa reducción transitoria, del metabolismo cerebral (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009). Esta reducción de la actividad metabólica fue replicada en este estudio (así como en los anteriores en los que se evaluaba el papel de la actividad serotoninérgica) tal como muestra la Fig. 35. Sin embargo, paralelamente a la ausencia de efectos sobre las convulsiones inducidas por litio-pilocarpina (Tabla 4), la administración de SCH23390 no tuvo efecto sobre el hipometabolismo característico de este modelo experimental.

Además, en el modelo de litio-pilocarpina se ha descrito degeneración neuronal, especialmente durante la fase temprana del SE (Mello et al., 1993; Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013). Nuestros estudios avalan dicho daño neuronal. Así, el marcaje con Fluoro-Jade C revela un proceso de neurodegeneración evidente a los 4 días tras el SE inducido por pilocarpina (Fig. 36). Asociado a este proceso de neurodegeneración, la pilocarpina indujo una intensa activación glial (Fig. 27). Así se puede observar un notable aumento en el inmunomarcaje de GFAP en el grupo VEH+PILO en comparación con los animales que no recibieron pilocarpina (VEH+SAL). Tal como se ha discutido en los estudios anteriores, la activación de las células gliales y la neurodegeneración, por lo general, se presentan como dos eventos próximos inseparables (Ridet et al., 1997).

También se evaluó la expresión de caspasa-9 como marcador de células en proceso de apoptosis (Fig. 38). Los actuales resultados, juntos con los obtenidos de estudios previos y los descrito por otros grupos han demostrado que la neurodegeneración y la activación de la caspasa-9 alcanzan su punto máximo 3

días después del SE inducido por pilocarpina, para descender gradualmente a los 7-14 días (Wang et al., 2008a).

A pesar de la ausencia de efectos del bloqueo dopaminérgico D<sub>1</sub> en relación a la respuesta convulsiva (Tabla 4) y el hipometabolismo glucídico cerebral (Fig. 35), la administración de SCH23390 redujo la expresión de los marcadores de daño neuronal (Fluoro-Jade C, GFAP y caspasa-9), evidenciando que si bien no presentó actividad anticonvulsiva si previno el daño cerebral asociado a dicha condición (Fig. 36, 37 y 38).

En resumen, nuestros resultados no confirmaron el papel pro-convulsivo previamente descrito del receptor D<sub>1</sub>, ya que no se replicó el efecto anticonvulsivo del bloqueo D<sub>1</sub> por administración de SCH23390 en el modelo de litio-pilocarpina de SE. En este sentido, la administración de SCH23390 no alivió el hipometabolismo asociado al SE. Estos resultados podrían ser consecuencia de diferencias metodológicas con los estudios publicados por otros autores. Sin embargo, nuestros resultados sí avalan la participación del receptor D<sub>1</sub> en el daño neuronal inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE en rata, de forma que el bloqueo del mismo, redujo marcadores de daño neuronal asociado a este modelo de epileptogenesis. En definitiva, estos resultados abren la posibilidad del empleo de fármacos moduladores de la actividad dopaminérgica, y especialmente de antagonistas dopaminérgicos D<sub>1</sub>, como una vía adicional al tratamiento actual de las epilepsias.



***6 ESTUDIO DEL DAÑO HIPOCAMPAL  
INDUCIDO POR 4-AP PERIFÉRICA Y  
SU EVENTUAL MODULACIÓN POR  
ADMINISTRACIÓN DE FLUOXETINA***

---

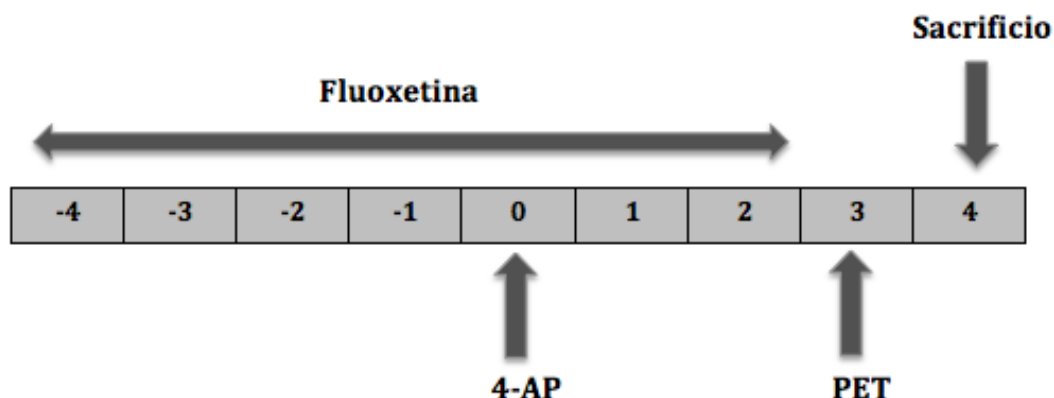
En la actualidad, la fampridina (4-AP) está indicada en pacientes con esclerosis múltiple con alteraciones del movimiento (Hayes, 2004; Keune et al., 2015). Además, ensayos clínicos y estudios experimentales sugieren que este fármaco pudiera ser eficaz en el tratamiento del nistagmo, vértigo y trastornos del cerebelo (Strupp et al., 2015). Sin embargo, la 4-AP se utiliza principalmente en investigación como agente convulsivante. La 4-AP es un compuesto despolarizante que actúa mediante el bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje (Hayes, 2004). Como consecuencia, se induce la liberación de varios neurotransmisores a hendidura sináptica (Kovács et al., 2003). Se ha descrito que la 4-AP aumenta la liberación de aminoácidos excitadores, principalmente de glutamato, en hipocampo, corteza entorrinal y cuerpo estriado. Como resultado, se piensa que este aumento de la actividad excitatoria es la base de las convulsiones inducidas por 4-AP (Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Medina-Ceja et al., 2000; Mihály et al., 2001).

Tal como hemos mostrado en los apartados previos, el papel de la 5-HT y de los fármacos antidepresivos, especialmente los inhibidores selectivos de la recaptación de monoaminas en la epilepsia no está esclarecido, aunque parece prevalecer sus efectos anticonvulsivantes (Jobe y Browning, 2005). En relación con los efectos de los antidepresivos en los ataques inducidos específicamente por 4-AP, se ha descrito que el ISRS sertralina ejerce efectos anticonvulsivos (Sitges et al., 2012) y anti-inflamatorios (Sitges et al., 2014). Concretamente, en hemos mostrado que la fluoxetina presenta efectos neuroprotectores frente al daño inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue doble. En primer lugar, investigar los efectos inducidos por una dosis única de 4-AP de 3 mg/kg, administrada periféricamente, sobre el metabolismo cerebral y sobre marcadores de daño neuronal. En segundo lugar, examinar si los eventuales efectos provocados por 4-AP son modificados por un tratamiento subagudo de fluoxetina (10 mg/kg, i.p., durante 7 días).

Para ello, el diseño del estudio (Fig. 39) fue similar al de los estudios anteriores. Concretamente, las ratas se agruparon de la siguiente forma:

- Grupo **VEH+SAL** (n=7).
- Grupo **FLUOX+SAL** (n=7).
- Grupo **VEH+4-AP** (n=11).
- Grupo **FLUOX+4-AP** (n=12).



**Fig. 39.** Protocolo experimental. La fluoxetina (10 mg/kg; i.p.) se administró durante un total de 7 días (4 días antes y 2 días después de la administración intraperitoneal de 3 mg/kg de 4-AP). Con el fin de evaluar una alteración a corto plazo del metabolismo cerebral, los estudios de neuroimagen por [<sup>18</sup>F]FDG PET se llevaron a cabo 3 días después de las crisis. Al día siguiente (día 4), los animales fueron sacrificados para la obtención de los cerebros y realización de los consiguientes estudios histoquímicos.

## 6.1 Resultados

### Comportamiento evaluación de las convulsiones, tiempo de latencia y mortalidad

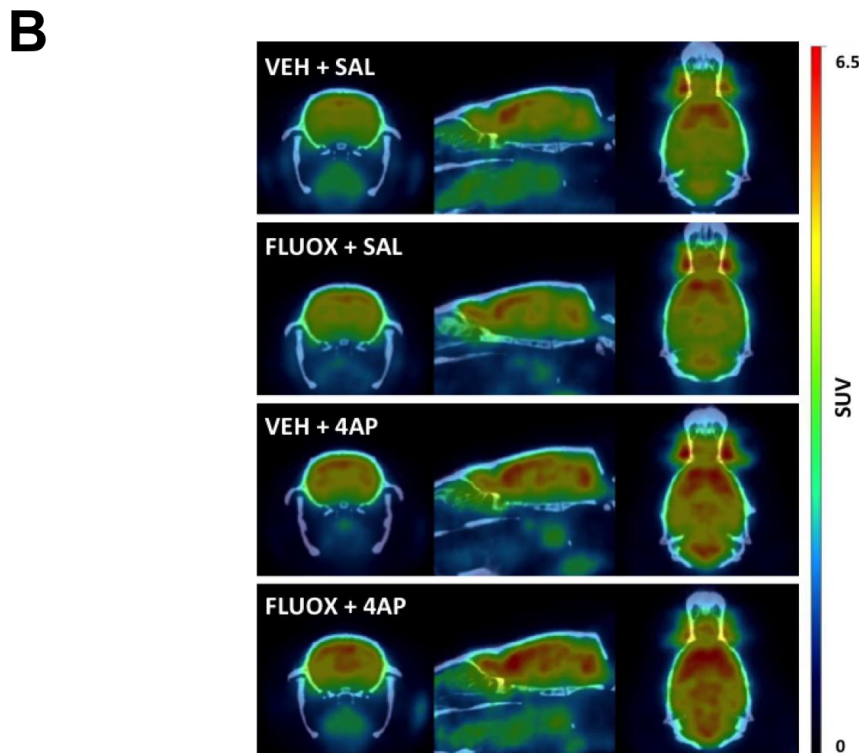
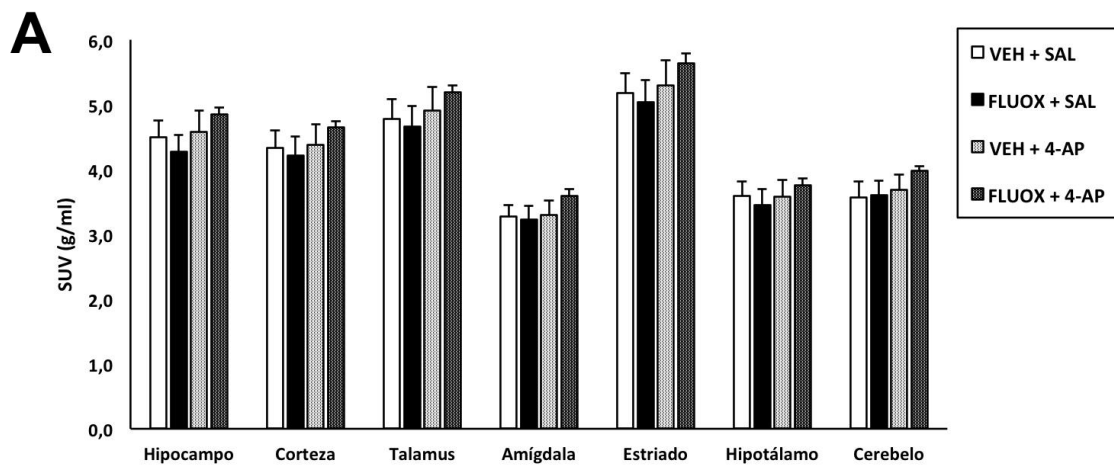
La administración de 3 mg/kg de 4-AP se asoció con una tasa de mortalidad muy baja. De hecho, sólo 1 de rata del grupo 4-AP+VEH murió inmediatamente después de la convulsión (9,1% de mortalidad). Por otra parte, la tasa de mortalidad de las ratas tratadas con fluoxetina y 4-AP (grupo, FLUOX+4-AP) fue del 16,7% (murieron 2 ratas de un total de 12). La comparación de las tasas de mortalidad de estos dos grupos no alcanzó significación estadística ( $p > 0,05$ ). En

la misma línea que la tasa de mortalidad, el tratamiento con fluoxetina no afectó significativamente a la severidad de las crisis, aunque curiosamente se observó una tendencia más alta en la severidad de las mismas en los animales a los que se les administró fluoxetina (grupo 4-AP+FLUOX). Así, de acuerdo con la escala de Racine modificada (Takács et al., 2010; Medina-Ceja et al., 2015), los valores que se registraron fueron de  $3,4 \pm 0,2$  para el grupo VEH+4-AP y  $4,2 \pm 0,3$  para el grupo FLUOX+4-AP ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, es de destacar que el tiempo de latencia a la crisis (tiempo en el que las ratas alcanzaban un valor de 3 en la escala comportamental; *wet dog shakes*) la fluoxetina aumentó significativamente más de tres veces dicho tiempo después de la inyección de 4-AP (tiempo de latencia VEH+4-AP =  $6,8 \pm 0,8$  min vs. tiempo de latencia FLUOX+4-AP =  $24,1 \pm 6,1$  min;  $p < 0,05$ ). Por supuesto, las ratas que no fueron inyectadas con AP-4 (grupos, VEH+SAL y SAL+FLUOX) no mostraron comportamiento convulsivo.

#### Metabolismo de la glucosa cerebral mediante [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET

Para los estudios PET, se utilizaron un total de 34 ratas, ya que del total de 37 ratas que empezaron el experimento, 3 murieron a causa de las convulsiones tal como se ha mencionado en el apartado anterior. El análisis de los estudios PET, realizado tres días después de las convulsiones, mostró ausencia de cambios en la actividad metabólica cerebral por la administración de 4-AP. Así, cuando se calcularon los SUV de las diferentes regiones, la 4-AP no modificó estadísticamente el metabolismo cerebral a corto plazo en ninguna de las áreas analizadas ( $p > 0,05$ ; Fig. 40A). Por ejemplo, en el hipocampo,  $\text{SUV}_{\text{VEH+SAL}} = 4,49 \pm 0,26$  g/ml vs.  $\text{SUV}_{\text{VEH+4-AP}} = 4,57 \pm 0,33$  g/ml ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, y como era de esperar por los resultados obtenidos en los estudios con pilocarpina, el metabolismo cerebral basal no fue afectado por el tratamiento subcrónico con fluoxetina (por ejemplo, en el hipocampo,  $\text{SUV}_{\text{FLUOX+SAL}} = 4,27 \pm 0,25$  g/ml; Fig. 40A). Finalmente, los animales tratados con fluoxetina y 4-AP mostraron valores de captación de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG no significativamente diferentes de los del resto de los grupos (por ejemplo, en el hipocampo,  $\text{SUV}_{\text{FLUOX+4-AP}} = 4,85 \pm 0,11$  g/ml; Fig. 40A). Con el fin de exponer de manera visual estos datos, se muestran imágenes

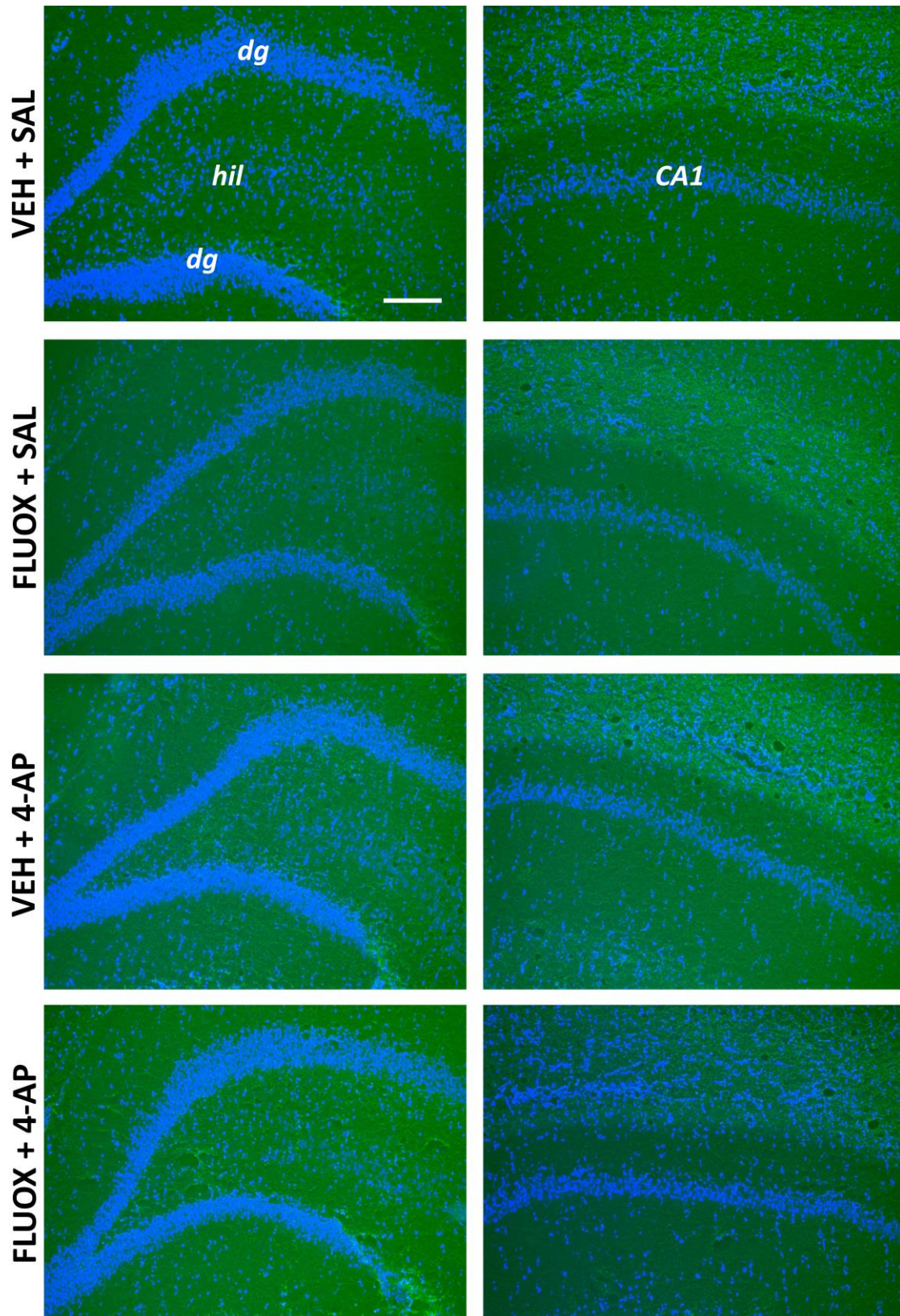
representativas de la captación cerebral de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (escaladas a SUV) de los cuatro grupos experimentales en la Fig. 40B.



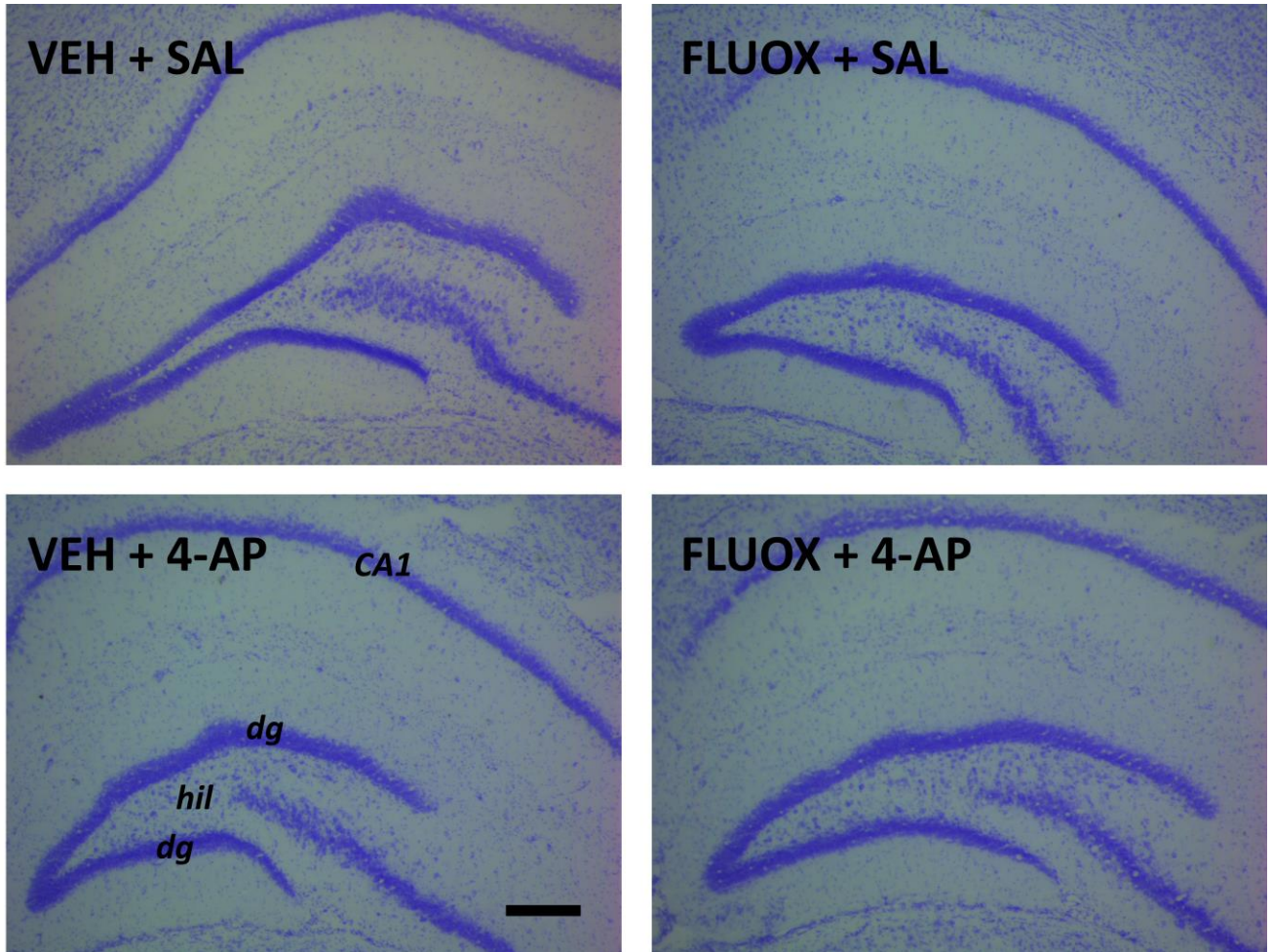
**Fig. 40.** El metabolismo cerebral no se alteró por la administración de una dosis convulsiva de 4-AP (3 mg/kg; i.p.). (A) El metabolismo de la glucosa cerebral regional fue evaluado por [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET (en unidades de SUV) 3 días después de la inyección de 4-AP. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. VEH+SAL (n = 7), FLUOX+SAL (n = 7), VEH+4-AP (n = 10), FLUOX+4-AP (n = 10). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías). (B) Imágenes fusionadas PET/CT de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (en vistas coronal, sagital y trans-axial) en escala de SUV de los cuatro grupos experimentales.

### Neurodegeneración y evaluaciones de muerte neuronal

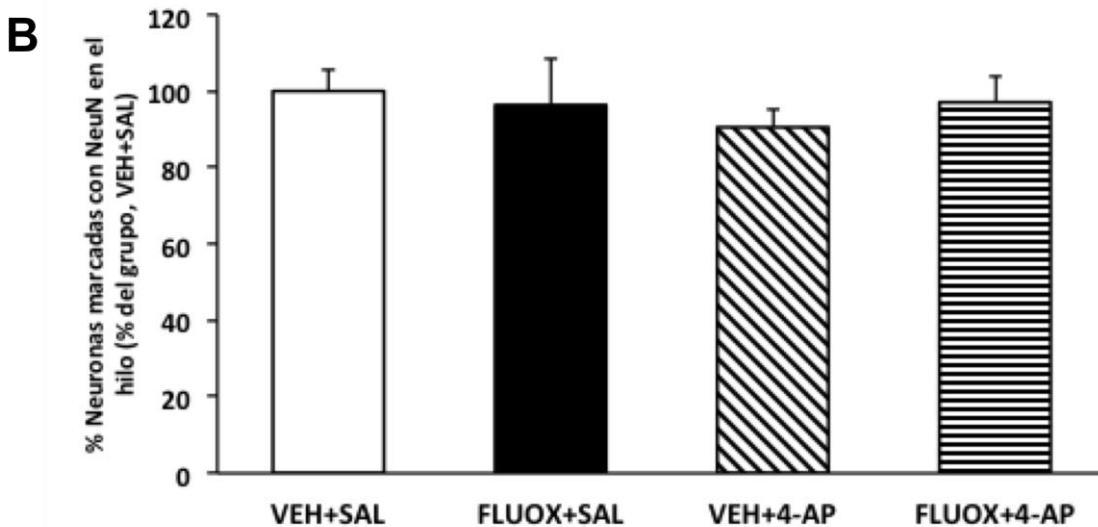
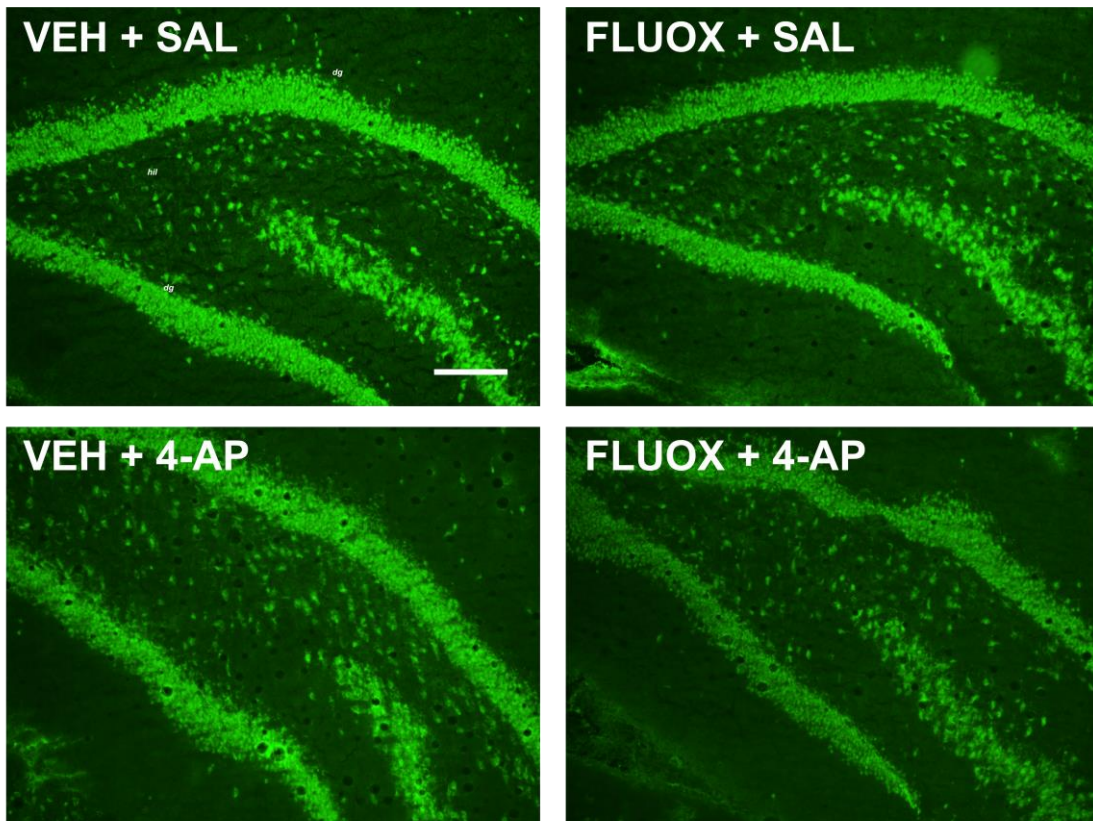
Con el fin de demostrar signos de neurodegeneración asociados a las convulsiones generadas por la administración periférica de 4-AP, se realizó una doble tinción de Fluoro-Jade C/DAPI. Las imágenes de fluorescencia a nivel del hipocampo, no revelaron signos de neurodegeneración en ratas tratadas con 4-AP (Fig. 41). Por otra parte, la tinción de Nissl (Fig. 42) y la inmunohistoquímica de NeuN (Fig. 43A) se realizaron con el objetivo de evidenciar signos de muerte neuronal en el hipocampo. Como se observa en la Figs. 42 y 43A, no se encontraron diferencias visuales aparentes entre las ratas control y las ratas administradas con 4-AP. Además, el análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de NeuN a nivel del *hilus*, mostró una pequeña reducción del 9,5%, no estadísticamente significativa, del número de neuronas inmunomarcadas en comparación con el grupo control (Fig. 43B). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las convulsiones provocadas por una única inyección de 3 mg/kg, i.p, de 4-AP no están asociadas a la muerte neuronal del hipocampo a corto plazo. En cuanto a los efectos del tratamiento subagudo con fluoxetina (10 mg/kg x 7 días), este tratamiento no alteró ni el marcaje de Fluoro-Jade C, ni la tinción de Nissl, ni la inmunorreactividad hacia NeuN, independientemente de si las ratas fueron tratadas con vehículo o con 4-AP (Figs. 41, 42 y 43).



**Fig. 41.** Micrografías representativas de fluorescencia DAPI/Fluoro-Jade C a nivel del giro dentado/hilo (columna izquierda) y CA1 (columna derecha) del hipocampo de los cuatro grupos experimentales. Las imágenes no muestran signos de neurodegeneración 4 días después de la crisis inducida por 4-AP. hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 250 micras.



**Fig. 42.** Micrografías de tinción de Nissl al nivel del hipocampo (giro dentado y CA1) de los cuatro grupos experimentales. No se observaron diferencias visuales entre los 4 grupos (n = 6 a 9 ratas/grupo; 4 cortes/rata). hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 500 micras.



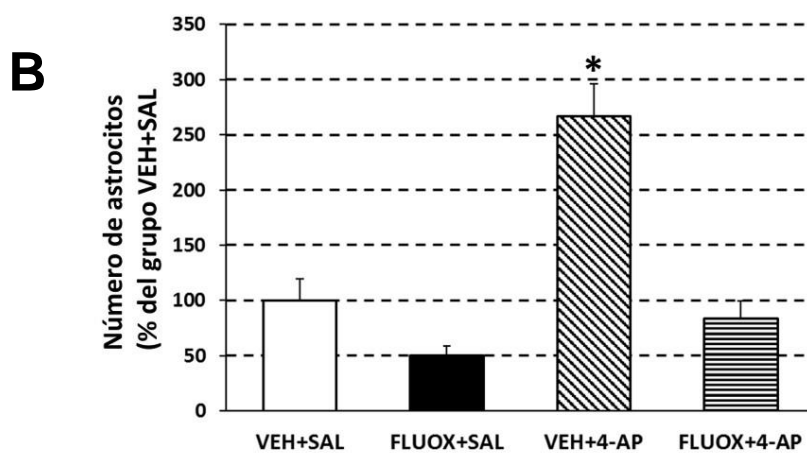
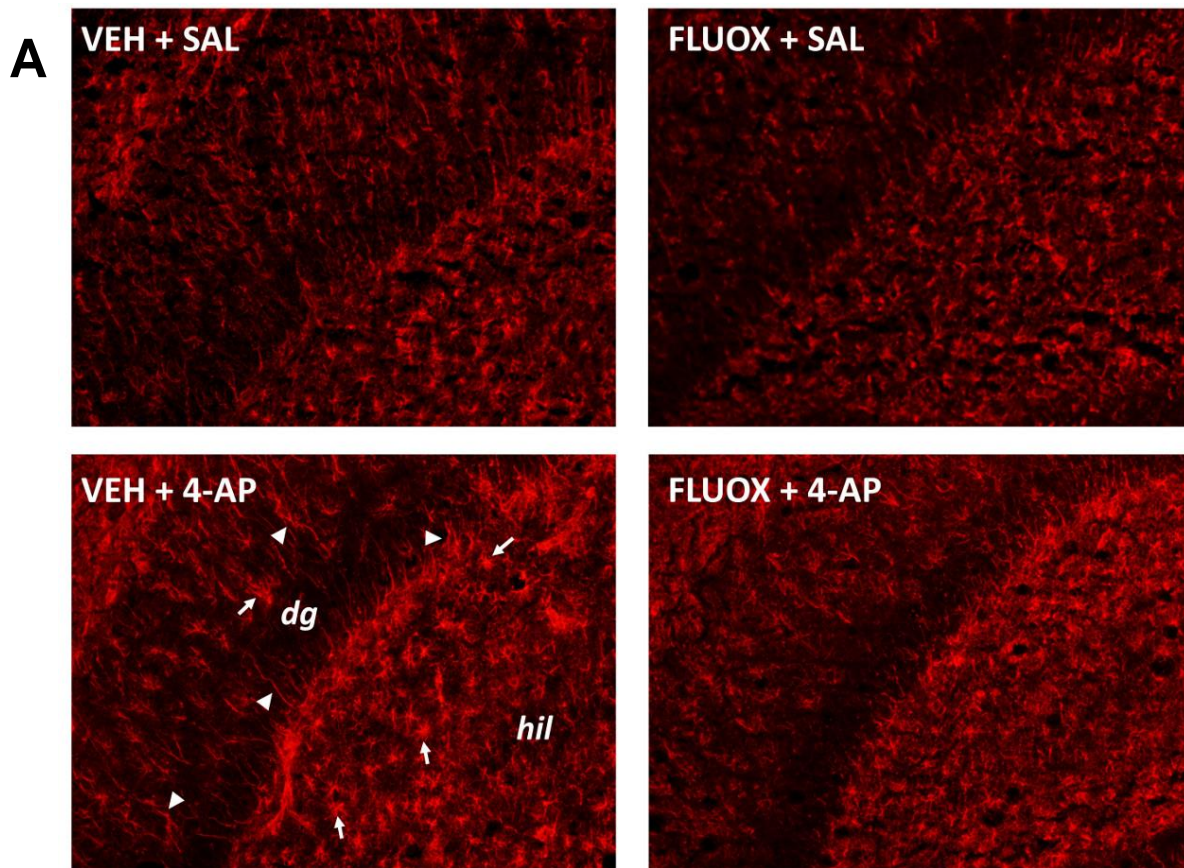
**Fig. 43.** Efecto del tratamiento de 4-AP y fluoxetina sobre la muerte neuronal evaluada por la inmunohistoquímica de NeuN. La viabilidad neuronal no fue modificada por las convulsiones inducidas por 4-AP. (A) Micrografías representativas de fluorescencia de NeuN del hipocampo a nivel del giro dentado/hilo de los cuatro grupos experimentales. hil: hilo; dg: giro dentado. Barra de escala: 250 micras. (B) Valoración de la viabilidad neuronal a nivel del *hilus* mediante la cuantificación de las neuronas marcadas con NeuN. Los datos se expresan como porcentaje de la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$  a  $9$  ratas/grupo) del grupo control (VEH+SAL). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos experimentales ( $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías).

### Inmunohistoquímica de GFAP

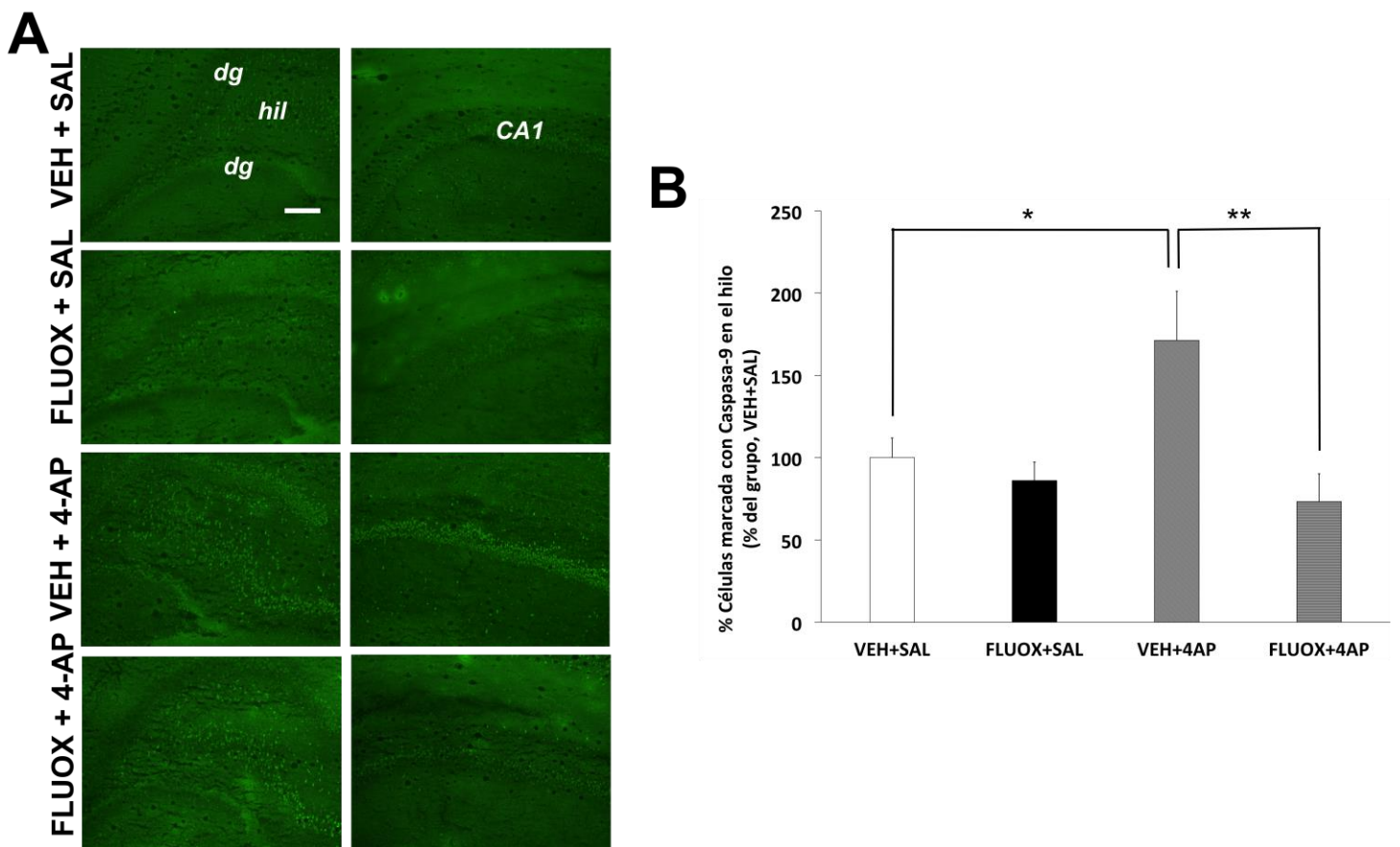
Con el fin de evaluar la astrogliosis asociada a un eventual daño cerebral inducido por la administración sistémica de una única dosis de 4-AP, se llevó a cabo inmunohistoquímica de GFAP. Como se muestra en la Fig. 44A y 44B. se observó un aumento de los astrocitos marcados con GFAP en el giro dentado y CA1 del hipocampo en ratas tratadas con 4-AP. Además, la respuesta astrocítica asociada con 4-AP incluye hipertrofia del cuerpo celular y de los procesos celulares (figura 44, fila superior). Por otra parte, el tratamiento subagudo con fluoxetina redujo notablemente esta astrogliosis reactiva inducida por 4-AP (Fig. 44A y 44B).

### Inmunohistoquímica de Caspasa-9

La inmunohistoquímica de caspasa-9 se realizó para evidenciar si las convulsiones inducidas por 4-AP activaban la ruta mitocondrial de la apoptosis. Como se muestra en las imágenes representativas (Fig. 45A), la inmunoreactividad de caspasa-9 se incrementó notablemente en el *hilus* y el giro dentado después de la administración única de 4-AP. Esta inducción se redujo notablemente en los animales tratados subcrónicamente con fluoxetina, tal como se muestra en las imágenes de fluorescencia (Fig. 6A). Cuando se analizó cuantitativamente, se observó que la administración de fluoxetina redujo significativamente en un 60% aproximadamente, el número de células marcadas con caspasa-9, en el *hilus* hipocampal ( $p > 0,05$ ; Fig. 45B).



**Fig. 44.** Las convulsiones provocadas por la administración periférica de 4-AP (3 mg/kg, i.p.) indujeron astrogliosis a nivel del hipocampo, centrado principalmente en la zona del giro dentado/hilio. Esta gliosis reactiva incluye hipertrofia del cuerpo celular y de los procesos celulares (señalados por flechas y puntas de flechas, respectivamente). La activación glial se redujo por el tratamiento subagudo con fluoxetina (10 mg/kg x 7 d, i.p.). (A) Las imágenes muestran micrografías representativas de GFAP (n = 5 a 9 ratas/grupo) al nivel del giro dentado (panel izquierdo) y CA1 (panel derecho) de los grupos VEH+4-AP (fila superior) y FLUOX+4-AP (fila inferior). Los grupos de control (VEL+SAL y FLUOX+SAL) no mostraron signos de astrogliosis como hemos mostrado en estudios anteriores. Barra de escala: 100 micras. (B) La gráfica muestra el análisis cuantitativo de células marcadas con GFAP en el *hilus* (\* $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías).



**Fig. 45.** Las convulsiones provocadas por la administración de 4-AP (3 mg/kg, i.p.) indujeron la expresión de caspasa-9 en el hipocampo. La sobreexpresión de caspasa-9 se redujo significativamente por el tratamiento con fluoxetina (10 mg/kg x 7d, i.p.). (A) Micrografías de fluorescencia de caspasa-9 ( $n = 4$  ratas/grupo) al nivel del giro dentado/*hilus* (panel izquierdo) y CA1 (panel derecho), de los 4 grupos experimentales. hil: *hilus*; dg: giro dentado. Barra de escala: 250 micras. (B) Cuantificación de las células que expresan caspasa-9; grupos, VEH+4-AP y FLUOX+4-AP al nivel del hilo (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ANOVA de dos vías).

## 6.2 Discusión

En el presente estudio, en primer lugar se evaluó el efecto de las convulsiones provocadas por la administración periférica de una dosis baja de 4-AP tanto a nivel de metabolismo cerebral como de marcadores de daño neuronal. El segundo objetivo fue evaluar si una administración subaguda de fluoxetina era capaz de alterar, de alguna manera, la respuesta convulsiva y los eventuales signos de daño neuronal, inducidos por el agente convulsivo 4-AP. Para cumplir con este objetivo, se llevó a cabo un estudio [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET *in vivo*, 3 días

después de la lesión con el fin de medir el metabolismo cerebral regional. Además, al día siguiente (día 4), se llevaron a cabo varios estudios histoquímicos al nivel del hipocampo para objetivizar un eventual daño neuronal. Para ello, se utilizó el marcaje con Fluoro-Jade C como marcador de neurodegeneración, la tinción de Nissl y la inmunohistoquímica de NeuN para la viabilidad neuronal, la inmunohistoquímica de caspasa-9 para evaluar la activación de la vía de apoptosis mitocondrial y, finalmente, la inmunohistoquímica de GFAP para evaluar astrogliosis asociada con un potencial daño neuronal.

### **6.2.1 La actividad convulsiva provocada por la administración periférica de una dosis única de 4-AP**

La dosis de 4-AP utilizada en el presente estudio (3 mg/kg, i.p.) se eligió basándonos en estudios publicados, según los cuales, una dosis ligeramente inferior (2,5 mg/kg; i.p.) inducía convulsiones, actividad EEG epileptiforme, así como sobreexpresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (dos citocinas proinflamatorias) en hipocampo de rata (Sitges et al., 2012; Sitges et al., 2014; Gómez et al., 2014). La actividad convulsiva y los cambios neuroquímicos también se han descrito con dosis más altas de 4-AP, que van desde 4,5 mg/kg (Borbély et al., 2015), 5 mg/kg (Mihály et al., 2001; Vizi et al., 2004) y hasta 7 mg/kg (Kovács et al., 2003; Yu et al., 2014). Ya que una de nuestras principales preocupaciones era evitar un exceso de mortalidad asociado a convulsiones severas, y teniendo en cuenta los signos de inflamación del cerebro que se encuentran reportados con una dosis de 2,5 mg/kg, decidimos inyectar una dosis ligeramente superior; es decir, 3 mg/kg. En el presente estudio, todas las ratas tratadas con 4-AP mostraron una notable, aunque moderada, actividad convulsiva (todas las ratas inyectadas con 4-AP mostraron un estado 3 de la escala de Racine modificada, puntuación media del grupo VEH+4-AP=  $3,4 \pm 0,2$ ) después de la administración de 4-AP. El periodo de latencia de las crisis generada por 4-AP fue de  $6,8 \pm 0,8$  min. Este tiempo de latencia es similar al previamente descrito por Sitges et al. (2012) después de la inyección i.p. de 2,5 mg/kg 4-AP ( $7,0 \pm 2,3$  min). Además, la

mortalidad fue muy baja, ya que sólo se registró una única muerte (tasa de supervivencia del grupo, VEH+4-AP= 90,9%).

### **6.2.2 Signos de daño cerebral inducidos por 4-AP**

La ELT humana y los modelos animales de SE, tales como el del ácido kaínico y el de pilocarpina (o litio-pilocarpina) muestran daño cerebral intenso, aumento de citocinas pro-inflamatorias, activación glial y muerte neuronal (Ben-Ari, 1985; Mello et al., 1993; Jin et al., 2009; Rossi et al., 2013; Choi et al., 2015). El hipocampo, y en especial, la zona del giro dentado/*hilus*, es considerada una de las áreas del cerebro más afectadas por la actividad convulsiva. En la actualidad no existe un acuerdo general acerca de la posible lesión debida a la exposición de 4-AP y se puede encontrar en la literatura resultados opuestos. En general, la mayoría de los estudios coinciden en que el daño neuronal inducido por 4-AP periférica no es muy intenso (Peña y Tapia, 1999; Slezia et al., 2004, Vizi et al., 2004; Borbély et al., 2015), y en general se apoya la tesis de que estas crisis no están asociadas a daño neuronal. En este sentido, incluso se ha descrito que la actividad epileptiforme mediante la colocación de un cristal de 4-AP en la superficie cortical no induce la muerte neuronal (Takács et al., 2010). Sin embargo, la infusión directa por microdiálisis de 4-AP en el hipocampo da lugar a muerte neuronal, especialmente en las zonas CA1 y CA3, aunque también en *hilus* (Peña y Tapia, 2000; Ayala y Tapia, 2005; Netzahualcoyotzi y Tapia, 2014). Dicha muerte neuronal se ha asociado a la liberación de aminoácidos excitatorios (Peña y Tapia, 1999; Ayala y Tapia, 2005; Netzahualcoyotzi y Tapia, 2014), y a la activación de las caspasas mediada por  $Ca^{2+}$ . Por tanto, parece que la muerte neuronal inducida por agentes convulsivos en realidad está asociada con la intensidad y la duración de las convulsiones, que a su vez está relacionada con la concentración local del compuesto en el cerebro. En consecuencia, la evidencia de muerte neuronal del hipocampo se encuentra sobre todo cuando el 4-AP es infundido intra-hipocampalmente. Dado que en el presente estudio la 4-AP (3 mg/kg) fue administrada periféricamente, no es sorprendente que no observáramos signos de muerte neuronal en el hipocampo. Por lo tanto, cuando

se compararon la tinción de violeta de cresilo y la de NeuN, no se encontraron diferencias entre las imágenes inmunohistoquímicas del grupo afectado (grupo VEH+4-AP) y el de las ratas control (grupo, VEH+SAL), a nivel del giro dentado/hilo y CA1, revelando que la viabilidad neuronal, aparentemente, no se vió empeorada por las convulsiones inducidas por 4-AP (Fig. 42 y 43).

Sin embargo, además de la muerte neuronal, se han descrito otros signos de daño en el hipocampo inducidos por la administración periférica de una única dosis baja de 4-AP. De hecho, como se mencionó anteriormente, 2,5 mg/kg de 4-AP aumentó la expresión de citocinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$  (Sitges et al., 2012; Sitges et al., 2014; Gómez et al., 2014). Además, aunque no se observó muerte neuronal cuando un cristal de 4-AP fue colocado en la superficie de la corteza de rata, se produjo un signo característico de daño neuronal. Consistía en una alteración de la morfología de las neuronas, generando las llamadas "neuronas oscuras" (del inglés *dark neurons*; Baracskey et al., 2008; Takács et al., 2010). A pesar de que no realizamos la tinción argéntica de "Gallyas" para evidenciar la presencia de neuronas "oscuras", las imágenes de violeta de cresilo de las neuronas del hipocampo no revelaron ninguna contracción o hiper cromatismo (Fig. 42), considerados respuestas morfológicas asociadas a las neuronas "oscuras" (Gallyas et al., 1993). Además, para la evaluación de la eventual neurodegeneración inducida por 4-AP se llevó a cabo tinción de Fluoro-Jade C. Como ya mencionamos, esta técnica es ampliamente reconocida como marcaje de neurodegeneración, independientemente del agente causal (Schmued et al., 2005). Los modelos animales de SE, como el de pilocarpina (con o sin pre-tratamiento con litio) y por administración de ácido kaínico, inducen una neurodegeneración hipocampal rápida e intensa, según la evaluación de Fluoro-Jade (Wang et al., 2008; Rossi et al., 2013; Choi et al., 2015). En nuestro estudio, no encontramos signos de neurodegeneración hipocampal a corto plazo después de la inyección de 4-AP, ya que no se observaron células marcadas con Fluoro-Jade C (Fig. 41).

Por lo tanto, la ausencia de neurodegeneración y de muerte neuronal encontrada en el presente estudio está de acuerdo con el consenso general, en relación al moderado daño neuronal inducido por la administración periférica de 4-AP (Peña

y Tapia, 1999; Peña y Tapia, 2000; Slezia et al., 2004; Vizi et al., 2004; Takács et al., 2010). Sin embargo, dado que este estudio se limitó a tan sólo 4 días y sólo una única dosis de 4-AP (3 mg/kg), no podemos realizar una afirmación categórica sobre la ausencia de neurodegeneración y muerte neuronal tras las crisis inducidas por la administración periférica de 4-AP. En consecuencia, no podemos descartar neurodegeneración, reducción de la viabilidad o incluso muerte neuronal a dosis más altas o cuando se evalúa en puntos temporales posteriores.

A pesar de los resultados mencionados anteriormente con respecto a la falta de evidencia de muerte neuronal después de la administración de 4-AP, sí encontramos signos de daño en hipocampo. De este modo, se observó sobreexpresión de GFAP y de caspasa-9, cuando estos marcadores fueron analizados 4 días después de la crisis. La gliosis se considera uno de los principales marcadores de lesión neuronal (Sofroniew y Vintners, 2010) y ha descrito en la epilepsia humana y en modelos animales de epileptogénesis (Beach et al., 1995; Belluardo et al., 1996; Do Nascimento et al., 2012). En el presente estudio, la respuesta astrocítica frente a las convulsiones inducidas por 4-AP consistió en la proliferación astrogliar con un engrosamiento notable de los procesos celulares. Estas características son típicas de astrogliosis reactiva moderada (Sofroniew y Vinateros, 2010). Los mecanismos implicados en el daño cerebral inducido por astrocitos activados son múltiples, incluyendo el estrés oxidativo mediante el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno y liberación de citocinas pro-inflamatorias (Thomas et al., 2004; Gómez et al., 2014; Choi et al., 2015). Curiosamente, el hipocampo es una de las áreas del cerebro en las que las citocinas inflamatorias están altamente inducidas por el SE (De Simoni et al., 2000). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que las convulsiones inducidas por el 4-AP aumentan la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , dos de las citoquinas pro-inflamatorias más reconocidas (Gómez et al., 2014). La activación de la apoptosis se ha propuesto como una forma de daño neuronal inducido por gliosis. Las citocinas pro-inflamatorias liberadas por las células gliales pueden activar tanto la vía de señalización extrínseca, a través de receptores de muerte celular, como la vía intrínseca (mitocondrial) (Grunnet et al., 2009). Entre los factores que favorecen la vía intrínseca de la apoptosis, el

estrés oxidativo ha sido ampliamente implicado (Cao et al., 2011). En el presente estudio, hemos encontrado un marcado aumento de la expresión de la caspasa-9 (un componente clave de la vía intrínseca de la apoptosis) a nivel del hipocampo después de la crisis inducida por 4-AP. La producción de especies reactivas de oxígeno, junto con la secreción de citocinas pro-inflamatorias por la respuesta glial, podrían activar la vía intrínseca de la apoptosis mediante la inducción de la sobreexpresión de la caspasa-9. Esta cascada de eventos, junto con la activación mediada por citocinas de la vía extrínseca de la apoptosis podría finalmente resultar en un proceso de muerte neuronal retardada. En este sentido, Ayala y Tapia (2005) encontraron que las crisis agudas inducidas por perfusión intrahipocampal de 4-AP en rata daban lugar a muerte neuronal retardada.

El período interictal se asocia con hipometabolismo cerebral, tal como repetidamente se ha encontrado mediante [<sup>18</sup>F]FDG-PET tanto en seres humanos (Lamusuo et al., 2001; Nelissen et al., 2006) como en animales (Wong et al., 2010). En varios modelos animales de epileptogénesis, el intenso y generalizado hipometabolismo cerebral se asocia con signos de daño cerebral, especialmente en áreas temporales (Guo et al., 2009; Jupp et al., 2012; Virdee et al., 2012). Y que la captación de [<sup>18</sup>F]FDG por el cerebro se reduce en gran medida por la anestesia (Toyama et al., 2004; Prieto et al., 2011; Lee et al., 2012), los animales se mantuvieron conscientes durante el periodo de captación del radiotrazador. Nuestros resultados no revelaron ningún cambio en el metabolismo cerebral en el día 3 después de la inyección de 4-AP (Fig. 40). Podría ser explicado como resultado de la limitada muerte neuronal asociada con la administración periférica de 4-AP, en oposición a la extensa muerte neuronal inducida por los modelos de SE, de ácido kaínico y pilocarpina. Además, el hipometabolismo en modelos animales de SE tiene lugar en la fase temprana (Guo et al., 2009) antes de que el animal se convierta epiléptico. Sin embargo, la administración de 4-AP a los roedores no se considera un modelo de epilepsia, puesto que no conduce a convulsiones espontáneas recurrentes, típicas de la epilepsia crónica (Bobérly et al., 2015). Por lo tanto, la ausencia de hipometabolismo cerebral a corto plazo que describimos en este estudio está de

acuerdo tanto con la ausencia de muerte neuronal como con la naturaleza no epileptógena de este modelo.

### **6.2.3 Efectos de la fluoxetina en la actividad convulsiva inducida por 4-AP**

Hemos de volver a recordar que aunque el papel de la 5-HT y de los fármacos antidepresivos en la epilepsia y en las convulsiones no se conoce completamente, parece predominar acciones anticonvulsivas (Jobe y Browning, 2005; Bagdy et al., 2007). Entre los fármacos antidepresivos, los más prescritos hoy en día son los inhibidores selectivos de la recaptación de monoaminas, incluyendo los ISRS clásicos y los más recientes Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT y noradrenalina. En el presente estudio, con el fin de evaluar los efectos de fluoxetina, se administró durante 7 días (5 veces antes y 2 veces después de la crisis). Este mismo régimen farmacológico mostró efectos neuroprotectores contra el hipometabolismo y el daño cerebral inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE. La severidad de las convulsiones inducida por la inyección intraperitoneal de 3 mg/kg 4-AP no fue modificada por el tratamiento con fluoxetina. Sin embargo, el tiempo de latencia a la aparición de *wet dog shakes* incrementó significativamente tres veces en el grupo tratado previamente con fluoxetina (pasando de FLUOX+VEH =  $6.8 \pm 0.8$  a FLUOX+4-AP =  $24.1 \pm 6.1$  min), revelando un perfil anticonvulsivo. A pesar de que los fármacos antidepresivos se asocian con efectos anticonvulsivos, hasta la fecha no existen resultados concluyentes sobre los efectos en el comportamiento de los antidepresivos selectivos en diferentes modelos animales de SE y en las convulsiones. Así, tal como hemos mostrado en el modelo de litio-pilocarpina, la fluoxetina no afectó a la intensidad de las crisis. En la misma línea, se ha reportado que la administración del antidepresivo duloxetina no afectó a la actividad convulsiva inducida por la administración de kainato (Choi et al., 2015). En cambio, las alteraciones electroencefalográficas inducidas por pentilentetrazol y 4-AP se evitaron por una única administración del ISRS sertralina (Sitges et al., 2012). Además, la sertralina (administrada a una dosis 25 mg/kg) abolió las crisis tónico-clónicas inducidas por 4-AP y aumentó más de

tres veces el tiempo de latencia para el primer movimiento del perro mojado (pasando de  $7,0 \pm 2,3$  para el  $26,3 \pm 5,4$  min) al igual que se muestra en esta Tesis Doctoral con la administración subcrónica de 10 mg/kg/día de fluoxetina (de  $6,8 \pm 0,8$  min a  $24,1 \pm 6,1$  min). El hecho de que dos ISRS diferentes, sertralina y fluoxetina, muestren un comportamiento idéntico en el tiempo de latencia de la crisis después de la inyección de 4-AP, apunta a un mecanismo común en las acciones “anticonvulsivas” de ambos fármacos, es decir; el bloqueo del transportador de 5-HT y el consiguiente aumento del contenido extracelular cerebral de 5-HT.

#### **6.2.4 Efectos neuroprotectores de la fluoxetina en el daño cerebral hipocampal inducido por 4-AP**

Existen numerosas evidencias sobre los efectos neuroprotectores de 5-HT y de los fármacos antidepresivos. En este sentido, se ha descrito la reducción de la activación mitocondrial dependiente de la vía intrínseca de caspasa y la regulación de Bcl-XL se ha descrito (Stankovski et al., 2007). Se cree que los efectos neuroprotectores de la fluoxetina están mediados por el aumento extracelular de 5-HT (Malberg et al., 2000; Mahar et al., 2014). No obstante, dado que algunos efectos de la fluoxetina y otros ISRS se han asociado a mecanismos no serotoninérgicos (Wang et al., 2003; Igelström y Heyward, 2012a; Igelström y Heyward, 2012b; Vizi et al 2013;), no se pueden descartar acciones directas (independientes de 5-HT) de la fluoxetina en el efecto neuroprotector. En este sentido, algunos de los estudios citados señalan que la neuroprotección por la fluoxetina se relaciona con la inhibición directa de la excitotoxicidad mediada por glutamato (Wang et al., 2003; Vizi et al., 2013), que, curiosamente, se incrementa con la 4-AP (Ayala y Tapia, 2005; Netzahualcoyotzi y Tapia 2014). Nuestros resultados sí apoyan los efectos protectores de la fluoxetina contra los signos de daño cerebral inducido por 4-AP. Así, la astrogliosis (Fig. 44) y la sobreexpresión de la caspasa-9 (Fig. 45) en el hipocampo después de las convulsiones inducidas por el 4-AP se redujeron eficazmente por la administración subaguda de fluoxetina. Este efecto fue especialmente marcado en la zona del giro

dentado/hilo. En particular, el número de células hilares que expresan caspasa-9 se redujo en un 60% por la administración previa de fluoxetina. En este sentido, en diferentes modelos de epileptogénesis, se ha reportado que algunos ISRS y fármacos similares como los inhibidores de la recaptación de noradrenalina y 5-HT muestran efectos similares. De hecho, los efectos neuroprotectores de la diferentes antidepresivos como son la fluoxetina en el modelo de litio-pilocarpina descritos en la presente Tesis Doctoral y en el modelo de ácido kaínico en ratón (Jin et al., 2009) junto con efectos protectores descritos para la duloxetina en el modelo de SE por administración de ácido kaínico (Choi et al., 2015) apoyan un papel neuroprotector frente a la epileptogenesis. En cuanto a su mecanismo de acción se ha sugerido que la reducción de la activación glial, junto con la supresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$ , podrían participar en el efecto neuroprotector de la duloxetina frente a la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (Choi et al., 2015). Es importante destacar que la el ISRS sertralina también redujo la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el hipocampo después de la inyección de 4-AP (2,5 mg/kg) (Sitges et al, 2014; Gómez et al., 2014). Dado que, ambos los fármacos, sertralina y fluoxetina, comparten el mecanismo mismo de acción, es probable que los efectos protectores que observamos en este estudio para la fluoxetina puedan estar relacionados, al menos en parte, con la reducción de las citocinas pro-inflamatorias.

En resumen, nuestros resultados muestran que las crisis inducidas por una única dosis convulsiva periférica de 4-AP fueron acompañadas con signos de daño del hipocampo, consistentes en astrogliosis moderada e inducción de la expresión de la proteína proapoptótica caspasa-9. En cuanto a los efectos de la fluoxetina, incrementó de manera efectiva el tiempo de latencia de las crisis y redujo los dos marcadores mencionados de daño neuronal. Nuestros resultados apoyan, un potencial neuroprotector para los antidepresivos y en concreto los ISRS, frente al daño cerebral inducido por convulsiones.

## ***7 CONCLUSIONES***

---



1. El modelo de *status epilepticus* (SE) mediante la administración de litio-pilocarpina en rata generó un marcado hipometabolismo cerebral generalizado a corto plazo (día 3) cuando fue evaluado mediante neuroimagen por [<sup>18</sup>F]FDG-PET. Esta reducción de la actividad metabólica retornó a valores basales cuando fue analizado en el día 30, correspondiente a la fase tardía del periodo silente, indicando que la alteración metabólica elicitada por este modelo de SE es transitoria.
2. El hipometabolismo inducido por modelo de litio-pilocarpina de SE está asociado a signos de daño neuronal (marcadores de neurodegeneración, astrogliosis e inducción de la expresión de caspasa-9). El daño neuronal inducido por la pilocarpina se mantiene en el tiempo, ya que siguen siendo observables al final del periodo silente (día 33 después del SE).
3. El tratamiento con el inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS) fluoxetina (10 mg/kg) durante 7 días, previno el hipometabolismo cerebral y redujo los signos de daño neuronal asociados al modelo de litio-pilocarpina de SE, revelando un papel neuroprotector de la fluoxetina en este modelo animal.
4. La depleción de 5-HT por administración subaguda del inhibidor de la enzima triptofanhidroxilasa, *p*-clorofenilalanina (PCPA), no tuvo consecuencias neurológicas a corto plazo ni sobre el hipometabolismo ni sobre el daño neuronal inducido por el modelo de litio-pilocarpina de SE.
5. Los resultados obtenidos en los puntos 3. y 4. sugieren que en el efecto neuroprotector de la fluoxetina en este modelo experimental de SE, podrían participar acciones directas de naturaleza no serotoninérgica.
6. La administración previa del antagonista selectivo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>, SCH23390 no modificó de manera significativa la respuesta conductual ni en el hipometabolismo inducido por la administración de litio-pilocarpina. Sin embargo, redujo la expresión de marcadores de daño neuronal (marcadores de neurodegeneración,

astrogliosis, inducción de la expresión de caspasa-9) asociados a este modelo de SE de litio-pilocarpina. Estos resultados avalan la participación del sistema dopaminérgico y concretamente de la familia de los receptores D<sub>1</sub> en dichas alteraciones neurológicas.

7. Las crisis convulsivas por administración periférica de 4-aminopiridina (4-AP) no tuvo consecuencias sobre el metabolismo cerebral a corto plazo. Estas crisis no fueron seguidas de neurodegeneración ni de muerte neuronal. En cambio, los estudios inmunohistoquímicos revelaron la activación de marcadores de daño neuronal (gliosis, signos de apoptosis) en el hipocampo de las ratas tratadas con 4-AP. Estas alteraciones neurológicas pueden explicarse por la moderada intensidad de las convulsiones así como por el carácter no epileptogénico de este compuesto.
8. Por último, el tratamiento subcrónico con el ISRS fluoxetina en el modelo de crisis agudas inducidas por 4-AP mostró actividad anticonvulsiva al incrementar por más de tres veces el tiempo de latencia de las crisis. Además, la fluoxetina mostró actividad neuroprotectora al disminuirlos signos de daño neuronal inducidos por 4-AP.

## ***8 BIBLIOGRAFÍA***

---



## A

---

**Akhlaghi Z, Sayyah M, Mokhtari M, Ahmadi A. 2012.** *Effect of intra-amygdala injection of lipopolysaccharide on kindling epileptogenesis in adult rats.* Arch Iran Med. (9):557-9

**Altar, C.A, Whitehead, RE, Chen, R, Wörtwein, G, Madsen, TM, 2003.** *Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain.* Biol. Psychiatry 54, 703–709

**Amabeoku GJ. 1993.** *The involvement of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and acetylcholine in imipramine-induced seizures in mice.* Experientia. 49(10):859-64

**André V, Dubé C, François J, Leroy C, Rigoulot MA, Roch C, Namer IJ, Nehlig A. 2007.** *Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model.* Epilepsia. 48 Suppl 5:41-7. Erratum en Epilepsia 48(12):2379

**Auvergne R, Leré C, El Bahh B, Arthaud S, Lespinet V, Rougier A, Le Gal La Salle G. 2002.** *Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment.* Brain Res. 954(2):277-85

**Avanzini G, Franceschetti S, 2003.** *Cellular biology of epileptogenesis.* Lancet Neurol. 2(1):33-42

**Ayala GX, Tapia R. 2005.** *Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy.* Eur J Neurosci. 22(12):3067-76

## B

---

**Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. 1991.** *Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata.* Neuroscience. 42(2):351-63

**Bagdy, G, Kecskemeti, V, Riba, P, Jakus, R, 2007.** *Serotonin and epilepsy.* Journal of Neurochemistry, 100, 857-873

**Balcerzyk M, Kontaxakis G, Delgado M, García-García L, Correcher C, González AJ, González A, Rubio J.L, Benlloch J.M, Pozo M.A, 2009.** *Initial performance evaluation of a high resolution Albira small animal positron emission tomography scanner with monolithic crystals and depth-of-interaction encoding from user's perspective.* Measurement Science and Technology, 20, 104011

**Baracskaý P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, Czúrkó A. 2008.** *Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat.* Brain Res. 1228:217-28

**Barone P, Palma V, de Bartolomeis A, Cicarelli G, Campanella G. 1992.** *Dopaminergic regulation of epileptic activity.* *Neurochem Int.* 20 Suppl:245S-249S

**Bascuñana P, Javela J, Delgado M, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, García-García L, Pozo MÁ. 2016.** *[18F]FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylentetrazole (PTZ) Kindling Outcome in Rats.* *Mol Imaging Biol.* doi: 10.1007/s11307-016-0950-0

**Beach TG, Woodhurst WB, MacDonald DB, Jones MW. 1995.** *Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy.* *Neurosci Lett.* 191(1-2):27-30

**Begley CE, Famulari M, Annegers JF, Lairson DR, Reynolds TF, Coan S, Dubinsky S, Newmark ME, Leibson C, So EL, Rocca WA. 2000.** *The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data.* *Epilepsia.* 41(3):342-51

**Belluardo N, Mudo G, Jiang XH, Condorelli DF. 1996.** *Induction of astroglial gene expression by experimental seizures in the rat: spatio-temporal patterns of the early stages.* *Glia.* 16(2):174-86

**Ben-Ari Y. 1985.** *Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy.* *Neuroscience.* 14(2):375-403

**Bercovici E, Cortez MA, Wang X, Snead OC. 2006.** *Serotonin depletion attenuates AY-9944-mediated atypical absence seizures.* *Epilepsia.* 47(2):240-6

**Berger M, Gray JA, Roth BL. 2009.** *The expanded biology of serotonin.* *Annu Rev Med.* 60:355-66

**Bertram EH. 2013.** *Neuronal circuits in epilepsy: do they matter?* *Exp Neurol.* 244:67-74

**Bonnycastle DD, Giarman NJ, Paasonen MK, 1957.** *Anticonvulsant compounds and 5-hydroxytryptamine in rat brain.* *British Journal of Pharmacology,* 12, 228-231

**Borbély S, Czégé D, Molnár E, Dobó E, Mihály A, Világi I. 2015.** *Repeated application of 4-aminopyridine provoke an increase in entorhinal cortex excitability and rearrange AMPA and kainate receptors.* *Neurotox Res.* 27(4):441-52

**Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingledine R. 2003.** *Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model.* *Exp Neurol.* 182(1):21-34

**Bourne JA. 2001.** SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. *CNS Drug Rev.* 7(4):399-414.

**Bourne JA, Fosbraey P, Halliday J. 2001.** SCH 23390 affords protection against soman-evoked seizures in the freely moving guinea-pig: a concomitant neurochemical, electrophysiological and behavioural study. *Neuropharmacology.* 40(2):279-88

**Bozzi Y, Borrelli E. 2013.** The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci.* 7:157. doi: 10.3389/fncel.2013.00157

**Bozzi Y, Vallone D, Borrelli E, 2000.** Neuroprotective role of dopamine against hippocampal cell death. *J Neurosci.* 20(22): 8643-9

**Bradford HF. 1995.** Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol.* 47(6):477-511

**Braitberg G, Curry SC. 1995.** Seizure after isolated fluoxetine overdose. *Ann Emerg Med.* 26(2):234-7

**Breier JI, Mullani NA, Thomas AB, Wheless JW, Plenger PM, Gould KL, Papanicolaou A, Willmore LJ. 1997.** Effects of duration of epilepsy on the uncoupling of metabolism and blood flow in complex partial seizures. *Neurology.* 48(4):1047-53

**Buckmaster PS, Haney MM. 2012.** Factors affecting outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 102(3):153-9.

**Buckmaster PS, Otero-Corchón V, Rubinstein M, Low MJ. 2002.** Heightened seizure severity in somatostatin knockout mice. *Epilepsy Res.* 48(1-2):43-56

**Burke K, Chandler CJ, Starr BS, Starr MS. 1990.** Seizure promotion and protection by D-1 and D-2 dopaminergic drugs in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav.* 36(4):729-33

**Byrnes KR, Wilson CM, Brabazon F, von Leden R, Jurgens JS, Oakes TR, Selwyn RG. 2014.** FDG-PET imaging in mild traumatic brain injury: a critical review. *Front Neuroenergetics.* 5:13. doi: 10.3389/fnene.2013.00013

## C

---

**Cao XH, Zhao SS, Liu DY, Wang Z, Niu LL, Hou LH, Wang CL. 2011.** ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in s-urfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chem Biol Interact.* 190(1):16-27

**Caplan R, Siddarth P, Stahl L, Lanphier E, Vona P, Gurbani S, Koh S, Sankar R, Shields WD. 2008.** *Childhood absence epilepsy: behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities.* *Epilepsia.* 49(11):1838-46.

**Casse R, Rowe CC, Newton M, Berlangieri SU, Scott AM. 2002.** *Positron emission tomography and epilepsy.* *Mol Imaging Biol.* 4(5):338-51

**Cavalheiro EA, Elisabetsky E, Campos CJ. 1981.** *Effect of brain serotonin level on induced hippocampal paroxysmal activity in rats.* *Pharmacol Biochem Behav.* 15(3):363-6

**Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. 1994.** *Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus.* *Epilepsia.* 35(1):1-11

**Cavazos JE, Das I, Sutula TP. 1994.** *Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures.* *J Neurosci.* 14(5 Pt 2):3106-21

**Chadha A, Howell O, Atack JR, Sur C, Duty S. 2000.** *Changes in [3H]zolpidem and [3H]Ro 15-1788 binding in rat globus pallidus and substantia nigra pars reticulata following a nigrostriatal tract lesion.* *Brain Res.* 862(1-2):280-3

**Choi HS, Park JH, Ahn JH, Hong S, Cho JH, Won MH, Lee CH. 2015.** *The anti-inflammatory activity of duloxetine, a serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor, prevents kainic acid-induced hippocampal neuronal death in mice.* *J Neurol Sci.* 358(1-2):390-7

**Choi J.Y, Kim S.J, Hong S.B, Seo D.W, Hong S.C, Kim B.T, Kim S.E, 2003.** *Extratemporal hypometabolism on FDG PET in temporal lobe epilepsy as a predictor of seizure outcome after temporal lobectomy.* *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging,* 30, 581-587

**Claassen J, Hirsch LJ, Emerson RG, Mayer SA. 2002.** *Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam: a systematic review.* *Epilepsia.* 43(2):146-53

**Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. 1987.** *The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures.* *Neuroscience.* 23(3):953-68

**Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. 1987.** *The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures.* *Neuroscience.* 23(3):953-68

**Covanis A, Skiadas K, Loli N, Lada C, Theodorou V. 1992.** *Absence epilepsy: early prognostic signs.* *Seizure.* 1992 1(4):281-9

**Covolán L, Mello LE. 2000.** *Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus.* *Epilepsy Res.* 39(2):133-52

**Covolan L, Smith RL, Mello LE. 2000.** *Ultrastructural identification of dentate granule cell death from pilocarpine-induced seizures.* *Epilepsy Res.* 41(1):9-21

**Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K. 2009.** *Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain.* *Neuroscience.* 29;163(1):490-9

**Crépel V, Mulle C. 2015.** *Physiopathology of kainate receptors in epilepsy.* *Curr Opin Pharmacol.* 20:83-8

## **D**

---

**Dailey JW, Yan QS, Mishra PK, Burger RL, Jobe PC. 1992.** *Effects of fluoxetine on convulsions and on brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats.* *J Pharmacol Exp Ther.* 260(2):533-40

**Daumas S, Halley H, Francés B, Lassalle JM. 2005.** *Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions.* *Learn Mem.* 12(4):375-82

**de Boer HM, Mula M, Sander JW. 2008.** *The global burden and stigma of epilepsy.* *Epilepsy Behav.* 12(4):540-6.

**De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. 2000.** *Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus.* *Eur J Neurosci.* 12(7):2623-33

**Deleye S, Verhaeghe J, wyffels L, Dedeurwaerdere S, Stroobants S, Staelens S. 2014.** *Towards a reproducible protocol for repetitive and semi-quantitative rat brain imaging with (18) F-FDG: exemplified in a memantine pharmacological challenge.* *Neuroimage.* 96:276-87

**Dhami KS, Churchward MA, Baker GB, Todd KG. 2013.** *Fluoxetine and citalopram decrease microglial release of glutamate and D-serine to promote cortical neuronal viability following ischemic insult.* *Mol Cell Neurosci.* 56:365-74

**Dhir A. 2012.** *Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy.* *Curr Protoc Neurosci* 1:1–12

**Diehl RG, Smialoski A, Gotwo T. 1984.** *Development and persistence of kindled seizures after repeated injections of pentylentetrazol in rats and guinea pigs.* *Epilepsia,* 25; 506-510

**Ding YS, Chen BB, Glielmi C, Friedman K, Devinsky O. 2014.** *A pilot study in epilepsy patients using simultaneous PET/MR.* *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 4(5):459-70

**do Nascimento AL, Dos Santos NF, Campos Pelágio F, Aparecida Teixeira S, de Moraes Ferrari EA, Langone F. 2012.** *Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus.* Brain Res. 1470:98-110

**Dudek F.E., Clark S, Williams P.A., Grabenstatter H.L., 2006.** *Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy. En Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

**Dudek FE, Staley KJ, Sutula TP. 2002.** *The search for animal models of epileptogenesis and pharmacoresistance: are there biologic barriers to simple validation strategies?* Epilepsia. 43(11):1275-7

**Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. 2006.** *Adult epilepsy.* Lancet. 367(9516):1087-100

**Duncan JS. 1991.** *Modern treatment strategies for patients with epilepsy: a review.* J R Soc Med. 84:159–62

## **E**

---

**Engel J Jr, 1996.** *Introduction to temporal lobe epilepsy.* Epilepsy Res. 26(1):141-50

**Engel J.Jr, 2001.** *Intractable epilepsy: definition and neurobiology.* Epilepsia, 42 (Suppl.6), 3

**Engel J.Jr, Wolfson L, Brown L, 1978.** *Anatomical correlates of electrical and behavioral events relate to amygdaloid kindling.* Annals of Neurology, 3, 538-544

## **F**

---

**Favale E, Audenino D, Cocito L, Albano C. 2003.** *The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis.* Seizure. 12(5):316-8

**Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr, 2005.** *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).* Epilepsia. 46(4):470-2

**Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D, Collingridge GL. 1996.** *Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices.* Neurosci Lett. 203(3):211-3. Erratum in: Neurosci Lett. 207(2):142

**Forsgren L, Hauser WA, Olafsson E, Sander JW, Sillanpää M, Tomson T. 2005.** *Mortality of epilepsy in developed countries: a review.* *Epilepsia.* 46 Suppl 11:18-27

**Fragoso-Veloz J, Massieu L, Alvarado R, Tapia R. 1990.** *Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine.* *Eur J Pharmacol.* 178(3):275-84

**Freitas RM, Sousa FC, Viana GS, Fonteles MM. 2006a.** *Effect of gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus.* *Neurosci Lett.* 408(2):79-83

**Freitas RM, Vasconcelos SM, Sousa FC, Viana GS, Fonteles MM. 2006b.** *Pharmacological studies of the opioids, mood stabilizer and dopaminergic drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus.* *Neurosci Lett.* 408(2):84-8

## G

---

**Gallyas F, Zoltay G, Horváth Z, Dávid K, Kelényi L. 1993.** *An immediate morphopathologic response of neurons to electroshock; a reliable model for producing "dark" neurons in experimental neuropathology.* *Neurobiology (Bp).* 1(2):133-46

**Galvan M, Grafe P, ten Bruggencate G. 1982.** *Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice.* *Brain Res.* 241(1):75-86

**García-García L, Delgado M, Al-Sayed AA, Bascuñana P, F. de la Rosa R, Bermejo-Bescós P, Martín-Aragón S, Pozo MA. 2014.** *In vivo 18F-FDG-PET imaging reveals that p-chloroamphetamine neurotoxicity is associated with long-term cortical and hippocampal hypometabolism.* *Mol Imaging Biol.* 17(2):239-47

**Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields, CB, Cai J. 2013.** *Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury.* *Mol. Neurobiol.* 48, 690–701

**Gharedaghi MH, Seyedabadi M, Ghia JE, Dehpour AR, Rahimian R. 2014.** *The role of different serotonin receptor subtypes in seizure susceptibility.* *Exp Brain Res.* 232(2):347-67. Review

**Gilbert ME, Goodman JH. 2006.** *Chemical kindling. En Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

**Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. 1969.** *A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.* *Exp Neurol.* 25(3):295-330

**Goddard GV. 1967.** *Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity.* Nature. 214(5092):1020-1

**Goffin K, Dedeurwaerdere S, Van Laere K, Van Paesschen W, 2008.** *Neuronuclear assessment of patients with epilepsy.* Semin Nucl Med, 38, 227-239

**Goffin K, Nissinen J, Van Laere K, Pitkänen A, 2007.** *Cyclicality of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat.* Experimental Neurology, 205, 501-505

**Goffin, K, Van Paesschen, W, Dupont, P, Van Laere, K, 2009.** *Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy.* Exp Neurol. 217, 205-9

**Gómez CD, Buijs RM, Sitges M. 2014.** *The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression in rat hippocampus.* J Neurochem. 130(6):770-9. doi: 10.1111/jnc.12784

**Grosso S, Galimberti D, Vezzosi P, Farnetani M, Di Bartolo RM, Bazzotti S, Morgese G, Balestri P. 2005.** *Childhood absence epilepsy: evolution and prognostic factors.* Epilepsia. 46(11):1796-801

**Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, Paraskevas S, Blaabjerg L, Størling J, Rosenberg L, Billestrup N, Maysinger D, Mandrup-Poulsen T. 2009.** *Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells.* Diabetes. 58(8):1807-15. doi: 10.2337/db08-0178

**Gulbins E, Palmada M, Reichel M, Lüth A, Böhmer C, Amato D, Müller CP, Tischbirek CH, Groemer TW, Tabatabai G, Becker KA, Tripal P, Staedtler S, Ackermann TF, van Brederode J, Alzheimer C, Weller M, Lang UE, Kleuser B, Grassmé H, Kornhuber J. 2013.** *Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs.* Nat Med. 19(7):934-8. doi: 10.1038/nm.3214

**Guo Y, Gao F, Wang S, Ding Y, Zhang H, Wang J, Ding M.P, 2009.** *In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study.* Neuroscience. 162, 972-9

## H

---

**Hamid H, Kanner AM. 2013.** *Should antidepressant drugs of the selective serotonin reuptake inhibitor family be tested as antiepileptic drugs?* Epilepsy Behav. 26(3):261-5.

**Haneef Z, Chen DK. 2014.** *Functional neuro-imaging as a pre-surgical tool in epilepsy.* Ann Indian Acad Neurol. 17(Suppl 1):S56-64. doi: 10.4103/0972-2327.128659

**Hayes KC. 2004.** *The use of 4-aminopyridine (fampridine) in demyelinating disorders.* CNS Drug Rev. 10(4):295-316.

**Hellmann-Regen J, Uhlemann R, Regen F, Heuser I, Otte C, Endres M, Gertz K, Kronenberg G. 2015.** *Direct inhibition of retinoic acid catabolism by fluoxetine.* J Neural Transm (Vienna). 122(9):1329-38

**Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP. 2000.** *Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy.* Neurology. 55(2):250-7

**Hernandez EJ, Williams PA, Dudek FE. 2002.** *Effects of fluoxetine and TFMPP on spontaneous seizures in rats with pilocarpine-induced epilepsy.* Epilepsia. 43(11):1337-45

**Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. 1983.** *Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.* Science. (4594):323-5

**Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. 1990.** *Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy.* J Neurosci. 10(1):267-82

**Houser CR. 1992.** *Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy.* Epilepsy Res Suppl. 7:223-34

**Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. 1994.** *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin).* Pharmacol Rev. 46(2):157-203

**Hrdina PD, Vu TB. 1993.** *Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain: an autoradiographic study.* Synapse. 14(4):324-31

**Hyttel J. 1983.** *SCH 23390 - the first selective dopamine D-1 antagonist.* Eur J Pharmacol. 91(1):153-4

**I**

---

**Igelström KM, Heyward PM. 2012.** *Inhibition of hippocampal excitability by citalopram.* Epilepsia. 53(11):2034-42

**Igelström KM, Heyward PM. 2012.** *The antidepressant drug fluoxetine inhibits persistent sodium currents and seizure-like events.* *Epilepsy Res.* 101(1-2):174-81

**Iorio LC, Barnett A, Leitz FH, Houser VP, Korduba CA. 1983.** *SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems.* *J Pharmacol Exp Ther.* 226(2):462-8

## **J**

---

**Jacobs KM, Hwang BJ, Prince DA. 1999.** *Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria.* *J Neurophysiol.* 81(1):159-73

**Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH, Noebels JL, Spencer DD, Swann JW. 2009.** *Curing epilepsy: progress and future directions.* *Epilepsy Behav.* 14(3):438-45

**Jacobs, MP, Fischbach, GD, Davis MR, Dichter MA, Dingledine R, Lowenstein, DH, Morrell MJ, Noebels JL, Rogawski MA, Spencer SS, Theodore WH, 2001.** *Future directions for epilepsy research* *Neurology* 57, 1536-1542

**Janson K, Cohen ED, Wilder EL. 2001.** *Expression of DWnt6, DWnt10, and DFz4 during Drosophila development.* *Mech Dev.* 103(1-2):117-20

**Jin Y, Lim CM, Kim SW, Park JY, Seo JS, Han PL, Yoon SH, Lee JK. 2009.** *Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus.* *Brain Res.* 1281:108-16

**Jobe PC, Browning RA, 2006.** *Mammalian models of genetic epilepsy characterized by sensory-evoked seizures and generalized seizure susceptibility* *In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

**Jobe PC, Browning RA. 2005.** *The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant.* *Epilepsy Behav.* 7(4):602-19

**Johnson DA, Ingram CD, Grant EJ, Craighead M, Gartside SE. 2009.** *Glucocorticoid receptor antagonism augments fluoxetine-induced downregulation of the 5-HT transporter.* *Neuropsychopharmacology.* 34(2):399-409

**Joje RS, Morrisett RA, Snead OC. 1986.** *Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats.* *Exp Neurol.* 91(3):471-80

**Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks R, O'Brien T. 2007a.** *Imaging small animal models of epileptogenesis.* *Neurol Asia* 12:51–54

**Jupp B, O'Brien TJ. 2007b.** *Application of coregistration for imaging of animal models of epilepsy.* *Epilepsia.* 48 Suppl 4:82-9

**Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks RJ, Cardamone L, Jones N, Rees S, O'Brien TJ. 2012.** *Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE.* *Epilepsia.* 53(7):1233-44

## K

---

**Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. 2014.** *Animal models of epilepsy: use and limitations.* *Neuropsychiatr Dis Treat.* 10:1693-705

**Keune PM, Cocks AJ, Young WR, Burschka JM, Hansen S, Hofstadt-van Oy U, Oschmann P, Muenssinger J. 2015.** *Dynamic walking features and improved walking performance in multiple sclerosis patients treated with fampridine (4-aminopyridine).* *BMC Neurol.* 15:171. doi: 10.1186/s12883-015-0431-0

**Kilts CD, Dew KL, Ely TD, Mailman RB. 1985.** *Quantification of R-(+)-7-chloro-8-hydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-methyl-3- benzazepine in brain and blood by use of reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* *J Chromatogr.* 342(2):452-7

**Knake S, Hamer HM, Rosenow F. 2009.** *Status epilepticus: a critical review.* *Epilepsy Behav.* 15(1):10-4

**Kong S, Cheng Z, Liu J, Wang Y. 2014.** *Downregulated GABA and BDNF-TrkB pathway in chronic cyclothiazide seizure model.* *Neural Plast.* 2014;2014:310146. doi: 10.1155/2014/310146

**Kornum BR, Licht CL, Weikop P, Knudsen GM, Aznar S. 2006.** *Central serotonin depletion affects rat brain areas differently: a qualitative and quantitative comparison between different treatment schemes.* *Neurosci Lett.* 392(1-2):129-34

**Kovács A, Mihály A, Komáromi A, Gyengési E, Sente M, Weiczner R, Krisztin-Péva B, Szabó G, Telegdy G. 2003.** *Seizure, neurotransmitter release, and gene expression are closely related in the striatum of 4-aminopyridine-treated rats.* *Epilepsy Res.* 55(1-2):117-29

**Kulkarni SK, George B. 1995.** *Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus.* *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 17(8):551-67. Review

**Kumar A, Chugani HT. 2013.** *Functional imaging: PET.* Handb Clin Neurol. 111:767-76

**Kupferberg H, 2001.** *Animal models used in the screening of antiepileptic drugs.* Epilepsia 42 (Suppl. 4), 7-12

## L

---

**Lamusuo S, Jutila L, Ylinen A, Kälviäinen R, Mervaala E, Haaparanta M, Jääskeläinen S, Partanen K, Vapalahti M, Rinne J. 2001.** *[18F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage.* Arch Neurol. 58(6):933-9

**Laschet J, Louvel J, Kurcewicz I, Gigout S, Trottier S, Devaux B, Turak B, Pumain R. 2008.** *Cellular mechanisms of the epilepsies: In vitro studies on human tissue.* Neurochirurgie. 54(3):141-7

**Lauzurica N, García-García L, Fuentes JA, Delgado M. 2013.** *Hypophagia and induction of serotonin transporter gene expression in raphe nuclei of male and female rats after short-term fluoxetine treatment.* J Physiol Biochem. 69(1):69-74

**Lazarova M, Roussinov K, Yanev S, Petkov V, Stach R, Kacz D. 1981.** *Effect of chronic para-chlorophenylalanine treatment on convulsive-seizure reactions.* Acta Biol Med Ger. 40(3):309-16

**Lee EM, Park GY, Im KC, Kim ST, Woo CW, Chung JH, Kim KS, Kim JS, Shon YM, Kim YI, Kang JK. 2012.** *Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy.* Epilepsia. 53(5):860-9

**Lee KS, Park YM, Lee SH. 2012.** *Serotonergic dysfunction in patients with bipolar disorder assessed by the loudness dependence of the auditory evoked potential.* Psychiatry Investig. 9(3):298-306

**Lévesque M, Salami P, Behr C, Avoli M. 2013.** *Temporal lobe epileptiform activity following systemic administration of 4-aminopyridine in rats.* Epilepsia. 54(4):596-604

**Levin, C.S, 2005.** *Primer on molecular imaging technology.* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 32 (Suppl. 2), S325-45

**Lewellen TK. 2010.** *The challenge of detector designs for PET.* AJR Am J Roentgenol. 195(2):301-9

**Liu J, Wang A, Li L, Huang Y, Xue P, Hao A. 2010.** *Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus.* Seizure. 19(3):165-72

**Löscher W, 1993.** *Basic aspects of epilepsy.* Current Opinion in Neurology and Neurosurgery, 6, 223-232

**Löscher W, 2002.** *Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.* Epilepsy Research, 50, 105-123

**Löscher W, Schmidt D. 1988.** *Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations.* Epilepsy Res. 2(3):145-81

**Löscher W. 2011.** *Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.* Seizure. 20(5):359-68

**Lowenstein DH, Simon RP, Sharp FR. 1990.** *The pattern of 72-kDa heat shock protein-like immunoreactivity in the rat brain following flurothyl-induced status epilepticus.* Brain Res. 531(1-2):173-82

**Luhmann H.J, 2006.** *The cortical freeze lesion model* In *Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

**Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. 1996.** *Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus.* Eur J Neurosci. 8(7):1488-500

## **M**

---

**Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. 2014.** *Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects.* Neurosci Biobehav Rev.38:173-92

**Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000.** *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus.* J Neurosci. 20(24):9104-10

**Malhotra J, Velpandian T, Gupta YK. 1997.** *A simple device for recording seizure activity in rats.* Methods Find Exp Clin Pharmacol. 19(1):47-51

**Mariani CL. 2013.** *Terminology and classification of seizures and epilepsy in veterinary patients.* Top Companion Anim Med. 28(2):34-41

**Martin ED, Pozo MA, 2006.** *Animal models for the development of new neuropharmacological therapeutics in the status epilepticus.* Current Neuropharmacology, 4, 33-40

**Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. 1996.** *The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy.* Epilepsy Res. 26(1):151-61

**Matricardi S, Verrotti A, Chiarelli F, Cerminara C, Curatolo P. 2014.** *Current advances in childhood absence epilepsy.* Pediatr Neurol. 50(3):205-12

**McCorvy JD, Roth BL. 2015.** *Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors.* Pharmacol Ther. 150:129-42

**McKernan RM, Whiting PJ. 1996.** *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?* Trends Neurosci. (4):139-43

**Medina-Ceja L, Flores-Ponce X, Santerre A, Morales-Villagrán A, 2015.** *Analysis of connexin expression during seizures induced by 4-aminopyridine in the rat hippocampus.* J Biomed Sci; 22:69. doi: 10.1186/s12929-015-0176-5

**Medina-Ceja L, Morales-Villagrán A, Tapia R, 2000.** *Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats.* Brain Res Bull; 53(3):255-62

**Meldrum BS, 1994.** *The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders.* Neurology. 44(11 Suppl 8):S14-23

**Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG, 1999.** *Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy.* Epilepsy Res. 36(2-3):189-204

**Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. 1993.** *Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting.* Epilepsia. (6):985-95

**Mello LE, Covolan L. 1996.** *Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures.* Epilepsy Res. 26(1):123-9

**Merritt HH, Putnam TJ. 1984.** *Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders.* JAMA. 251(8):1062-7

**Mihály A, Szakács R, Bohata C, Dobó E, Krisztin-Péva B. 2001.** *Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures.* Epilepsy Res. 44(2-3):97-108

**Morales-Villagrán A, Tapia R. 1996.** *Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo.* Neurochem Int. 28(1):35-40

**Morimoto, K, Fahnestock, M, Racine, R.J, 2004.** *Kindling and status epilepticus models of epilepsy.* Progress in Neurobiology, 73, 1-60

**Moses WW. 2011.** *Fundamental Limits of Spatial Resolution in PET.* Nucl Instrum Methods Phys Res A. 648 Supplement 1:S236-S240

**Müller L, Müller S, Sellmann T, Groeneweg L, Tokay T, Köhling R, Kirschstein T. 2014.** *Effects of oxygen insufflation during pilocarpine-induced status epilepticus on mortality, tissue damage and seizures.* Epilepsy Res. 108(1):90-7.

## N

---

**Narkilahti S, Nissinen J, Pitkänen A. 2003.** *Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis.* Neuropharmacology. 44(8):1068-88

**Nelissen N, Van Paesschen W, Baete K, Van Laere K, Palmi A, Van Billoen H, Dupont P. 2006.** *Correlations of interictal FDG-PET metabolism and ictal SPECT perfusion changes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.* Neuroimage. 32(2):684-95

**Netzahualcoyotzi C, Tapia R. 2014.** *Energy substrates protect hippocampus against endogenous glutamate-mediated neurodegeneration in awake rats.* Neurochem Res. 39(7):1346-54. doi: 10.1007/s11064-014-1318-y

**Niquet, J, Auvin, S, Archie, M, Seo, DW, Allen, S, Sankar, R, Wasterlain, CG, 2007.** *Status epilepticus triggers caspase-3 activation and necrosis in the immature rat brain.* Epilepsia 48, 1203–1206

## O

---

**O'Sullivan GJ, Dunleavy M, Hakansson K, Clementi M, Kinsella A, Croke DT, Drago J, Fienberg AA, Greengard P, Sibley DR, Fisone G, Henshall DC, Waddington JL. 2008.** *Dopamine D1 vs D5 receptor-dependent induction of seizures in relation to DARPP-32, ERK1/2 and GluR1-AMPA signalling.* Neuropharmacology. 54(7):1051-61

**O'Brien T.J, Miles K, Ware R, Cook M.J, Binns D.S, Hicks R.J, 2008.** *The cost-effective use of 18F-FDG PET in the presurgical evaluation of medically refractory focal epilepsy.* Journal of Nuclear Medicine, 49, 931-937

**Ohira, K, Takeuchi, R, Shoji, H, Miyakawa, T. 2013.** *Fluoxetine-induced cortical adult neurogenesis.* Neuropsychopharmacology 38, 909–920

## P

---

**Pasini A, Tortorella A, Gale K. 1996.** *The anticonvulsant action of fluoxetine in substantia nigra is dependent upon endogenous serotonin.* Brain Res. 724(1):84-8

**Pavone P, Bianchini R, Trifiletti RR, Incorpora G, Pavone A, Parano E. 2001.** *Neuropsychological assessment in children with absence epilepsy.* Neurology. 56(8):1047-51

**Peña F, Tapia R. 1999.** *Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study.* J Neurochem. 72(5):2006-14

**Peña F, Tapia R. 2000.** *Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels.* Neuroscience. 101(3):547-61

**Pineda E, Shin D, Sankar R, Mazarati AM. 2010.** *Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms.* Epilepsia. 51 Suppl 3:110-4

**Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. 2012.** *The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission.* Nat Rev Neurosci. 13:22-37

**Prieto E, Collantes M, Delgado M, Juri C, García-García L, Molinet F, Fernández-Valle ME, Pozo MA, Gago B, Martí-Climent JM, Obeso JA, Peñuelas I. 2011.** *Statistical parametric maps of <sup>18</sup>F-FDG PET and 3-D autoradiography in the rat brain: a cross-validation study.* Eur J Nucl Med Mol Imaging. 38(12):2228-37

**Proper EA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Gispen WH, de Graan PN. 2001.** *A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting.* Acta Neuropathol. 101(4):405-9

## R

---

**Racine R, Coscina DV. 1979.** *Effects of midbrain raphe lesions or systemic p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats.* Brain Res Bull. 4(1):1-7

**Racine R.J, 1972a.** *Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. afterdischarge threshold.* Electroencephalography and clinical neurophysiology, 32, 269-279

**Racine R.J, 1972b.** *Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure.* Electroencephalography and clinical neurophysiology, 32, 281-294

**Racine R.J, Burnham W.M, Gartner, J.G, Levitan D, 1973.** *Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: strain and inter-stimulation interval effects.* Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 35, 553-556

**Racine R.J. 1975.** *Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas.* Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 38(1):1-12

**Radziuk AL, Kieling RR, Santos K, Rotert R, Bastos F, Palmini AL. 2015.** *Methylphenidate improves the quality of life of children and adolescents with ADHD and difficult-to-treat epilepsies.* Epilepsy Behav. 46:215-20

**Ramos AJ, Tagliaferro P, López EM, Pecci Saavedra J, Brusco A. 2000.** *Neuroglial interactions in a model of para-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion.* Brain Res. 883(1):1-14

**Ransom, C.B, Blumenfeld H, 2007.** *Acquired epilepsy: cellular and molecular mechanisms.* En *Molecular Neurology.* Stephen G. Waxman, Elsevier, Amsterdam

**Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM. 2011.** *Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition.* Science. 333(6042):637-42

**Reddy DS, Kuruba R. 2013.** *Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions.* Int J Mol Sci. 14(9):18284-318

**Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. 2000.** *Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry.* J Comp Neurol. 428(2):240-53

**Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997.** *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function.* Trends Neurosci. 20(12):570-7

**Rossi AR, Angelo MF, Villarreal A, Lukin J, Ramos AJ. 2013.** *Gabapentin administration reduces reactive gliosis and neurodegeneration after pilocarpine-induced status epilepticus.* PLoS One. 8(11):e78516. doi: 10.1371/journal.pone.0078516

**Rudroff T, Kindred JH, Kalliokoski KK. 2015.** *[18F]-FDG positron emission tomography--an established clinical tool opening a new window into exercise physiology.* J Appl Physiol (1985). 118(10):1181-90

**Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D. 1985.** *Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus.* J Neurophysiol. 54(5):1363-74

**Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D. 1987.** *4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition.* J Neurophysiol. 57(6):1911-24

## S

---

**Saadat KS, O'shea E, Colado MI, Elliott JM, Green AR. 2005.** *The role of 5-HT in the impairment of thermoregulation observed in rats administered MDMA ('ecstasy') when housed at high ambient temperature.* Psychopharmacology (Berl). 179(4):884-90

**Sander JW. 2003.** *The epidemiology of epilepsy revisited.* Curr Opin Neurol. 16(2):165-70

**Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL. 2006.** *Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant.* J Neurosci Methods 155:272-284

**Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. 2005.** *Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons.* Brain Res. 1035(1):24-31

**Schultz W. 2007.** *Multiple dopamine functions at different time courses.* Annu Rev Neurosci. 30:259-88

**Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM. 2012.** *Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia.* Front Pharmacol. 26;3:195

**Serikawa T, Mashimo T, Kuramoro T, Voigt B, Ohno Y, Sasa M. 2014.** *Advances on genetic rat models of epilepsy.* Exp Anim. 64(1):1-7.

**Shiozaki EN, Chai J, Shi Y. 2002.** *Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD.* Proc Natl Acad Sci U S A. 99(7):4197-202

**Shorvon SD. 2011.** *The etiologic classification of epilepsy.* Epilepsia. 52(6):1052-7

**Simmons RM, Li DL, Hoo KH, Deverill M, Ornstein PL, Iyengar S. 1998.** *Kainate GluR5 receptor subtype mediates the nociceptive response to formalin in the rat.* Neuropharmacology. 37(1):25-36

**Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. 2002.** *Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractoryepilepsy.* Brain. 125(Pt 1):22-31

**Sitges M, Gómez CD, Aldana BI. 2014.** *Sertraline reduces IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression and overcomes their rise induced by seizures in the rat hippocampus.* PLoS One. 9(11):e111665. doi: 10.1371/journal.pone.0111665

**Sitges, M, Aldana, B.I, Gómez, C.D, Nekrassov, V. 2012.** *The antidepressant sertraline prevents the behavioral and EEG changes induced in two animal models of seizures.* Epilepsy Behav. 25, 511–516

**Slézia A, Kékesi AK, Szikra T, Papp AM, Nagy K, Szente M, Maglóczy Z, Freund TF, Juhász G. 2004.** *Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy.* Neurobiol Dis. 2004 Aug;16(3):490-9

**Sofroniew MV, Vinters HV. 2009.** *Astrocytes: biology and pathology.* Acta Neuropathol. 119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8

**Sperk G, Furtinger S, Schwarzer C, Pirker S. 2004.** *GABA and its receptors in epilepsy.* Adv Exp Med Biol. 548:92-103

**Stables JP, Bertram EH, White HS, Coulter DA, Dichter MA, Jacobs MP, Loscher W, Lowenstein DH, Moshe SL, Noebels JL, Davis M, 2002.** *Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland.* Epilepsia, 43, 1410-1420

**Stach R, Lazarova MB, Kacz D. 1981.** *Serotonergic mechanism in seizures kindled from the rabbit amygdala.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 316(1):56-8

**Stankovski L, Alvarez C, Ouimet T, Vitalis T, El-Hachimi KH, Price D, Deneris E, Gaspar P, Cases O. 2007.** *Developmental cell death is enhanced in the cerebral cortex of mice lacking the brain vesicular monoamine transporter.* J Neurosci. 27(6):1315-24

**Starr MS. 1996.** *The role of dopamine in epilepsy.* Synapse. 22(2):159-94. Review

**Stewart B, Rose S, Jenner P, Marsden CD. 1987.** *Pilocarpine-induced purposeless chewing behaviour in rats is dependent on intact central stores of 5-HT.* Eur J Pharmacol. 142(1):173-6

**Strupp M, Zwergal A, Feil K, Bremova T, Brandt T. 2015.** *Pharmacotherapy of vestibular and cerebellar disorders and downbeat nystagmus: translational and back-translational research.* Ann N Y Acad Sci 1343:27-36.

**Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. 1989.** *Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe.* Ann Neurol. 26(3):321-30

**Sutula T.P, Ockuly J. 2006.** *Kindling, spontaneous seizures, and consequences of epilepsy: more than a model.* En *Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

## T

---

**Tagashira E, Hiramori T, Nakao K, Urano T, Yanaura S. 1983.** *Effects of central monoamine compounds on tranylcypromine-induced barbital-withdrawal convulsions.* Life Sci. 32(14):1599-606

**Takács E, Nyilas R, Szepesi Z, Baracska P, Karlsen B, Røsvold T, Bjørkum AA, Czurkó A, Kovács Z, Kékesi AK, Juhász G. 2010.** *Matrix metalloproteinase-9 activity increased by two different types of epileptic seizures that do not induce neuronal death: a possible role in homeostatic synaptic plasticity.* Neurochem Int. 56(6-7):799-809

**Theodore W.H, Fisher R.S, 2004.** *Brain stimulation for epilepsy.* Lancet Neurology, 3, 111-8

**Theodore WH. 2003.** *Does Serotonin Play a Role in Epilepsy?* Epilepsy Curr. 3(5):173-177

**Thomas B, Mohanakumar KP. 2004.** *Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum.* J Pineal Res. 36(1):25-32

**Toyama H, Ichise M, Liow JS, Vines DC, Seneca NM, Modell KJ, Seidel J, Green MV, Innis RB. 2004.** *Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animalPET.* Nucl Med Biol. 31(2):251-6

**Treiman DM, 2001.** *GABAergic mechanisms in epilepsy.* Epilepsia. 42 Suppl 3:8-12.

**Trindade-Filho EM, de Castro-Neto EF, de A Carvalho R, Lima E, Scorza FA, Amado D, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Cavalheiro EA. 2008.** *Serotonin depletion effects on the pilocarpine model of epilepsy.* Epilepsy Res. 82(2-3):194-9

**Trinka E, Höfler J, Leitinger M, Brigo F. 2015.** *Pharmacotherapy for Status Epilepticus.* Drugs. 75(13):1499-521

**Tripathi PP, Bozzi Y. 2015.** *The role of dopaminergic and serotonergic systems in neurodevelopmental disorders: a focus on epilepsy and seizure susceptibility.* Bioimpacts. 2015;5(2):97-102

**Turkington TG, Coleman RE. 2002.** *Clinical oncologic positron emission tomography: an introduction.* Semin Roentgenol. 37(2):102-9

**Turkington TG. 2001.** *Introduction to PET instrumentation.* J Nucl Med Technol. 29(1):4-11. Erratum en: J Nucl Med Technol 2002 30(2):63

**Turski L, Cavalheiro EA, Sieklucka-Dziuba M, Ikonomidou-Turski C, Czuczwar SJ, Turski WA. 1986.** *Seizures produced by pilocarpine:*

*neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. Brain Res. 398(1):37-48*

**Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. 1989.** *Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. Synapse. 3(2):154-71*

**Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. 1984.** *Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. Brain Res. 321(2):237-53*

**Turski WA, Cavalheiro EA, Coimbra C, da Penha Berzaghi M, Ikonomidou-Turski C, Turski L. 1987.** *Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. Brain Res. 434(3):281-305*

**Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. 1983.** *Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res. 9(3):315-35*

**Tzeng, TT, Tsay, HJ, Chang, L, Hsu, CL, Lai, TH, Huang, FL, Shiao, YJ, 2013.** *Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. J. Biomed. Sci. 20, 90*

## V

---

**Verdoorn TA, Johansen TH, Drejer J, Nielsen EO. 1994.** *Selective block of recombinant glur6 receptors by NS-102, a novel non-NMDA receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 269(1):43-9*

**Verel I, Visser GW, van Dongen GA. 2005.** *The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. J Nucl Med. 46 Suppl 1:164S-71S*

**Virdee K, Cumming P, Caprioli D, Jupp B, Rominger A, Aigbirhio FI, Fryer TD, Riss PJ, Dalley JW. 2012.** *Applications of positron emission tomography in animal models of neurological and neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev. 36(4):1188-216*

**Vizi ES, Kisfali M, Lőrincz T. 2013.** *Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. Brain Res Bull. 93:32-8*

**Vizi S, Bagosi A, Krisztin-Péva B, Gulya K, Mihály A. 2004.** *Repeated 4-aminopyridine seizures reduce parvalbumin content in the medial mammillary nucleus of the rat brain. Brain Res Mol Brain Res. 131(1-2):110-8*

## W

---

**Wada Y, Shiraishi J, Nakamura M, Hasegawa H. 1995.** *Prolonged but not acute fluoxetine administration produces its inhibitory effect on hippocampal seizures in rats.* Psychopharmacology (Berl). 118(3):305-9

**Wang S, Wang S, Shan P, Song Z, Dai T, Wang R, Chi Z. 2008.** *Mu-calpain mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus.* Brain Res Bull. 76(1-2):90-6

**Wang XQ, Xiao AY, Yang A, LaRose L, Wei L, Yu SP. 2003.** *Block of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and induction of hybrid death by 4-aminopyridine in cultured cortical neurons.* J Pharmacol Exp Ther. 305(2):502-6

**Wang, L, Liu, Y.H, Huang, Y.G, Chen, L.W, 2008.** *Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining.* Brain Res. 1241, 157–167

**Wei D, Yang F, Wang Y, Yang F, Wu C, Wu SX, Jiang W. 2015.** *Degeneration and regeneration of GABAergic interneurons in the dentate gyrus of adult mice in experimental models of epilepsy.* CNS Neurosci Ther. 21(1):52-60

**Weinshenker D, Szot P. 2002.** *The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice.* Pharmacol Ther. 94(3):213-33

**Werner FM, Coveñas R. 2015.** *Review: Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect?* Epilepsy Behav. pii: S1525-5050(15)00045-1. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.01.038

**White HS.1999.** *Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs.* Epilepsia. 40 Suppl 5:S2-10

**White HS. 2003.** *Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions.* Epilepsia. 44 Suppl 7:2-8

**Wieser HG. 2004.** *ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy.* Epilepsia. 45(6):695-714.

**Wong CH, Bleasel A, Wen L, Eberl S, Byth K, Fulham M, Somerville E, Mohamed A. 2010.** *The topography and significance of extratemporal hypometabolism in refractory mesial temporal lobe epilepsy examined by FDG-PET.* Epilepsia. 51(8):1365-73

## Y

---

**Yu W, Smith AB, Pilitsis J, Shin DS. 2014.** *Isovaline attenuates epileptiform activity and seizure behavior in 4-aminopyridine treated rats.* *Epilepsy Res.* 108(2):331-5

## Z

---

**Zhang L, Guo Y, Hu H, Wang J, Liu Z, Gao F. 2015.** *FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.* *Int J Med Sci.* 12(3):288-94.

**Zhang XM, Jin T, Quezada HC, Mix E, Winblad B, Zhu J. 2010.** *Kainic acid-induced microglial activation is attenuated in aged interleukin-18 deficient mice.* *J Neuroinflammation.* 7:26. doi: 10.1186/1742-2094-7-26

**Zimmer L, Rbah L, Giacomelli F, Le Bars D, Renaud B, 2003.** *A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT<sub>1A</sub> PET ligand 18F-MPPF binding in the rat hippocampus.* *The Journal of Nuclear Medicine,* 44, 1495-1501



## ***9 SUMMARY***

---



***PET STUDIES ON THE  
PHARMACOLOGICAL MODULATION OF  
EXPERIMENTAL MODELS OF SEIZURES***



## Introduction

Epilepsy is conceptually defined as a brain disorder characterized by an enduring predisposition to generate epileptic seizures (Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2014). An abnormal increase in the neuronal excitability that frequently spreads to nearby areas is under the triggering of the different types of seizures (Reddy and Kuruba, 2013), resulting in alteration in the normal behavior. Epilepsy is one of the most common neurologic disorders, affecting almost 1%-2% of the population. It is estimated that around 50 million of people worldwide suffer from epilepsy (Sander, 2003). Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of partial epilepsy in adults, and it usually presents a high ratio of pharmacoresistance.

The temporal lobe epilepsy (TLE) model by administration of pilocarpine (or its variant by previous administration of lithium) is one of the most employed animal models of epilepsy (Turski et al., 1983). It is characterized by a rapid status epilepticus (SE) followed by a latent period in which generalized brain hypometabolism (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009; Lee et al., 2012) and neuronal damage (primarily in hippocampus) appear (Mello et al. 1993; Wang et al. 2008; Rossi et al. 2013). Brain hypometabolism has been described to appear shortly after the SE onset, returning the metabolic activity to baseline values in the subacute period (Lee et al., 2012).

Although classically, seizures have been attributed to the dysregulation of GABA and glutamate homeostasis, serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) has been also involved in epileptogenesis. In this sense, the implication in epilepsy of this neurotransmitter was originally reported more than 50 years ago (Bonnycastle et al., 1957). Although the mechanisms ruling this function are still unclear, the

presence of the different subtypes of 5-HT receptors controlling both excitatory and inhibitory synapses has been extensively described (Bagdy et al., 2007), playing a crucial role in the modulation of neuronal excitability. In line with this not clearly defined role, 5-HT and antidepressant drugs have been contradictorily associated both to proconvulsant and anticonvulsant effects (Jobe and Browning, 2005). Regarding the effects of 5-HT depletion on epilepsy behavior, inconsistent findings have been reported so far (Racine and Coscina 1979; Tagashira et al., 1983; Bercovici et al., 2006).

The role of dopamine (DA) in seizure susceptibility has been quite difficult to determine, comprehensive review on the role of DA in epilepsy compiled the data concerning the modulation of seizure susceptibility by dopaminergic agonists and antagonists (Starr, 1996). Even though dopaminergic neurons do not show increased activity following a seizure, there is other evidence to indicate that the dopaminergic neurons are modified by epileptic activity (Weinshenker y Szot, 2002). Administration of the D1 DA antagonists alone has an anticonvulsant effect against pilocarpine-induced seizures (Barone et al., 1992).

4-aminopyridine (4-AP) is indicated in multiple sclerosis patients with walking impairment (Hayes, 2004; Keune et al., 2015). Nevertheless, 4-AP is mainly used as a convulsant drug in seizure research. 4-AP is a depolarizing agent that acts by blocking the voltage-dependent potassium channels (Hayes, 2004). Although 4-AP has a nonspecific action, it has been reported to increase the release of excitatory amino acids, mainly glutamate, in brain areas including hippocampus, entorhinal cortex and striatum. As a result, the enhancement of the excitatory neurotransmission is thought to underlie the seizures induced by 4-AP (Morales-Villagrán and Tapia, 1996; Medina-Ceja et al., 2000; Mihály et al., 2001).

## **Objectives**

This study was aimed to elucidate the effects of a subacute treatment with fluoxetine, a well-known selective 5-HT reuptake inhibitor (SSRI), also the effects of the tryptophan hydroxylase inhibitor p-chlorophenylalanine (PCPA), a specific depletor of brain 5-HT, on the acute metabolic and histochemical alterations triggered by the lithium-pilocarpine SE model in rats.

Another one was to make a small evaluation of the D1 dopamine receptor antagonist SCH23390 in the pilocarpine SE model.

Our last objective was to investigate the effects induced by a single dose of 4-AP administered peripherally, on the regional brain metabolism and neuronal injury signs in the hippocampus, and to examine whether those eventual detrimental effects were modified by a subacute treatment with fluoxetine.

## **Results**

Animals underwent lithium-pilocarpine treatment showed an overall brain glucose hypometabolism when analysed 3 days after seizure induction. Thus, pilocarpine caused a significant reduction of the metabolism in all brain areas analysed compared to control group. Regarding the effects of the SSRI fluoxetine in the control group, when administered at a dose of 10 mg/kg/day for 7 days, it did not modify the brain glucose metabolism in any of the brain regions analysed both at day 3 and 30. On the other hand, it should be pointed out that fluoxetine administration did avoid the short-term hypometabolism (at day 3) induced by pilocarpine injection in all brain regions studied. Thus, animals injected with pilocarpine that were subacutely administered with fluoxetine showed [<sup>18</sup>F] FDG

SUV values similar to rats that were not injected with pilocarpine (i.e. control group). In other point, at the level of the hippocampus, subacute administration of fluoxetine diminished the number of neurodegenerating neurons, reactive gliosis and apoptosis. In the other hand, PCPA treatment in lithium-pilocarpine injected rats resulted in similar metabolic responses to those obtained in non-5-HT depleted rats that underwent to SE. That demonstrates that under our experimental conditions, 5-HT depletion has no effects on pilocarpine-induced hypometabolism and also on the neural signs of damage.

In our study on the effect of the SCH23390 in the pilocarpine SE model, the dose we choose 0.2 mg/kg didn't affect the short-term hypometabolism produced by lithium-pilocarpine, but was able to reduce the histochemical damage signs associated with this model.

In the last study preformed, administration of 3 mg/kg 4-AP was associated with a very low mortality rate. Three days after seizure, no change in brain metabolic activity was found. Thus, when the SUVs of the different regions were calculated, 4-AP did not statistically modify the short-term brain metabolism in any area analysed, also there were no signs of neurodegeneration in insulted rats. In order to evidence astrogliosis associated to an eventual brain damage induced by 4-AP, non-quantitative GFAP immunohistochemistry was performed. A noticeable GFAP labelling in the dentate gyrus and CA1 of the hippocampus in 4-AP injected rats was observed. Interestingly, subacute fluoxetine markedly reduced such reactive gliosis induced by 4-AP and also significantly reduced the number of caspase-9 immunolabeled cells in the hilar hippocampal area.

## Discussion

Subacute fluoxetine administration prevented the brain metabolic impairment and reduced damage signs induced by lithium-pilocarpine. As a prototypical SSRI drug, the neuroprotective effects of fluoxetine are thought to be mediated by increasing extracellular 5-HT (Malberg et al., 2000; Mahar et al 2014). We concluded that, in the early phase after SE induction by lithium-pilocarpine, 5-HT depletion does not deteriorate brain hypometabolism, neurodegeneration and gliosis. Accordingly, it is likely that fluoxetine does not exert its effects via 5-HT mediated actions in this phase of epileptogenesis.

This protective function that we observed in our study with SCH23390, at the level of neurodegeneration, reactive gliosis and apoptosis without affecting the hypometabolism or mortality associated with lithium-pilocarpine model, makes us think that the selected dose of SCH23390 is associated with these effects. It would have to assess whether a higher dose could have a greater protective role.

Our results show that seizures triggered by 4-AP was associated with signs of hippocampal damage, since moderate astrogliosis and induction of caspase-9 protein were found. Since no neuronal death or brain hypometabolism were found, this mild injury seems to be related to the moderate seizure intensity induced by 3 mg/kg of 4-AP. Regarding the effects of fluoxetine, it effectively increased the latency time to seizure and reduced the aforementioned two markers of neuronal damage. Since antiseizure (Sitges et al., 2012) and antiinflammatory (Sitges et al., 2014) effects against 4-AP have been described for sertraline, our findings further support it.

