ISBN: 978-607-00-2083-4

Alteraciones conductuales epileptiformes producidas por 4-Aminopiridina y su modulación por Muscimol durante los primeros quince días de edad posnatal en la rata

Mónica Elisa Ureña Guerrero, Carol Mayari Gutiérrez Reyes, Marco Saúl Partida Vázquez, Sefit Yared Rodríguez Delgadillo.

[1]Lab. de Neurobiología Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México, 45110.
Correos electrónicos: murena@cucba.udg.mx

Introducción

La función normal del sistema nervioso se basa en el equilibrio dinámico existente entre los diferentes sistemas de neurotransmisión, la pérdida de este equilibrio puede conducir a la generación de crisis epileptiformes, alteración neurológica que es más frecuente en la etapa neonatal y que puede volverse recurrente espontáneamente, hasta generar un síndrome epiléptico (www.ilae-epilepsy.org; Rubio-Donnadieu, 1997; Dias-Silva, 2002), el cual puede llegar a implicar diferentes regiones cerebrales y alteraciones en prácticamente, todos los sistemas de neurotransmisión. En este sentido, la disminución del umbral de excitación, condición que favorece la generación de crisis epilépticas, depende no solamente de un exceso de excitación, sino también de una deficiencia en la inhibición (Dichter, 1998).

Durante el desarrollo embrionario y en los primeros días posteriores al nacimiento, los dos neurotransmisores más abundantes del sistema nervioso central de mamíferos (SNCm), los aminoácidos ácido glutámico (Glu) y ácido gamma-aminobutírico (GABA) producen excitación neuronal (Ben-Ari, 2001 y 2006). Sin embargo, en la etapa adulta, el GABA tiene efectos inhibidores y controla el umbral de excitación neuronal (Rogawski y Losher, 2004). La transmutación del GABA excitador a inhibidor en etapas tempranas del desarrollo ha sido demostrada en varias especies de mamíferos (Ben-Ari, 2006). Sin embargo, se desconoce exactamente la edad en que sucede *in vivo*, pues la mayoría de las aproximaciones provienen de preparaciones *in vitro*, cuyos resultados varían al establecer la transmutación del GABA desde el día 7 hasta el día 15 posnatales para la rata (Khazipov et al., 2004; Khalilov et al., 2005).

Los efectos excitadores e inhibidores del GABA, que se presentan en el SNCm, son ambos, dependientes de la activación de su receptor $GABA_A$ y determinantes para la expresión de las crisis epileptiformes (Ben-Ari, 2002; Farrant y Nusser, 2005). Este receptor actúa como un canal iónico sensible a ligando que al activarse permite el flujo de cloro a través de su estructura, de acuerdo con el gradiente electroquímico del ión. En el periodo prenatal y neonatal, el potencial de equilibrio para cloro es negativo en relación al potencial de membrana en reposo, por lo que al activarse el receptor $GABA_A$, produce una despolarización de membrana suficiente para activar los canales de calcio sensibles

al voltaje (Holmes et al., 2002). El muscimol (MUS) es un agonista selectivo de este tipo de receptor; induce muerte neuronal al administrarse subcutáneamente a animales recién nacidos (Nuñez y McCarthy, 2004); tiene tanto efectos proconvulsivos como anticonvulsionantes, al administrarse respectivamente, en la sustancia negra *pars reticulata* anterior o posterior de ratas machos jóvenes (Xu et al., 1992); e inhibe la expresión de las crisis epileptiformes en animales adultos (Rogawski y Losher, 2004).

Por otro lado, la 4-Aminopiridina (4-AP) es un bloqueador de los canales de potasio dependientes de voltaje, específicamente de las corrientes transitoria, tipo A y de inactivación y rectificación lenta, tipo D. El bloqueo de la corriente de potasio tipo D, prolonga la duración del potencial de acción, promueve la entrada de calcio a la terminal nerviosa y estimula la liberación vesiculada de neurotransmisores (Etzion y Grossman, 2001). El efecto excitador de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie; y se relaciona directamente con la generación de crisis convulsivas *in vivo* o de actividad epileptiforme *in vitro* (Thesleff, 1980; Glover, 1982; Versteeg et al., 1995; Niittykoski et al., 2004).

Así, aunque se conocen ampliamente varios de los efectos del MUS y de la 4-AP, no se ha caracterizado para ninguno de los dos, sus efectos sobre la susceptibilidad convulsiva *in vivo*, durante los primeros quince días del desarrollo posnatal de la rata. El propósito general de este trabajo es caracterizar las crisis epileptiformes *in vivo* inducidas por un convulsionante de amplio espectro, como la 4-AP, así como su regulación por el agonista GABAérgico, Muscimol (MUS), durante los primeros quince días de edad de la rata. Los resultados permitirán conocer mejor las condiciones que determinan la propensión a generar crisis epileptiformes en esta etapa, así como la edad en que el GABA transmuta su función en la rata; y probablemente, influyan en el diseño de terapias profilácticas que impidan que las crisis epileptiformes neonatales evolucionen hasta un síndrome epiléptico de difícil control farmacológico.

Objetivo

Evaluar las modificaciones conductuales generadas por la administración subcutánea de 4-Aminopiridina y Muscimol a ratas durante los primeros quince días de edad postnatal.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación. Para este trabajo se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (Rattus norvergicus), las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz-oscuridad 12h:12h, temperatura ambiental 22±2°C y humedad relativa del 50±10%) con libre acceso al agua y al alimento durante todo el proceso experimental, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995, que establecen las condiciones de cuidado y de menor sufrimiento posible para animales de experimentación.

Una semana antes del alumbramiento, las hembras preñadas se confinaron a cajas individuales para su observación. El día del alumbramiento, considerado

como el día de edad posnatal (DEPN) cero, las camadas se ajustaron a ocho crías y se seleccionaron los machos para utilizarse durante los primeros quince días de EPN. Habitualmente, se manejaron animales de 2 a 4 camadas de manera simultánea.

Tratamientos y evaluación conductual. Animales de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 DEPN recibieron en una sola administración, por vía subcutánea uno de los siguientes tratamientos:

1. 4-AP: 0.5, 1, 2 o 4 mg/kg de peso corporal.
2. MUS: 0.25, 0.5, 1 o 2 mg/kg de peso corporal.
3. 4-AP + MUS: 1 mg de 4-AP/kg de peso corporal con 0.25, 0.5, 1 o 2 mg de MUS/kg de peso corporal.

Inmediatamente después de la administración de alguno de los tratamientos, las alteraciones conductuales fueron registradas durante al menos, 2 h de manera constante. Después de este tiempo, cada 30 min, solo se registraba si los animales presentaban o no alteraciones conductuales. En cada sesión, máximo 4 animales cada uno con diferente tratamiento, se evaluaron de manera simultánea por al menos, 2 observadores. En algunos casos, se recurrió a la videograbación de las alteraciones conductuales para verificar las descripciones hechas por los observadores. Después de al menos 4 h los animales se sacrificaron por dislocación cerebral y los cerebros se extrajeron para estudios posteriores.

Resultados

La administración subcutánea de 4-AP indujo en todos los animales alteraciones conductuales y electroencefalográficas cuya intensidad fue proporcional a la dosis utilizada. Aunque la intensidad de las alteraciones se elevó de acuerdo con la dosis y los patrones conductuales se modificaron con la edad de los animales, de manera general en todos los animales se estableció el *status epilepticus*, el cual prevaleció durante al menos 1 h. En las edades de 1 y 3 DEPN, la administración de 4-AP indujo como alteración de mayor severidad, convulsiones clónicas generalizadas (CCG) con desplazamiento del cuerpo y automatismos tónicos. A partir de los 5 DEPN, se presentaron además, convulsiones tónico-clónicas generalizadas (CTCG). La duración de las alteraciones conductuales disminuyó con la edad, fluctuando de 1-2 h con 0.5 mg y de 4-6 h con 4 mg de 4-AP. La administración de 4 mg de 4-AP/kg de peso corporal produjo en todos los animales alteraciones conductuales severas que culminaron en la muerte del animal. Interesantemente, en las dos primeras edades evaluadas cuando las alteraciones conductuales fueron menos severas la latencia fue menor, en cambio en todas las demás edades donde los animales presentaron CTCG, la latencia disminuyó conforme la edad de los animales aumentaba, hasta llegar a los 13 DEPN donde la latencia de aparición de este patrón conductual fue mayor que en las edades anteriores (Cuadro 1).

Por otro lado, la administración de MUS, en todas las dosis y edades evaluadas, produjo síntomas proconvulsivos representados por saltos, saltos con giro de barril, cabeceos, sacudidas, tremores, mioclonos de cara y clonos de extremidades. En 3 y 5 DEP, se presentaron además, convulsiones clónicas de las

extremidades delanteras de mediana intensidad en comparación con las inducidas por 4-AP. Las alteraciones conductuales inducidas por MUS se presentaron durante los primeros 30-45 minutos, pero los saltos permanecieron durante todo el tiempo de observación (2-6 h). La duración de los síntomas proconvulsivos inducidos por el MUS disminuyó con la edad.

Cuadro 1. Latencia de las alteraciones conductuales de mayor severidad inducidas por la administración subcutánea de 4-Aminopiridina (4-AP) a ratas macho durante los primeros quince días de edad posnatal (DEPN; n=4-6).

DEPN	DOSIS DE 4-AP (mg/kg de peso corporal)	LATENCIA CCG/CTCG (minutos)
1	0.5	18.7 ± 0.6
	1	14.7 ± 1.1
	2	12.1 ± 0.5
	4	8.6 ± 0.9
3	0.5	16.4 ± 1.2
	1	13.4 ± 0.8
	2	11.8 ± 1.3
	4	7.9 ± 1.1
5	0.5	31.4 ± 0.8
	1	19.7 ± 1.4
	2	9.8 ± 1.1
	4	7.9 ± 1.3
7	0.5	28.7 ± 1.1
	1	18.7 ± 1.2
	2	10.1 ± 0.8
	4	6.7 ± 0.9
9	0.5	22.9 ± 1.4
	1	16.5 ± 0.9
	2	9.75 ± 0.7
	4	5.8 ± 1.1
11	0.5	22.3 ± 0.5
	1	14.9 ± 1.3
	2	7.3 ± 0.9
	4	5.1 ± 0.6
13	0.5	26.1 ± 0.4
	1	17.2 ± 1.2
	2	8.9 ± 1.4
	4	6.2 ± 0.7
15	0.5	29.2 ± 0.8
	1	18.4 ± 1.1
	2	9.7 ± 1.4
	4	5.8 ± 0.7

Además, 1 mg de MUS/kg de peso corporal disminuyó la intensidad y duración de las crisis inducidas por 4-AP en todas las edades. Sin embargo, esta dosis de MUS indujo postración profunda, espasmos respiratorios y muerte en algunos de los animales, al administrarse sólo o en combinación con 4-AP (Cuadro 2). Del DEPN 1 al 7, las dosis de 0.5 y 0.25 mg de MUS/kg de peso corporal precipitaron las crisis convulsivas inducidas por 4-AP más rápido, pero disminuyeron su duración (2 h). Después del DEPN 9, todas las dosis de MUS disminuyeron la intensidad y duración de las crisis inducidas por 4-AP.

Cuadro 2. Incidencia de muerte después de la administración subcutánea de 4-Aminopiridina (4-AP) y/o Muscimol (MUS) a ratas macho durante los primeros quince días de edad posnatal (DEPN; n=4-6). Dentro del paréntesis se específica la dosis del tratamiento en mg/kg de peso corporal.

DEPN	TRATAMIENTO	MUERTE
1	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 0% 0%
3	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 0% 50% (1 mg + 1 mg)
5	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 50% (1 mg) 50% (1 mg + 1mg)
7	4- AP MUS 4-AP + MUS	25% 50% (1 mg) 50% (1 mg + 1 mg) y 33% (1 mg + 0.5 mg)
9	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 50% (1 mg) 50% (1 mg + 1 mg)
11	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 100% (1 mg) 66% (1 mg + 1 mg)
13	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 66% (1 mg) 66% (1 mg + 1 mg)
15	4- AP MUS 4-AP + MUS	0% 0% 0%

Conclusiones y Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman las observaciones realizadas por otros autores en el sentido de que el establecimiento de la barrera hematoencefálica en la rata sucede después de los 12 DEPN, ya que la latencia para las crisis epileptiformes inducidas por 4-AP se incrementó considerablemente a partir del DEPN 13, en tanto que la incidencia de muerte asociada a la

administración de MUS se disminuyó también a partir de esa edad. Al mismo tiempo, se confirman las observaciones de que el patrón de crisis tónico-clónicas generalizadas aparece alrededor de la primera semana de vida posnatal de la rata, probablemente como parte de los procesos de maduración de los circuitos neuronales responsables del mismo (Mares y Velisek, 1992; Stafstrom y Sasaki-Adams, 2003).

Además, observamos que la activación del receptor $GABA_A$ por MUS, puede tener efectos proconvulsivos al administrarse sólo, pero cuando se administra en conjunto con el convulsionante 4-AP, presenta tanto efectos proconvulsivos como anticonvulsivos. Este fenómeno puede deberse a la farmacodinamia del MUS, que difunde gradualmente hacia las diferentes regiones cerebrales, desencadenando diferentes estados funcionales del receptor $GABA_A$ en las mismas (Xu et al., 1992; Mares y Velisek**,** 1992), durante la evaluación conductual

Por otro lado, los resultados sugieren la posibilidad de que la trasmutación del GABA de excitador a inhibidor se establezca gradualmente, iniciando probablemente alrededor del DEPN 5 y terminando alrededor del DEPN 9. Sin embargo, las evaluaciones conductuales no son suficientes para dar por hecho está afirmación, por lo que en este momento se realizan evaluaciones electrográficas y próximamente de tipo neuroquímico, que nos posiblemente nos permitirán caracterizar mejor dicho proceso.

Agradecimientos

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) establecido por la Secretaría de Educación Publica, que a través de su Programa de Apoyo a Exbecarios otorgó el apoyo PROMEP-EXB-UDG-515 a Mónica Ureña.

Bibliografía

Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosci* 24:353-360. 15.

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nature. *Nat Rev Neurosci* 3(9):728-739.

Ben-Ari Y (2006) Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord* 8:91-102.

Dias-Silva J (2002) Guía de manejo de la epilepsia. *Guías Clínicas* 2(6) www.fisterra.com/guias2/epilepsia.htm.

Dichter MA (1998) The Neurobiology of Epilepsy. En: *Epilepsy* (Engel J, Pedley TA, eds.), Lippincott Williams & Wilkins, New York, p.p. 4943-4949.

Etzion Y, Grossman Y (2001) Highly 4-aminopyridine sensitive delayed rectifier current modulates the excitability of guinea pig cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res* 139:419-25

Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nat Rev Neurosci* 6(3):215-229.

Glover WE (1982) The aminopyridines. Gen Pharmacol 13:259:285.

Holmes GL, Khazipov R, Ben-Ari Y (2002) New concepts in neonatal seizures. *Neuroreport* 13:3-8.

Khalilov I, Le Van Quyen M, Gozlan H, Ben-Ari Y (2005) Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. *Neuron* 48:787-96.

Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19:590-600.

Mares P, Velisek L (1992) N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced seizures in developing rats. *Devl Brain Res* 65:185-189.

Niittykoski M, Nissinen J, Petonnen M, Pitkanen A (2004) Electrophysiologic changes in the lateral and basal amygdaloid nuclei in temporal lobe epilepsy: an in vitro study in epileptic rats. *Neuroscience* 124:269-281.

Nuñez JL, McCarthy MM (2004) Cell death in the rat hippocampus in a model of prenatal brain injury: time course and expression of death-related proteins. *Neuroscience* 129:393-402.

Rogawski MA, Losher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 10:685-692.

Romo-Parra H, Treviño M, Heinemann U, Gutiérrez R (2008) GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *J Neurophysiol* 99(3):1523-34.

Rubio-Donnadieu F (1997) Aspectos generales y clasificación de la epilepsia. En: *Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales* (Feria-Velasco F, Martínez-De Muñoz D, Rubio-Donnadieu F, eds.). Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía-Departamento de Publicaciones Científicas, México, p.p.1-24.

Stafstrom CE, Sasaki-Adams DM (2003) NMDA-induce seizures in developing rats cause long term learning impairment and increased seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 53:129-137.

Thesleff S (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5:1413-1419.

Versteeg DH, Heemskerk FM, Spierenburg HA, de Graan PN, Schrama LH (1995) 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro. *Brain Res* 686:233-238.

Xu SG, Garant DS, Sperber EF, Moshé SL (1992). The proconvulsant effect of nigral infusions of THIP on flurothyl-induced seizures in rat pups. *Devl Brain Res* 68(2):275-77.