



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, EPILEPSIA
Y FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

CARLOS DANIEL GÓMEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA SITGES BERRONDO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DR. RUDOLF MARINUS BUIJS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

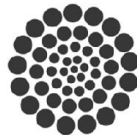
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente Tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. María Sitges Berrondo
en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de
Investigaciones Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México



Carlos Daniel Gómez Martínez recibió una beca de Posgrado (No.46554)
otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)



CONACyT

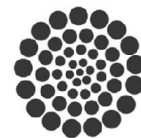
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este proyecto contó con financiamiento de PSICOFARMA S.A. de C.V.,
DGAPA-PAPIIT (UNAM) y CONACyT.



dgapa

**Dirección General de Asuntos
del Personal Académico**



CONACyT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. María Sitges Berrondo por ser un científico ejemplar, por brindarme su confianza, sus conocimientos y por cada uno de sus acertados consejos. Además, por permitirme soñar y crecer con su imaginación y pasión por la ciencia. Te admiro María.

A mi comité tutor: Dr. Rudolf Marinus Buijs y Dr. Federico Bermúdez Rattoni por sus excelentes críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A los miembros del jurado: Dra. Carolina Escobar Briones, Dra. Agnés Odile Marie Fleury, Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dr. Lenin Pavón Romero por su valioso tiempo, disposición y ayuda al leer esta tesis, y por sus observaciones, sugerencias y correcciones.

A las técnicas académicas Araceli Guarneros y Luz María Chiu por todo el apoyo que me brindaron en el desarrollo de la parte experimental de éste trabajo, y principalmente por sus enseñanzas y su invaluable amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que subvencionó mis estudios de posgrado (CONACyT-46554).

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por darme la oportunidad de escalar un peldaño más en el campo del conocimiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido continuar con mi vocación científica.

Dedico esta tesis:

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, y han depositado su entera confianza en mí sin dudar ni un solo momento de mi inteligencia y capacidad.

ÍNDICE

Resumen.

Abstract.

Abreviaturas.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.	
2.1 Epilepsia.....	4
2.2 Neuroinflamación.....	5
2.3 Epilepsia y citocinas proinflamatorias.....	7
2.4 Fármacos antiepilépticos.....	9
2.5 Fármacos antiepilépticos y citocinas proinflamatorias.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
6. MÉTODOS.	
6.1 Fármacos.....	15
6.2 Animales experimentales.....	16
6.3 Detección de la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α por PCR.....	20
6.3.1 Síntesis de ADNc.....	21
6.3.2 PCR.....	21
6.4 Detección de la expresión proteica de IL-1 β por Western blot.....	22
6.4.1 Extracción proteica.....	23
6.4.2 Electroforesis y transferencia de proteínas.....	23
6.4.3 Inmunodetección.....	23

6.5 Análisis estadístico.....	24
7. RESULTADOS.	
7.1 Efectos agudos y crónicos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión del ARNm de IL- 1 β y de TNF- α en el hipocampo.....	25
7.2 Efectos agudos y crónicos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión proteica de IL- 1 β en el hipocampo.....	27
7.3 Efecto de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por LPS.....	28
7.4 Efecto de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por diferentes agentes pro-convulsivos sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en hipocampo.....	29
7.5 Efecto de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre las convulsiones tónico-clónicas y sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por la 4-aminopiridina.....	30
8. DISCUSIÓN.....	34
9. CONCLUSIÓN GENERAL.....	40
10. BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α tras la inoculación <i>i.p.</i> de lipopolisacáridos (LPS).....	19
Figura 2. Expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo de animales pre-inyectados con los vehículos usados para disolver los diferentes fármacos.....	25
Figura 3. Efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión hipocampal del ARNm de las citocinas proinflamatorias.....	26
Figura 4. Experimento representativo que muestra las bandas del ARNm de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α de animales inyectados con una o siete dosis del fármaco anticonvulsivo indicado.....	27
Figura 5. Efectos de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión proteica de IL-1 β	28
Figura 6. Efecto de los fármacos antiepilépticos sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por LPS en el hipocampo.....	29
Figura 7. Efecto de los agentes pro-convulsivos sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias en el hipocampo.....	31
Figura 8. Efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por 4-aminopiridina en el hipocampo.....	33
Figura 9. Resumen gráfico.....	40

Índice de tablas

Tabla 1. Grupos experimentales.....	17
Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los primers sentido y antisentido usados para el PCR.....	22
Tabla 3. Efectos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por la 4-aminopiridina.....	32

Resumen

Evidencia experimental y clínica muestra que un aumento en las citocinas proinflamatorias en el cerebro participa en el desarrollo de la epilepsia. Además, algunos estudios *in vitro* reportan que los propios fármacos antiepilépticos pueden modificar el nivel de expresión de marcadores proinflamatorios. Sin embargo, se desconoce el efecto *in vivo* de los fármacos antiepilépticos sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias en el cerebro. Por lo tanto, en el presente estudio se investigaron los efectos de una o siete dosis de los fármacos antiepilépticos clásicos carbamazepina y ácido valproico, y del nuevo fármaco anticonvulsivo vinpocetina, sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en el hipocampo de ratas, usando PCR o Western blot. Posteriormente, investigamos los efectos de los fármacos antiepilépticos sobre el aumento en la expresión de dichas citocinas inducido por la inoculación con lipopolisacáridos (LPS) *in vivo*. Con el propósito de validar nuestros métodos, los cambios inducidos por los agentes pro-convulsivos: 4-aminopiridina, pentilentetrazol y pilocarpina también fueron estudiados. Finalmente, exploramos el efecto de los fármacos antiepilépticos sobre las convulsiones y sobre el concomitante aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias inducido por la 4-aminopiridina. Nuestros resultados muestran que la vinpocetina y la carbamazepina disminuyeron la expresión de IL-1 β y TNF- α en condiciones basales y previnieron el aumento de ambas citocinas proinflamatorias inducido por LPS. En contraste, el ácido valproico no disminuyó la expresión basal de las citocinas o el aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α inducido por LPS. Las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por 4-aminopiridina,

pentilentetrazol o pilocarpina aumentaron marcadamente la expresión de IL-1 β y TNF- α . Los cambios inducidos por 4-aminopiridina disminuyeron en presencia de todos los fármacos anticonvulsivos probados, aunque el ácido valproico fue menos efectivo. Concluimos que los fármacos anticonvulsivos, vinpocetina y carbamazepina, cuyos mecanismos de acción involucran una disminución en la permeabilidad de los canales iónicos, también reducen la inflamación cerebral.

Abstract

Experimental and clinical evidence shows that an increase in pro-inflammatory cytokines in the brain is involved in the development of epilepsy. In addition, some *in vitro* studies report that antiepileptic drugs by themselves can modify the expression level of proinflammatory markers. However, the *in vivo* effect of antiepileptic drugs on proinflammatory cytokine expression in the brain is unknown. Therefore in the present study, the effects of the two classical antiepileptic drugs, carbamazepine and valproic acid, and the non classical anti-seizure drug, vinpocetine were investigated on the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the hippocampus of rats by PCR or Western blot after the administration of one or seven doses. Next, the effects of the anti-seizure drugs were investigated on the rise in cytokine expression induced by LPS inoculation *in vivo*. To validate our methods the changes induced by the pro-convulsive agents: 4-aminopyridine, pentylenetetrazole and pilocarpine were also tested. Finally, the effect of the anti-seizure drugs on seizures and on the concomitant rise in pro-inflammatory cytokine expression induced by 4-aminopyridine was explored. Results show that vinpocetine and carbamazepine reduced the expression of IL-1 β and TNF- α from basal conditions, and reduced the increase in both pro-inflammatory cytokines induced by LPS. In contrast, valproic acid, failed to reduce both, the expression of the cytokines from basal conditions and to prevent the rise in IL-1 β and TNF- α expression induced by LPS. Tonic-clonic seizures induced either by 4-aminopyridine, pentylenetetrazole or pilocarpine increased the expression of IL-1 β and TNF- α markedly. 4-aminopyridine-induced changes were reduced by all the

tested anti-seizure drugs, although valproic acid was less effective. We conclude that the anti-seizure drugs, vinpocetine and carbamazepine, whose mechanisms of action involve a decrease in ion channels permeability, also reduce cerebral inflammation.

Abreviaturas

EEG, electroencefalograma

GABA, ácido gamma-aminobutírico

IL-1 β , interleucina 1 beta

LPS, lipopolisacáridos

Na⁺, sodio

NF- κ B, factor nuclear kappa B

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa

1. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios sugieren la participación de las citocinas proinflamatorias en la generación y mantenimiento de las convulsiones, así como en el establecimiento de un foco epiléptico. Por ejemplo, se han encontrado niveles aumentados de la interleucina-1 beta (IL-1 β), del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y de otras citocinas proinflamatorias en varios modelos animales de epilepsia, así como en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes epilépticos (De Simoni y col. 2000; Plata-Salaman y col. 2000; Dubé y col. 2005; Gorter y col. 2006; Ravizza y Vezzani 2006; Ravizza y col. 2008; Sinha y col. 2008; Vezzani y col. 2013). Interesantemente, en cultivos mixtos de células gliales, el bloqueo de los canales de sodio (Na⁺) por tetrodotoxina o por el fármaco antiepiléptico fenitoína, inhibió la activación de la microglía y la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α inducidas por los lipopolisacáridos (Black y col. 2009). La modulación farmacológica a la baja de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje, los cuales son fundamentales en la iniciación y conducción de los potenciales de acción del cerebro, es particularmente eficaz para el control de las convulsiones epilépticas (Catterall 1999). De acuerdo con esto, los fármacos antiepilépticos que reducen la permeabilidad de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje se encuentran entre los más efectivos en el control de las convulsiones (Taylor y Narasimhan 1997). Algunos estudios *in vitro* han sido dirigidos a explorar los efectos de los fármacos antiepilépticos sobre las células cerebrales responsables de las cascadas inflamatorias (Pavone y Cardile 2003; Haghikia y col. 2008; Black y col. 2009; Stienen y col. 2011; Dambach y col. 2014). Sin embargo, los posibles efectos *in vivo*

de los fármacos antiepilépticos sobre la inflamación cerebral no han sido directamente investigados.

La vinpocetina es un fármaco neuroprotector que inhibe las respuestas mediadas por apertura de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na⁺ de manera más potente y efectiva que varios fármacos antiepilépticos de la primera y segunda generación incluyendo a la carbamazepina (Sitges y col. 2005; 2006; 2007a; 2007b; 2011). En contraste con vinpocetina y carbamazepina, el antiepiléptico ácido valproico, cuyo mecanismo de acción principalmente implica un aumento en la transmisión GABAérgica (Löscher 2002), fue incapaz de disminuir la permeabilidad de los canales iónicos pre-sinápticos en una amplia gama de concentraciones (Sitges y col. 2007b). En cobayos, la vinpocetina al igual que la carbamazepina y otros fármacos antiepilépticos, inhibe la actividad epileptiforme del electroencefalograma inducida farmacológicamente por diferentes agentes proconvulsivos (Nekrassov y Sitges 2004; 2006; 2008; Sitges y Nekrasov 2004). Además, se ha demostrado que la vinpocetina reduce la inflamación mediada por activación del factor de transcripción NF-kB en células del músculo liso vascular, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales (Jeon y col. 2010). Interesantemente, terapias con agentes anti-inflamatorios están empezando a ser consideradas como nuevos tratamientos potenciales para controlar las convulsiones en pacientes epilépticos refractarios (Sinclair 2003; Verhelst y col. 2005; Reid y col. 2009; Maroso y col. 2010; Löscher y col. 2013).

Con el objetivo de explorar si los fármacos antiepilépticos que difieren en sus mecanismos de acción afectan la inflamación cerebral de forma diferente, en el presente estudio se investigó el efecto de la administración *in vivo* de vinpocetina,

carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión de dos marcadores pro-inflamatorios en el hipocampo, una estructura cerebral altamente epileptogénica en la que las convulsiones han demostrado aumentar las citocinas proinflamatorias (De Simoni y col. 2000; Plata-Salaman y col. 2000; Ravizza y col. 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1 Epilepsia

La epilepsia comprende un grupo de desórdenes caracterizados por convulsiones recurrentes no provocadas, que causan un daño transitorio de la función cerebral debido a una excitabilidad excesiva y a una sincronización aberrante de las neuronas que puede ser local o extenderse a todas las regiones corticales simultáneamente (Engel 1995; Noebels 1996). La epilepsia es uno de los síndromes cerebrales con mayor prevalencia, se estima que entre el 1 y 2% de la población mundial la padece, sin embargo, la prevalencia es mayor en los países subdesarrollados. El número de personas con epilepsia es uno de los argumentos para considerarla un problema de salud pública. Según el Programa Prioritario de Epilepsia, en México existen de 11.4 a 20.3 por cada 1000 personas en riesgo de padecer esta enfermedad. Traducidas estas cifras a la población nacional, se calcula que existen cerca de 1 a 2 millones de mexicanos con este riesgo y que el número de pacientes con epilepsia es 1.5 millones aproximadamente.

La etiología de las crisis epilépticas es multifactorial. En condiciones normales, la actividad nerviosa se mantiene en un estado de equilibrio dinámico regulado por procesos neuronales inhibitorios y excitatorios. Un desbalance entre estos mecanismos puede originar epilepsia. Así, estudios neuroquímicos indican que tanto el aumento en la transmisión excitatoria del neurotransmisor excitador por excelencia, glutamato, como la disminución en la neurotransmisión inhibitoria del ácido gamma-aminobutírico (GABA) pueden desencadenar actividad epiléptica (Bradford 1995; Rowley y col. 2012).

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (International League Against Epilepsy, ILAE) separa las epilepsias idiopáticas (primarias) y criptogénicas o de etiología desconocida, de aquellas epilepsias de etiología conocida o formas sintomáticas (secundarias) (Panayiotopoulos 2012). La epilepsia idiopática o primaria se define como un padecimiento que no va precedido por otro y no se encuentra otra causa que no sea una aparente predisposición hereditaria. Las formas criptogénicas se refieren a trastornos de causa desconocida, o aún no determinada. Las formas sintomáticas se consideran secundarias a un proceso patológico del sistema nervioso central de causa conocida o razonablemente sospechada, como pueden ser: infecciones, traumatismos, hipoxia-isquemia, malformaciones congénitas, alteraciones innatas del metabolismo, neoplasias e intoxicaciones. Resulta interesante que la mayoría de los factores involucrados en el desarrollo de las epilepsias sintomáticas pueden llegar a inducir un proceso inflamatorio en el sistema nervioso central.

2.2 Neuroinflamación

En el cerebro, además de las neuronas que son las células excitables se encuentran las células gliales, llamémosles, astrocitos y microglía. En condiciones normales, las células gliales juegan un papel esencial en múltiples funciones fisiológicas cerebrales. Por ejemplo, modulan la plasticidad sináptica, regulan el microambiente extracelular a través de modificar la concentración de neurotransmisores y iones, y contribuyen con la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Además, la glía se encarga de las funciones inmunológicas en el

sistema nervioso central a través de la liberación de citocinas proinflamatorias con la concomitante activación de otras células gliales.

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica natural que tiene como propósito general remover o inactivar agentes potencialmente dañinos o tejido cerebral dañado. Puede ser activada por patógenos invasores o por daño celular inducido en ausencia de infección (Maroso y col. 2011). La microglía son las principales células inmunes residentes en el cerebro, vigilan constantemente el microambiente y representan la primera línea de defensa contra el daño (Becher y col. 2000). Incluso, evidencia emergente sugiere que tanto las neuronas como los astrocitos también juegan un papel importante en la neuroinflamación (Vezzani y col. 2011). En condiciones fisiológicas, la microglía exhibe un fenotipo desactivado, sin embargo, mediadores químicos y señales endógenas de peligro liberados por patógenos y células neuronales dañadas respectivamente, atraen a la microglía e inducen su activación. Esta a su vez induce la proliferación de células microgliales y la liberación de citocinas. Las células microgliales activadas llevan a cabo funciones fagocíticas al digerir material extraño y restos celulares, y junto con los astrocitos, liberan sustancias citotóxicas tales como peróxido de hidrogeno, óxido nítrico y proteasas para destruir organismos infecciosos (Allan y Rothwell, 2001). Las citocinas liberadas por la microglía activada inician una cascada de señalización proinflamatoria que conduce finalmente a vasodilatación localizada, extravasación y reclutamiento de más células inmunitarias (Aloisi y col. 2000).

Normalmente, este proceso es detenido por la remoción o eliminación del estímulo dañino, etapa en la cual la respuesta inmune disminuye y los astrocitos y la microglía enfocan su atención en reparar el tejido dañado. Sin embargo, en

circunstancias que no se entienden completamente, la resolución de la inflamación está comprometida, la proliferación de microglía activada es perpetuada y sus funciones citotóxicas exageradas. En la neuroinflamación crónica, los astrocitos y las células microgliales parecen estar actuando en una forma nociva contribuyendo paradójicamente con el daño neuronal a través de la liberación sostenida de citocinas proinflamatorias.

2.3 Epilepsia y citocinas proinflamatorias

En la última década, el sistema inmunológico ha ganado la atención de muchos investigadores enfocados en el estudio de la epilepsia. Esto ha dado lugar a una gran cantidad de información sobre la participación de diversos factores inmunológicos en las convulsiones y la epileptogénesis. En este sentido, las citocinas proinflamatorias, interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) son dos factores inmunológicos que han recibido mucha atención. Incluso, datos de investigación clínica y preclínica indican un papel determinante de dichas citocinas en la creación de focos epilépticos así como en la progresión de la enfermedad (De Simoni y col. 2000; Plata-Salaman y col. 2000; Dubé y col. 2005; Gorter y col. 2006; Ravizza y Vezzani 2006; Ravizza y col. 2008; Sinha y col. 2008; Vezzani y col. 2013).

Las citocinas IL-1 β y TNF- α son proteínas de señalización secretadas por todas las células del sistema inmune, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales vasculares, así como por las células gliales del cerebro. Dichas citocinas tienen un papel importante en varias funciones del sistema nervioso central normal. Por ejemplo, se ha propuesto que participan en la regulación del sueño

(Krueger y col. 1998), en funciones neuroendocrinas (Rostene y col. 2011), en el desarrollo neuronal (Giulian y col. 1988; Golan y col. 2004; Boulanger y col. 2009) y posiblemente en el envejecimiento normal (Letiembre y col. 2007). Sin embargo, existe un interés creciente respecto al entendimiento de las citocinas proinflamatorias como mediadores comunes de diversas alteraciones en el funcionamiento del sistema nervioso central durante estados inflamatorios.

En la actualidad, una compleja relación entre la epilepsia y los niveles elevados de citocinas proinflamatorias ha sido indicada. Se ha reportado que en muestras de fluido cerebroespinal o suero de pacientes epilépticos, las convulsiones incrementan el nivel de IL-1 β y TNF- α (Sinha y col. 2008). Así mismo, en modelos animales de convulsiones y de epilepsia, también se reportó que las convulsiones incrementan a dichas citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, en los modelos animales de epilepsia inducida por kindling o por pilocarpina, la expresión de IL-1 β y TNF- α se aumentó particularmente en el hipocampo, una estructura cerebral altamente epileptogénica (De Simoni y col. 2000; Plata-Salaman y col. 2000; Ravizza y Vezzani 2006; Ravizza y col. 2008). Igualmente, el agente pro-convulsivo pentilentetrazol, también aumentó el ARNm que codifica para IL-1 β en corteza cerebral, hipotálamo e hipocampo (Minami y col. 1990).

El papel de las citocinas en las convulsiones epilépticas ha sido investigado usando diversos abordajes experimentales. Por ejemplo, la pre-inyección de IL-1 β en cerebro de roedor (usando concentraciones dentro del intervalo producido endógenamente en condiciones patológicas), prolongó la duración de las convulsiones inducidas por inyección intracerebral de ácido kaínico (agonista de glutamato) o de bicuculina (antagonista de GABA) (Vezzani y col. 1999; 2000;

Balosso y col. 2008). Más aún, el bloqueo de la acción de esta citocina en el cerebro por la aplicación exógena de IL-1ra (antagonista natural), interfiere con la convulsión, o reduce su severidad en diferentes modelos animales de epilepsia (Vezzani y col. 2000; 2002; Heida y Pittman 2005; Rodgers y col. 2009). Similarmente, ratones transgénicos que expresaban de bajos a moderados niveles de TNF- α en astrocitos, mostraron una disminución en la susceptibilidad a las convulsiones (Balosso y col. 2005), mientras que ratones que expresaban altos niveles de TNF- α desarrollaron incluso signos de disfunción neurológica (Akassoglou y col. 1997). Por lo que se ha propuesto que controlar el aumento en el nivel de IL-1 β y TNF- α en el cerebro, representa una alternativa efectiva para el tratamiento de las convulsiones epilépticas.

2.4 Fármacos antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos actualmente disponibles en la clínica son capaces de controlar las crisis epilépticas en aproximadamente 70% de los pacientes (Kwan y Brodie 2000; French y col 2004). A pesar de los considerables avances en la farmacoterapia, un tercio de los pacientes con epilepsia son refractarios al tratamiento adecuado con fármacos antiepilépticos, incluso a las dosis máximas toleradas (Berg 2009). Además, el uso de estos fármacos frecuentemente se asocia con efectos secundarios adversos (Perucca y Gilliam 2012). Por lo tanto existe una necesidad médica no cubierta para el tratamiento de la epilepsia.

Cerca de treinta fármacos utilizados para el tratamiento de las epilepsias existen en el mercado y en general se dividen en antiepilépticos de primera generación o clásicos, y antiepilépticos de segunda y tercera generación. Los antiepilépticos clásicos incluyen a la carbamazepina, ácido valproico, fenitoína, fenobarbital, etosuximida y a las benzodiazepinas. Los antiepilépticos de segunda generación incluyen a la lamotrigina, topiramato, oxcarbazepina, felbamato, fosfenitoína, gabapentina, tiagabina, vigabatrina y zonisamida. Finalmente dentro de los antiepilépticos de tercera generación se encuentra la eslicarbazepina, brivaracetam, levetiracetam, carisbamato, fluorofelbamato, elpetrigina, lacosamida, rufinamida, safinamida y vinpocetina (Vohora 2010; Sirven y col. 2012).

Con base en su mecanismo de acción, los antiepilépticos pueden ser clasificados en tres grupos principales, los que modulan a los canales iónicos dependientes de voltaje, los que aumentan la inhibición sináptica, y los que inhiben la excitación sináptica sostenida sin perturbar la actividad cerebral no epiléptica (Rogawski y Loscher 2004).

Los fármacos antiepilépticos que reducen la permeabilidad de los canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran entre los más eficaces en el control de las convulsiones (Taylor y Narasimhan 1997). Ejemplos de estos fármacos incluyen a la carbamazepina y la vinpocetina que se ha demostrado que reducen el aumento en la permeabilidad de los canales cerebrales de sodio (Na^+) en condiciones de despolarización sostenida (Ragsdale y col. 1991; Sitges y Nekrassov 1999; Sitges y col. 2006, 2007, 2009). El bloqueo de canales de Ca^{2+} y la apertura de canales de K^+ también se han sugerido como posibles mecanismos de acción de algunos antiepilépticos (Wickenden y col. 2000; Lasoñ 2013). Por otro lado, efectos

anticonvulsivos también pueden ser producidos por fármacos que aumentan la neurotransmisión GABAérgica como se presume para el ácido valproico (Vargas y col. 1998; Löscher 2002). En principio, es posible prevenir las convulsiones epilépticas al utilizar cualquiera de estas estrategias o una combinación de ellas.

2.5 Fármacos antiepilépticos y citocinas proinflamatorias

Como se mencionó anteriormente, la sobreactivación de los astrocitos y la microglía puede promover el desarrollo de convulsiones epilépticas a través de un aumento en la liberación de marcadores inflamatorios y en la excitabilidad cerebral (Devinsky y col. 2013). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la glía es capaz de detectar y responder al entorno no se comprenden completamente. En algunos estudios se propone que la glía también expresa receptores y canales iónicos, incluidos los canales de Na⁺ sensibles a voltaje. Dichos canales son responsables de la generación y conducción del potencial de acción y son determinantes para la excitación neuronal (Engel y Jonas 2005). Interesantemente, Black y col. (2009) reportaron que en cultivos mixtos de células gliales, el bloqueo de los canales de Na⁺ con tetrodotoxina o con el fármaco antiepiléptico fenitoína, inhibió varias funciones de la microglía activada por lipopolisacáridos, incluida la migración y la secreción de las citocinas IL-1 β y TNF- α . Además, en varios estudios *in vitro* han explorado los efectos de los fármacos antiepilépticos sobre las células responsables de las cascadas inflamatorias (Pavone y Cardile 2003; Haghikia y col. 2008; Black y col. 2009; Stienen y col. 2011; Dambach y col. 2014). Sin embargo, la pregunta de si los fármacos antiepilépticos pueden afectar la inflamación cerebral *in vivo* no se ha abordado directamente.

La vinpocetina (etil-apovincamina-22-oato) es un fármaco con elevado potencial anticonvulsivo, que en los últimos años se ha estado caracterizando en el laboratorio de la Dra. Sitges a varios niveles de complejidad. Por ejemplo, en el cobayo *in vivo*, la vinpocetina inhibió las convulsiones y la actividad epiléptica cortical inducida con pentilentetrazol, así como la actividad epileptiforme que acompaña a las convulsiones inducidas por 4-aminopiridina, a concentraciones menores que los fármacos antiepilépticos de primera línea carbamazepina, fenitoína y ácido valproico (Nekrassov y Sitges 2004; 2006; Sitges y Nekrassov 2004). En terminales nerviosas cerebrales aisladas de hipocampo, la vinpocetina redujo el aumento en la concentración interna de Na⁺ y el aumento en la liberación del neurotransmisor excitador por excelencia, glutamato, de manera más potente y efectiva que varios fármacos antiepilépticos, tanto de la primera como de la segunda generación (Sitges y col. 2005; 2006; 2007a; 2007b; 2011). Adicionalmente, un estudio reciente muestra que la vinpocetina reduce la inflamación sistémica inhibiendo la activación del factor inductor por excelencia del proceso inflamatorio, NF-kB (Jeon y col. 2010). Estos hallazgos en las distintas preparaciones resultan interesantes a la luz de que la inhibición de las vías inflamatorias en el cerebro mediante el uso de agentes antiinflamatorios está iniciando a ser considerada como una nueva alternativa potencial para cubrir la necesidad médica existente para el tratamiento de la epilepsia.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en la creciente evidencia experimental y clínica que apoya la hipótesis de que la inflamación cerebral, particularmente el aumento en la citocinas proinflamatorias podría constituir un mecanismo común y crucial en la patofisiología de las convulsiones y la epilepsia, además, de los estudios *in vitro* donde reportan que los propios fármacos antiepilépticos pueden modificar la expresión de marcadores inflamatorios (Pavone y Cardile 2003; Haghikia y col. 2008; Black y col. 2009; Stienen y col. 2011; Dambach y col. 2014), es necesario profundizar en el mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos con el fin de encontrar un tratamiento farmacológico que permita controlar la condición inflamatoria cerebral y simultáneamente las crisis convulsivas. Eventualmente estos fármacos tendría mejor eficacia en los pacientes epilépticos que presenten un estado proinflamatorio y así se podrían mejorar las indicaciones terapéuticas, y como consecuencia el control de los pacientes.

4. HIPÓTESIS

Considerando que los fármacos anticonvulsivos vinpocetina y carbamazepina pero no el ácido valproico, disminuyen la permeabilidad de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje, y que los bloqueadores de dichos canales como la tetrodotoxina y el fármaco antiepiléptico fenitoína, disminuyen la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en cultivos mixtos de células gliales, es probable que la vinpocetina y la carbamazepina también disminuyan los niveles de expresión de IL-1 β y TNF- α en el cerebro.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Exploramos los efectos *in vivo* de los fármacos antiepilépticos clásicos carbamazepina y ácido valproico, y del nuevo fármaco antiepiléptico vinpocetina, sobre el nivel de expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en el hipocampo, una estructura cerebral altamente epileptogénica.

5.2 Objetivos particulares

- Investigar los posibles efectos de vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión hipocampal de IL-1 β y TNF- α en condiciones basales.
- Explorar los efectos de vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre el aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α inducido por lipopolisacáridos en el hipocampo.
- Evaluar los efectos de vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre el aumento en la expresión hipocampal de ambas citocinas proinflamatorias inducido por las convulsiones tónico-clónicas generalizadas.

6. MÉTODOS

6.1 Fármacos

Los fármacos vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico fueron amablemente donados por Psicofarma S.A. de C.V. (México). La 4-aminopiridina, pilocarpina y los lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El pentilentetrazol de MP Biochemicals Inc (Aurora, Ohio).

Los fármacos usados se disolvieron en diferentes vehículos: vinpocetina se disolvió en solución salina acidificada con HCl y se ajustó a pH 4 con NaOH; carbamazepina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO), y el ácido valproico en solución salina. El pentilentetrazol, 4-aminopiridina, pilocarpina y los LPS se disolvieron en solución salina. Todos los fármacos se administraron por vía intraperitoneal en un volumen de 1 ml/kg. En el caso de la carbamazepina que se disolvió en un vehículo orgánico, el volumen utilizado fue más pequeño (es decir, 0.5 ml/kg).

La dosis de 5 mg/kg de vinpocetina se eligió con base en estudios previos en cobayos donde la vinpocetina a esta dosis, completamente previene la actividad epileptiforme del electroencefalograma (EEG) inducida tanto por el pentilentetrazol como por la 4-aminopiridina (Nekrassov y Sitges 2004; 2008; Sitges y Nekrassov 2004). En el caso de la carbamazepina, usamos una dosis de 50 mg/kg para evaluar su efecto sobre los marcadores pro-inflamatorios, ya que en estudios previos encontramos que incluso a una dosis de 25 mg/kg la carbamazepina completamente previene la actividad epileptiforme del EEG inducida por 4-aminopiridina y pentilentetrazol en ratas (Sitges y col. 2012). La dosis de 50 mg/kg de ácido

valproico se eligió con base en estudios previos en cobayos donde el ácido valproico a una dosis baja (30 mg/kg) previene la actividad epileptiforme del EEG inducida por pentilentetrazol en el 70 % de los animales.

Los agentes pro-convulsivos, 4-aminopiridina y pentilentetrazol se usaron a dosis que en la rata inducen convulsiones en el 100% de los animales (Sitges y col. 2012). La dosis de pilocarpina se eligió con base en estudios previos, por ejemplo, Ravizza y col. (2008). La concentración de 100 µg/kg de LPS se seleccionó con base en estudios previos donde demuestran que la inoculación *i.p.* de LPS a esta dosis aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo (Turrin y col. 2001; Frank y col. 2012).

6.2 Animales experimentales

En el presente estudio se incluyeron 126 ratas Wistar machos (291 ± 1.1 g de peso) divididas en 26 grupos. Los grupos se definieron por la sustancia (s) inyectada (Tabla 1). De estos, 18 grupos se usaron con la finalidad de investigar el efecto de los diferentes fármacos sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo por PCR. Los otros 8 grupos se usaron para investigar el efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión protéica de IL-1 β en el hipocampo por Western blot.

Tabla 1. Grupos experimentales

Grupo	Sustancia administrada	número de dosis	#	Método usado para medir la expresión de las citocinas
G1	veh	1	12	RT-PCR
G2	vin	1	4	
G3	CBZ	1	4	
G4	VPA	1	4	
G5	veh	7	6	
G6	vin	7	3	
G7	CBZ	7	3	
G8	VPA	7	3	
G9	veh	1	4	Western blot
G10	vin	1	4	
G11	CBZ	1	4	
G12	VPA	1	4	
G13	veh	7	4	
G14	vin	7	4	
G15	CBZ	7	4	
G16	VPA	7	4	
G17	veh	1	5	RT-PCR
G18	vin	1	4	
G19	CBZ	1	4	
G20	VPA	1	4	
G21	veh	1	6	
G22	veh	1	7	
G23	veh	1	4	
G24	vin	1	4	
G25	CBZ	1	4	
G26	VPA	1	4	

Los grupos (G) de animales fueron inyectados con: vehículo (veh), vinpocetina (vin), carbamazepina (CBZ), ácido valproico (VPA), lipopolisacáridos (LPS), 4-aminopiridina (4-AP), pentilentetrazol (PTZ) o pilocarpina (pilo) como se indica.

#, número de animales en el grupo indicado.

Dado que no se encontraron diferencias significativas entre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en los animales inyectados con los vehículos, todos los animales administrados con los diferentes vehículos se incluyeron en el grupo 1. El efecto de una o de varias dosis de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias se investigó en los siguientes grupos: grupo 2, animales inyectados una vez con vinpocetina a una dosis de 5 mg/kg. Grupo 3, animales inyectados una vez con carbamazepina a una dosis de 50 mg/kg y el grupo 4, inyectados una vez con ácido valproico también a una dosis de 50 mg/kg. Los 4 grupos usados para investigar el efecto de las dosis repetidas de los vehículos o de

los fármacos anticonvulsivos fueron: grupo 5, animales inyectados diariamente con los diferentes vehículos durante una semana, y los grupos 6, 7 y 8, que fueron administrados durante una semana con una inyección diaria de: vinpocetina (5 mg/kg), carbamazepina (50 mg/kg) y ácido valproico (50 mg/kg), respectivamente. Los animales de estos 8 grupos se sacrificaron por decapitación 90 min después de la única o la última inyección. Este tiempo se eligió con base en estudios previos donde muestran que a los 90 min los fármacos anticonvulsivos alcanzan una alta concentración en el cerebro.

También se investigó el efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión protéica de IL-1 β por Western blot. Con este propósito se formaron 8 grupos adicionales. A saber, grupo 9, animales inyectados una vez con solución salina, grupo 10, inyectados una vez con vinpocetina (5 mg/kg), grupo 11 con carbamazepina (50 mg/kg) y grupo 12 con valproico ácido (50 mg/kg). Así como los grupos 13, 14, 15 y 16, que recibieron una inyección diaria durante una semana de: solución salina, vinpocetina (5 mg/kg), carbamazepina (50 mg/kg) y ácido valproico (50 mg/kg), respectivamente.

El efecto de los LPS (100 μ g/kg) sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo de animales sacrificados 30 min, 1 h, 3 h y 6 h después de la exposición a los LPS, se evaluó por PCR. Como se observa en la Figura 1, el máximo aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α se encontró en el grupo expuesto a los LPS durante 1 h. Por lo tanto, investigamos el efecto del pre-tratamiento con los fármacos anticonvulsivos sobre el aumento en la expresión del ARNm de las citocinas proinflamatorias inducido por los LPS a 1 h en tres grupos adicionales. A saber, grupo 18, pre-administrado con 5 mg/kg de vinpocetina 90 min

antes de los LPS, y los grupos 19 y 20, pre-administrados con 50 mg/kg de carbamazepina o de ácido valproico 90 minutos antes de los LPS.

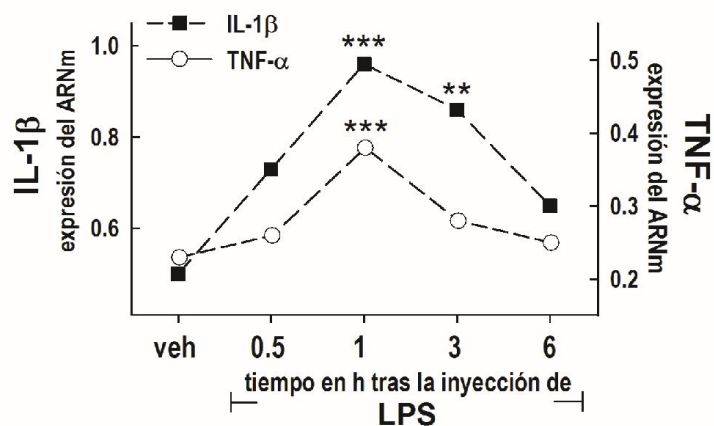


Figura 1. Expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α tras la inoculación *i.p.* de lipopolisacáridos (LPS). Los animales expuestos a 100 μ g/kg de LPS fueron sacrificados a los tiempos indicados y la expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (■) y TNF- α / β -actina (○) fue determinada en el hipocampo. Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de cinco (1 h) o tres (0.5, 3 y 6 h) animales por grupo. **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$ contra la expresión relativa del ARNm en el hipocampo de animales inyectados con vehículo (veh) y sacrificados 90 min después. Los animales sacrificados a los 30 min, 3 y 6 h tras la inyección de LPS no se incluyeron en la tabla 1.

Exploramos el efecto de las convulsiones inducidas por diferentes agentes pro-convulsivos sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo. Con este propósito se formaron 3 grupos: grupo 21, administrado con 2.5 mg/kg de 4-aminopiridina, grupo 22 con 50 mg/kg de pentilentetrazol y grupo 23 con 340 mg/kg de pilocarpina. Todos los animales expuestos a los agentes pro-convulsivos se observaron durante 30 minutos después de la primera convulsión tónico-clónica, y se sacrificaron por decapitación.

Los últimos 3 grupos se formaron con el objetivo de investigar el efecto de los fármacos anti-convulsivos sobre las convulsiones inducidas con 2.5 mg/kg de 4-aminopiridina. Elegimos este agente pro-convulsivo ya que su mecanismo de acción

involucra cambios en la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de sodio sensibles al voltaje (Galván y Sitges 2004). Así, el grupo 24, fue pre-administrado con vinpocetina (5 mg/kg) 90 min antes de la 4-aminopiridina, y los grupos 25 y 26 con carbamazepina (50 mg/kg) y ácido valproico (50 mg/kg) 90 minutos antes de la 4-aminopiridina, respectivamente. Todos los animales de estos grupos se observaron durante 1 h después de la inyección de la 4-aminopiridina y se sacrificaron por decapitación.

6.3 Detección de la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α por PCR.

Los cerebros de los animales sometidos a las diferentes condiciones experimentales fueron removidos y los hipocampos disecados.

Los hipocampos se colocaron en tubos estériles que contenían 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, USA) y se congelaron a -80°C hasta su uso. La extracción del ARN total se realizó después de homogeneizar los hipocampos (15 golpes con un homogeneizador de teflón marca Thomas Scientific AA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se re-suspendieron en 50 μ l de agua libre de nucleasas.

La cantidad y pureza del ARN total de cada muestra se determinó por espectrofotometría usando un NanoDrop (Thermo Scientific, USA). La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

6.3.1 Síntesis de ADNc

El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se obtuvo por transcripción reversa del ARN total con el kit Superscript® III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen Life Technologies, USA). Con este propósito, una pequeña alícuota que contenía 2 µg de ARN total se mezcló con 0.5 µl de oligo (dT)₂₀ (50 µM), 0.5 µl de tampón de alineación y se llevó a un volumen final de 4 µl con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y después se enfrió en hielo. Para la transcripción reversa 1 µl de III/RNaseOUT™ enzyme mix y 5 µl de 2X first-strand reaction mix (10 mM de MgCl₂ y 1 mM de cada dNTP) se añadieron a la mezcla y posteriormente se incubaron a 50°C durante 50 min. La reacción fue terminada por calentamiento de la mezcla a 85°C durante 5 min y el ADNc resultante de este procedimiento se almacenó a -20° C hasta su uso.

6.3.2 PCR

La expresión del ARNm de IL-1β y TNF-α se evaluó por PCR con el kit GoTaq® DNA Polymerase. Brevemente, 1.5 µl de ADNc (250 ng/µl) fueron amplificados en una mezcla que contenía 2 µl de 5X Green buffer, 0.8 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.25 µl de PCR nucleotide mix (10 mM), 0.5 µl de sense primer (10 pM), 0.5 µl de anti-sense primer (10 pM), 0.05 µl de DNA polimerase (5 u/µl) y 4.4 µl de agua Milli-Q estéril.

Las reacciones de PCR se realizaron en un Eppendorf Mastercycler gradient (USA). Las condiciones de los ciclos de temperatura fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 34 ciclos, incluyendo desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación del primer a 58°C para IL-1β y

para β -actina o a 66°C para TNF- α durante 45 s, y extensión a 72°C durante 1 min. Una extensión final se realizó a 72°C durante 10 min, y posteriormente las muestras se colocaron a 4°C. Las secuencias de los primers usados para el PCR se muestran en la Tabla 2. La cantidad amplificada del ARNm de las citocinas proinflamatorias se normalizó contra la cantidad amplificada del ARNm de β -actina. Un control negativo en ausencia de muestra se corrió en paralelo.

Tabla 2. *Secuencia nucleotídica de los primers sentido y antisentido usados para el PCR*

Gen	primer sentido	primer antisentido	tamaño del producto	GenBank
IL-1 β	CCAGGATGAGGACCCAAGCA	TCCCGACCATTGCTGTTTCC	519 bp	NM_031512.2
TNF- α	AAGCCCGTAGCCACGTCGTA	GCCCGCAATCCAGGCCACTAC	663 bp	NM_012675.3
β -actina	ATCGTGGGCCGCCCTAGGCA	ACGTACATGGCTGGGGTGTG	302 bp	NM_031144.2

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. La intensidad de la señal de las bandas resultantes se midió por densitometría usando el sistema de documentación de geles MiniBIS Pro (Bio-América, Miami FL, USA) y el software Image J desarrollado por Wayne Rasband, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, USA. Los resultados son la expresión relativa del ARNm de las citocinas proinflamatorias (Relación de ARNm de IL-1 β /ARNm β -actina o ARNm de TNF- α /ARNm de β -actina).

6.4 Detección de la expresión protéica de IL-1 β por Western Blot

Los hipocampos de los grupos 9 al 16 se colocaron en tubo estériles y se congelaron hasta su uso.

6.4.1 Extracción proteica

Para la extracción de proteínas totales, los hipocampos se homogeneizaron (10 golpes con un homogeneizador de teflón Thomas Scientific AA) en 1 ml de tampón de lisis (25 mM Tris HCl pH 7.4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1 % de Tritón X-100, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM y 1 μ l de Halt™ Protease inhibitor cocktail. Después, las mezclas se incubaron en hielo durante 1 h y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4°C en microfuga para sedimentar los restos celulares. Los sobrenadantes resultantes se recogieron y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración protéica se determinó por el método de Lowry.

6.4.2 Electroforesis y transferencia de proteínas.

Alícuotas de 50 μ g de proteína total se cargaron y separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 %. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 90 min con el sistema Mini-protean de BioRad.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno a un voltaje de 200 mA durante 60 min con el sistema Mini trans-blot de BioRad.

6.4.3 Inmunodetección.

Para la inmunodetección, los sitios de unión no-específicos de las membranas de fluoruro de polivinilideno se bloquearon con una solución que contenía: 5% leche en polvo, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.5. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-1 β (diluido

1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 20 horas a 4°C y con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (diluido 1:1000, Cell Signaling Technology, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente.

La proteína β -actina se usó como control de carga. Para detectar la expresión de esta proteína, las membranas fueron estripeadas con un tampón que contenía: 1.5 % glicina, 0.1 % SDS y 1 % Tween 20, pH 2.2, e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (diluido 1:5000, Sigma-Aldrich, USA). Seguido del anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (diluido 1:10000, Santa Cruz Biotechnology, USA).

Las proteínas se visualizaron en placas Biomax light films (Sigma-Aldrich, USA) usando el sistema de quimioluminiscencia Immobilon™ Western Chemiluminiscent horseradish peroxidase substrate (Millipore, USA). La intensidad de las bandas se midió por densitometría con el programa Image J. Para ajustar los posibles errores al cargar la muestra en los geles, las intensidades de las bandas de IL-1 β se normalizaron contra las intensidades de las bandas de β -actina obtenidas en los carriles correspondientes.

6.5 Análisis estadístico

Para las evaluaciones estadísticas se usó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc Tukey. El análisis estadísticos se realizó con el programa SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software, Alemania). Las diferencias entre los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Efectos agudos y crónicos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y de TNF- α en el hipocampo.

Para profundizar en los mecanismos subyacentes a la acción de la vinpocetina y de otros fármacos antiepilépticos con diferentes mecanismos de acción, comparamos sus efectos *in vivo* sobre la expresión de algunas citocinas proinflamatorias en el hipocampo de la rata.

Como se muestra en la figura 2 los vehículos usados para disolver los fármacos estudiados no modificaron la expresión hipocampal del ARNm de IL-1 β y TNF- α . Por lo tanto, todos los animales administrados con los diferentes fármacos se compararon contra un control general que es referido como "vehículo" en las figuras sólo por razones prácticas. Aunque es importante mencionar que se encontró la misma significancia estadística entre los grupos inyectados con los fármacos y su respectivo vehículo.

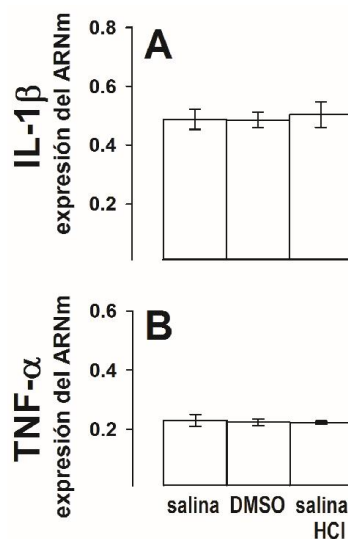


Figura 2. Expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo de animales pre-inyectados con los vehículos usados para disolver los diferentes fármacos. Expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (A) y TNF- α / β -actina (B) en animales inyectados con: salina, DMSO o salina acidificada. Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 4 animales por grupo. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.

La figura 3 muestra el efecto de una o de siete inyecciones de los fármacos anti-convulsivos sobre la expresión hipocampal del ARNm de IL-1 β y TNF- α . La parte superior de esta figura muestra una disminución similar en la expresión de IL-1 β después de una o de varias dosis. Por ejemplo, la expresión de IL-1 β en animales administrados una vez o durante 7 días con los vehículos se redujo tanto por la dosis única de vinpocetina y carbamazepina, como por las dosis repetidas. En cambio, el ácido valproico no modificó la expresión basal del ARNm de IL-1 β .

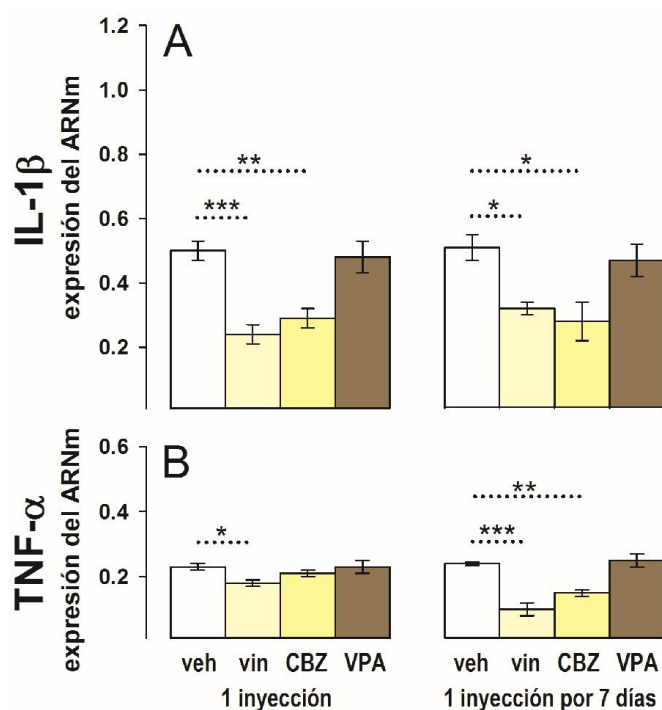


Figura 3. Efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión hipocampal del ARNm de las citocinas proinflamatorias. Expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (A) y TNF- α / β -actina (B) determinada por PCR en el hipocampo de animales administrados con una dosis (barras a la izquierda) de vehículo (veh, G1), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G2), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G3) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G4), o con 7 dosis (barras a la derecha) de vehículo (veh, G5), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G6), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G7) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G8). Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 12 (G1), 4 (G2-G4), 6 (G5) o 3 (G6-G8) animales por grupo. *, $p \leq 0,04$; **, $p < 0,01$ y ***, $p < 0,001$ entre las condiciones experimentales conectadas con líneas punteadas.

La parte inferior de la figura 3 muestra que en el caso de la expresión del ARNm de TNF- α , los cambios inducidos por los fármacos anticonvulsivos también fueron muy similares después de 1 o 7 dosis, excepto que se necesitaron inyecciones repetidas de carbamazepina para disminuir significativamente la expresión de TNF- α .

La figura 4 es un experimento representativo que muestra las bandas del ARNm de IL-1 β , TNF- α y β -actina de animales inyectados con una o varias dosis de los fármacos anticonvulsivos.

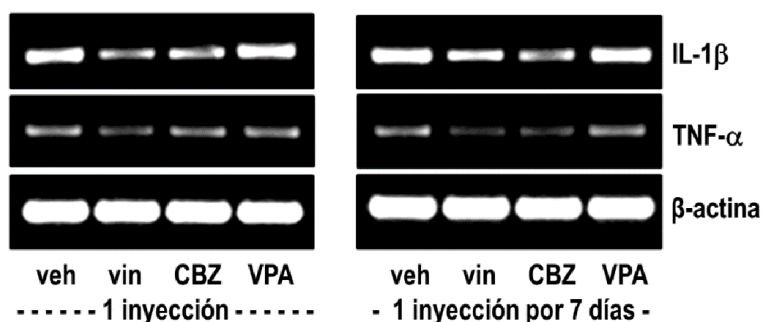


Figura 4. Experimento representativo que muestra las bandas del ARNm de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α de animales inyectados con una (geles a la izquierda) o siete dosis (geles a la derecha) del fármaco anticonvulsivo indicado. La expresión del ARNm de β -actina fue usada para normalizar la expresión de ambas citocinas.

7.2 Efectos agudos y crónicos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre la expresión proteica de IL- 1 β en el hipocampo.

Con el objetivo de investigar si el efecto anti-inflamatorio potencial de la vinpocetina y carbamazepina también afectaba la expresión proteica de IL-1 β en el hipocampo, dicha citocina pro-inflamatoria se detectó por Western blot en animales pre-administrados con los fármacos anti-convulsivos.

La figura 5 muestra que de acuerdo con la disminución en la expresión del ARNm de IL-1 β (Figura 3A), tanto la dosis única como las dosis repetidas de vinpocetina y carbamazepina disminuyeron la expresión proteica de IL-1 β en el hipocampo, mientras que el ácido valproico falló en modificar la expresión proteica de IL-1 β incluso después de su administración durante una semana.

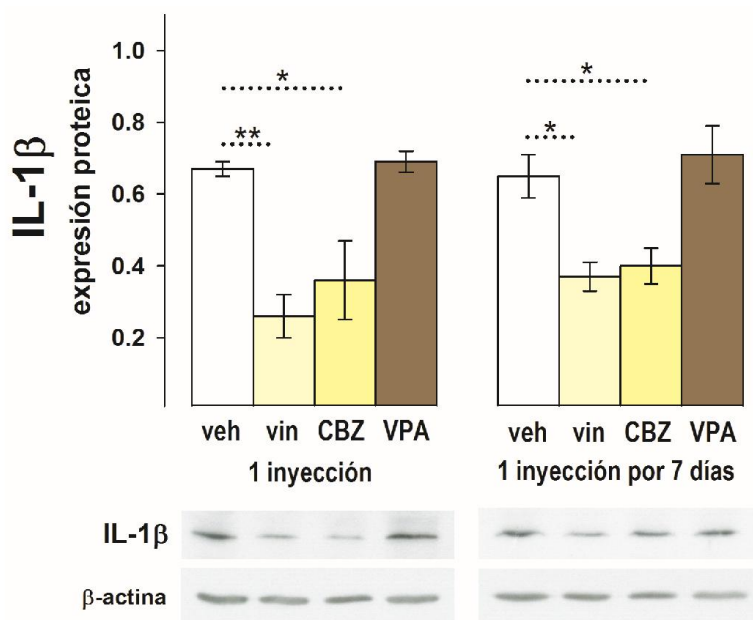


Figura 5. Efectos de los fármacos anticonvulsivos sobre la expresión proteica de IL-1 β . La expresión de IL-1 β se determinó por Western blot en el hipocampo de ratas administradas con una dosis (barras a la izquierda) de vehículo (veh, G9), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G10), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G11) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G12); o con 7 dosis (barras a la derecha) de vehículo (veh, G13), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G14), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G15) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G16). Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 4 animales por grupo. *, $p \leq 0.04$ y **, $p < 0.01$ entre las condiciones experimentales conectadas con líneas punteadas.

7.3 Efecto de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por LPS.

La figura 6 muestra que la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α detectada en el hipocampo de los grupos de animales sacrificados 1 h después de la inoculación de los LPS fue reducida significativamente en los animales pre-administrados con

vinpocetina y carbamazepina, por otro lado, no se modificó en los animales pre-administrados con ácido valproico.

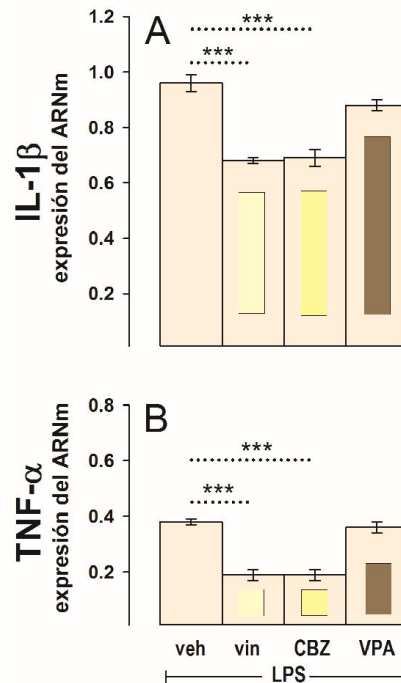


Figura 6. Efecto de los fármacos antiepilépticos sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por LPS en el hipocampo. Expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (A) y TNF- α / β -actina (B) en los grupos inoculados con 100 μ g/kg de LPS y pre-administrados con vehículo (veh, G17), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G18), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G19) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G20). Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 5 (G17) y 4 (G18-G20) animales por grupo. ***, $p < 0.001$ entre las condiciones experimentales conectadas con líneas punteadas.

7.4 Efecto de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por diferentes agentes pro-convulsivos sobre la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α en hipocampo.

Dado que la etiología de algunas epilepsias se ha propuesto que está relacionada con procesos inflamatorios, investigamos el efecto de algunos agentes pro-convulsivos sobre la expresión de IL-1 β y de TNF- α .

Todos los animales inyectados con los agentes pro-convulsivos desarrollaron al menos una convulsión tónico-clónica generalizada. El pentilentetrazol indujo la primera convulsión tónico-clónica a los 1.5 min, mientras que la 4-aminopiridina y la pilocarpina alrededor de los 20 y 30 min, respectivamente. Las convulsiones tónico-clónicas generalizadas duraron alrededor de 1 min en todos los casos, sin embargo el número de convulsiones tónico-clónicas inducidas por cada agente pro-convulsivo fue diferente. En el grupo administrado con 4-aminopiridina, 4 de los 6 animales presentaron una segunda convulsión tónico-clónica, y en el grupo inyectado con pentilentetrazol, sólo uno de los 7 animales presentó una segunda convulsión tónico-clónica. En el grupo administrado con pilocarpina, 3 convulsiones tónico-clónicas adicionales fueron inducidas en todos los animales dentro de los 30 min posteriores a la primera convulsión tónico-clónica generalizada, y solo 2 animales presentaron una quinta convulsión tónico-clónica dentro de ese período de tiempo. Todos los agentes pro-convulsivos indujeron un aumento significativo en la expresión del ARNm de IL-1 β (Figura 7A) y de TNF- α (Figura 7B) en el hipocampo de estos animales.

7.5 Efecto de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre las convulsiones tónico-clónicas y sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por la 4-aminopiridina.

Con el objetivo de investigar la hipótesis de que el efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre la inflamación cerebral está relacionada con su acción sobre los canales iónicos, también evaluamos el efecto de la vinpocetina, carbamazepina

y ácido valproico sobre la expresión de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo de ratas inyectadas con 4-aminopiridina, la cual induce convulsiones generalizadas modificando la permeabilidad de varios canales iónicos pre-sinápticos (Galván y Sitges 2004; Sitges y col. 2011).

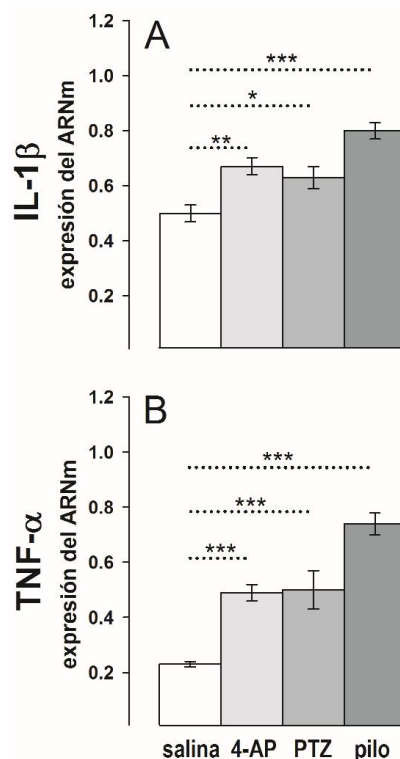


Figura 7. Efecto de los agentes pro-convulsivos sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias en el hipocampo. Expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (A) y TNF- α / β -actina (B) determinada por PCR, 30 min después de la primera convulsión tónico-clónica generalizada en el hipocampo de animales administrados con: 4-aminopiridina 2.5 mg/kg (4-AP, G21), pentilentetrazol 50 mg/kg (PTZ, G22) o pilocarpina 340 mg/kg (pilo, G23). Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 4 (salina), 6 (G21), 7 (G22) y 4 (G23) animales por grupo. *, $p \leq 0.03$; **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$ entre las condiciones experimentales conectadas con líneas punteadas.

En el grupo administrado con 4-aminopiridina, los cambios conductuales tales como piloerección, grooming y wet dog shakes (sacudidas de perro mojado) usualmente preceden a la convulsión tónico-clónica generalizada. La tabla 3 muestra un aumento en la latencia de estos cambios conductuales en los animales pre-inyectados con los fármacos antiepilépticos 90 min antes de la 4-aminopiridina.

En los grupos pre-administrados con vinpocetina y carbamazepina las convulsiones tónico-clónicas generalizadas fueron completamente prevenidas y no todos los animales presentaron wet dog shakes. Por otro lado, en el grupo pre-administrado con ácido valproico la prevención de los cambios conductuales fue menos visible, además de que la 4-aminopiridina todavía indujo un temblor continuo de toda la musculatura del cuerpo.

Tabla 3. Efectos de la vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico sobre las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por la 4-aminopiridina

sustancia administrada	latencia en min a la conducta indicada			primera convulsión tónico-clónica	#
	piloerección	grooming	WDS		
4-aminopiridina	3 ± 0.5	5 ± 0.6	7 ± 0.6	20 ± 2.0	6
vinpocetina + 4-aminopiridina	7 ± 1.1**	16 ± 1.0***	21 ± 1.8***	NO presentó convulsión	4
carbamazepina + 4-aminopiridina	8 ± 1.3***	17 ± 1.3***	26 ± 1.7***	NO presentó convulsión	4
ácido valproico + 4-aminopiridina	3 ± 0.5	8 ± 0.6	16 ± 2.0**	temblor continuo en todo el cuerpo sin extensión de las extremidades traseras	4

WDS, wet dog shakes (sacudidas de perro mojado)

Los animales fueron observados durante 60 min tras la inyección de 4-aminopiridina

Vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico fueron inyectados a dosis de 5, 50 y 50 mg/kg respectivamente

Los fármacos anticonvulsivos fueron pre-administrados 90 min antes de la 4-aminopiridina

Los resultados son el promedio ± el error estándar de la media del número indicado (#) de animales por grupo

** , $P < 0.01$ y *** , $P < 0.001$ entre 4-aminopiridina sola y en combinación con el fármaco indicado

Con el objetivo de investigar si el efecto de los fármacos antiepilépticos sobre las convulsiones inducidas por 4-aminopiridina afectaba el aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α inducido por 4-aminopiridina, el ARNm de dichas citocinas se detectó en el hipocampo de los grupos pre-administrados una vez con salina, vinpocetina, carbamazepina o ácido valproico antes de la 4-aminopiridina.

La figura 8A muestra que la expresión del ARNm de IL-1 β inducida por 4-aminopiridina fue disminuida en todos los grupos pre-administrados con vinpocetina, carbamazepina y ácido valproico. Sin embargo, la disminución

observada en el grupo pre-administrado con ácido valproico fue menos pronunciada. Más aún, en los grupos pre-administrados con vinpocetina y carbamazepina antes de la 4-aminopiridina, la expresión de IL-1 β disminuyó incluso por debajo de las condiciones basales.

La figura 8B muestra que el aumento en la expresión del ARNm de TNF- α inducido por 4-aminopiridina fue solo prevenido significativamente en los grupos pre-administrados con vinpocetina y carbamazepina.

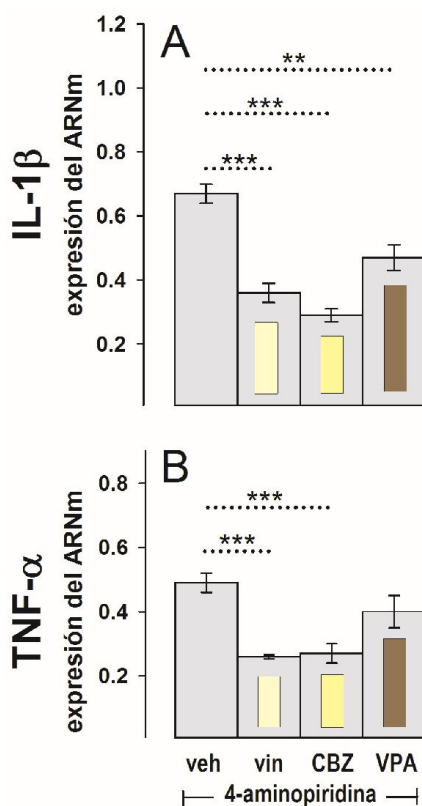


Figura 8. Efecto de los fármacos anticonvulsivos sobre el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α inducido por 4-aminopiridina en el hipocampo. Expresión relativa del ARNm de IL-1 β / β -actina (A) y TNF- α / β -actina (B) en los grupos inyectados con 4-aminopiridina 2.5 mg/kg y pre-administrados con vehículo (veh, G21), vinpocetina 5 mg/kg (vin, G24), carbamazepina 50 mg/kg (CBZ, G25) o ácido valproico 50 mg/kg (VPA, G26). Los resultados son el promedio \pm error estándar de la media de 6 (G21) o 4 (G24 a G26) animales por grupo. *, p = 0,04; **, p < 0.01 y ***, p < 0.001 entre las condiciones experimentales conectadas con líneas punteadas.

8. DISCUSION

El presente estudio muestra que una importante propiedad de algunos fármacos antiepilépticos es su capacidad de ejercer efectos antiinflamatorios cerebrales. Esta conclusión se basa en la disminución de la expresión basal de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α que induce la vinpocetina y la carbamazepina en el hipocampo. Además, apoyando esta conclusión, la vinpocetina y la carbamazepina previenen el aumento en la expresión de dichas citocinas inducido por los LPS. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de IL-1 β y TNF- α porque son las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la activación de la respuesta inflamatoria y debido a que se ha demostrado una relación positiva entre el aumento de dichas citocinas y las convulsiones epilépticas (Dube y col. 2005; Balosso y col. 2013; Vezzani y col. 2013). Sin embargo, otras citocinas también pueden estar involucradas en la epilepsia y en el tratamiento antiepiléptico. Por ejemplo, se ha reportado que IL-2, IL-4 e IL-6 pueden estar desempeñando un papel en la epilepsia (Sinha y col. 2008) y que algunos fármacos antiepilépticos pueden influir en la producción de IL-2 e IL-22 (Himmerich y col. 2013).

Es ampliamente reconocido que la base de los efectos anticonvulsivos de vinpocetina y carbamazepina involucra la inhibición de la permeabilidad de los canales de sodio (Na⁺). De acuerdo con esto, se ha demostrado que la vinpocetina y la carbamazepina inhiben la liberación del ácido glutámico mediada por apertura de los canales de Na⁺ en terminales nerviosas aisladas de cerebro (Sitges y col. 2005; 2006; 2007a; 2011). Además, estos fármacos previenen la actividad epileptiforme inducida por 4-aminopiridina (Sitges y Nekrassov 2004; Nekrassov y Sitges 2008; Sitges y col. 2012), cuyo mecanismo de acción involucra la activación

de varios canales iónicos pre-sinápticos, incluyendo canales de Na⁺ (Galván y Sitges 2004; Sitges y col. 2011). Interesantemente, nuestro estudio sugiere que otro mecanismo de acción de estos dos fármacos anticonvulsivos involucra efectos anti-inflamatorios en el cerebro. Por lo tanto, proponemos una contribución del efecto anti-inflamatorio cerebral de vinpocetina y carbamazepina en su acción anticonvulsiva. Esta idea es apoyada por las observaciones que la inflamación cerebral puede contribuir a la inducción de la epilepsia, como también lo sugieren las propiedades epilépticas de los LPS y la producción de citocinas inducida en el cerebro (Heida y col. 2004). Además, vinpocetina y carbamazepina pueden estar disminuyendo tanto la excitabilidad neuronal como la liberación glial de citocinas proinflamatorias con la concomitante inhibición de la inflamación cerebral *in vivo* mediante su acción sobre la permeabilidad de los canales de Na⁺. En apoyo a esto, el fármaco antiepiléptico fenitoína que también ejerce su efecto anticonvulsivo mediante la inhibición de los canales Na⁺, disminuyó la secreción de IL-1 β y TNF- α en cultivos mixtos de células gliales (Black y col. 2009).

Utilizando el método de normalización del área de superficie corporal para un humano de 60 kg (Reagan-Shaw y col. 2008), los 50 mg/kg de carbamazepina administrada aquí a la rata corresponden a una dosis equivalente de 486 mg en humanos. Esta dosis está alrededor de la dosis promedio de carbamazepina administrada en pacientes epilépticos por día, y fue capaz de disminuir la expresión de los marcadores pro-inflamatorios en el hipocampo de la rata; un resultado que sugiere que a dosis terapéuticamente relevantes, la carbamazepina es capaz de ejercer un efecto anti-inflamatorio en el cerebro. En el

caso de vinpocetina, los 5 mg/kg administrados a la rata corresponden a una dosis equivalente de 48.6 mg en humanos (utilizando el método de normalización del área de superficie corporal para un humano de 60 kg) y hay evidencia de que a esta dosis, la vinpocetina controla las convulsiones en pacientes epilépticos (Dutov y col. 1986). Los 50 mg/kg de ácido valproico administrados aquí a la rata corresponden a una dosis equivalente de 486 mg para un humano de 60 kg, una dosis que está alrededor de la dosis más baja de ácido valproico prescrita a pacientes epilépticos. Dado que en un modelo de isquemia en ratas, el ácido valproico a una dosis equivalente a 2919 mg en humano disminuyó la mieloperoxidasa y la detección de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Suda y col. 2013), la posibilidad de que el fallo del ácido valproico para disminuir la expresión de los marcadores pro-inflamatorios observada aquí en el hipocampo esté relacionado con el uso de una dosis baja, no puede descartarse totalmente. Sin embargo, el ácido valproico administrado en ratas a una dosis alta equivalente en humanos a 2432 mg por 3 días también falló en modificar la expresión de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo (Hsu y col. 2013).

Tomando en cuenta que la vinpocetina es rápidamente eliminada ($t_{1/2}$ =125 min) en la rata (Vereczkey y col. 1979), es muy probable que la disminución similar en la expresión de IL-1 β y TNF- α observada después de una o siete dosis de vinpocetina se debe simplemente a la eliminación diaria de vinpocetina. En contraste, 7 dosis de carbamazepina fueron necesarias para disminuir la expresión de TNF- α , lo que sugiere un efecto aditivo de éste fármaco. De acuerdo con esto, la carbamazepina se encuentra en tejido cerebral de rata alrededor de 15 h después de su

administración intraperitoneal (Graumlich y col. 2000). Blotnik y col. (1996) determinaron que la vida media del ácido valproico en el cerebro de rata es de 14 h tras una administración intravenosa de 20 mg/kg, y encontraron que éste fármaco alcanzó una alta concentración en tejido cerebral incluso después de 10 minutos. Sin embargo, la administración *i.p.* de ácido valproico a una dosis de 50 mg/kg fue incapaz de modificar la expresión de IL-1 β y TNF- α incluso después de dosis repetidas.

La validez del diseño experimental utilizado aquí para desenmascarar el efecto anti-inflamatorio cerebral de los fármacos antiepilépticos es fuertemente apoyada por nuestros datos que muestran que 3 diferentes agentes pro-convulsivos fueron capaces de ejercer un efecto opuesto al de los antiepilépticos, sobre la expresión de los marcadores pro-inflamatorios en el hipocampo. El aumento observado que produce la 4-aminopiridina, el pentilentetrazol y la pilocarpina sobre las citocinas proinflamatorias también apoya la idea de que la inflamación cerebral es un fenómeno frecuente que acompaña a las convulsiones. Además, una relación positiva entre la frecuencia y duración de las convulsiones tónico-clónicas y la severidad de la inflamación cerebral es sugerida por nuestro hallazgo de que el mayor aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias en respuesta a las convulsiones tónico-clónicas generalizadas fue obtenido en el grupo expuesto a pilocarpina, que es el grupo que presentó el mayor número de convulsiones.

Se ha demostrado que la 4-aminopiridina aumenta la permeabilidad de los canales de Na⁺ y Ca²⁺ (Galvan y Sitges 2004; Sitges y col. 2011). En este sentido, la vinpocetina y la carbamazepina, que disminuyen la permeabilidad de los canales presinápticos de Na⁺ y Ca²⁺ (Sitges y col. 2007a; b), fueron más efectivos que el

ácido valproico para inhibir los cambios conductuales que preceden a las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por la 4-aminopiridina. Apoyando nuestra interpretación de que la disminución en la permeabilidad de los canales iónicos reduce tanto la excitabilidad neuronal, como la liberación glial de citocinas proinflamatorias, también la vinpocetina y la carbamazepina fueron más efectivas que el ácido valproico para prevenir el aumento en la expresión de TNF- α e IL-1 β inducido por 4-aminopiridina. Sin embargo, dado que la disminución en la excitabilidad cerebral debida al aumento de la transmisión GABAérgica inducida por el ácido valproico, también se espera que indirectamente disminuya la excitabilidad (con la concomitante disminución en la activación de canales iónicos e inflamación cerebral), en los animales previamente expuestos al ácido valproico, las convulsiones inducidas por 4-aminopiridina fueron menos severas y el aumento en la expresión de IL-1 β inducido por 4-aminopiridina también fue disminuido en comparación con los animales administrados con vehículo y 4-aminopiridina.

Se ha demostrado que la vinpocetina disminuye la liberación de IL-1 β y TNF- α en varios tejidos periféricos mediante la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (Jeon y col. 2010). Además, se conoce que las convulsiones epilépticas aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Fieschi y col. 1980; Marchi y col. 2007; 2009). Por lo tanto, una disminución de las citocinas sistémicas en el grupo administrado con vinpocetina no se puede descartar. Sin embargo, en el hipocampo de los animales que no fueron expuestos a 4-aminopiridina y en el que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica no fue

alterada por las convulsiones, la vinpocetina también disminuyó la expresión de IL-1 β y TNF- α por debajo de los niveles basales.

Finalmente, un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias en muestras de suero y líquido cerebroespinal de pacientes epilépticos ha sido reportado (Sinha y col. 2008). Sin embargo, para caracterizar las acciones selectivas de fármacos antiepilépticos específicos sobre marcadores de inflamación cerebral, los modelos animales experimentales posiblemente sean más adecuados debido a que los pacientes epilépticos generalmente están sujetos a tratamientos con fármacos, y con base en los presentes resultados, las convulsiones y algunos fármacos antiepilépticos pueden modificar la expresión de los marcadores inflamatorios.

9. CONCLUSION GENERAL

Nuestros hallazgos indican que los fármacos antiepilépticos con un mecanismo de acción que involucra una disminución en la permeabilidad de los canales de Na^+ , como la carbamazepina y el nuevo fármaco anticonvulsivo vinpocetina, son altamente efectivos para reducir la elevada excitabilidad cerebral que acompaña a las convulsiones, así como para disminuir una condición inflamatoria cerebral. Su acción en ambos procesos podría hacer a estos fármacos anticonvulsivos altamente eficaces en la supresión o prevención de las crisis epilépticas.

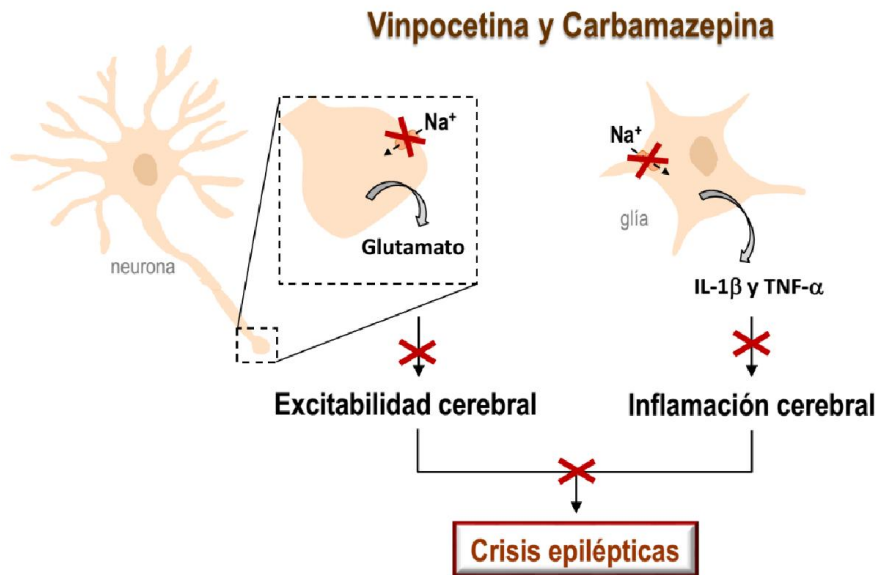


Figura 9. Resumen gráfico.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akassoglou K., Probert L., Kontogeorgos G. and Kollias G. (1997) Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J. Immunol.* **158**, 438e445.
- Allan S.M., Rothwell N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 734–744.
- Aloisi F., Ria F., Adorini L. (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: Different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today* **21**, 141–147.
- Balosso S., Maroso M., Sanchez-Alavez M., Ravizza T., Frasca A., Bartfai T. and Vezzani A. (2008) A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. *Brain* **131**, 3256-3265.
- Balosso S., Ravizza T., Aronica E. and Vezzani A. (2013) The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures. *Exp. Neurol.* **247**, 267-271.
- Balosso S., Ravizza T., Perego C., Peschon J., Campbell I.L., De Simoni M.G. and Vezzani A. (2005) Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann. Neurol.* **57**, 804-812.
- Becher B., Prat A., Antel J.P. (2000) Brain-immune connection: Immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* **29**, 293–304.
- Berg A.T. (2009) Identification of pharmacoresistant epilepsy. *Neurol. Clin.* **27**, 1003-1013.
- Black J. A., Liu S. and Waxman S. G. (2009) Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* **57**, 1072-1081.

- Blotnik S., Bergman F. and Bialer M. (1996) Disposition of valpromide, valproic acid, and valnoctamide in the brain, liver, plasma, and urine of rats. *Drug. Metab. Dispos.* **24**, 560-564.
- Boulanger L.M. (2009) Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* **64**, 93–109.
- Bradford H.F. (1995) Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol* **47**, 477-511.
- Catterall W. A. (1999) Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv. Neurol.* **79**, 441-456.
- Dambach H., Hinkerohe D., Prochnow N., Stienen M. N., Moinfar Z., Haase C. G., Hufnagel A. and Faustmann P. M. (2014) Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia* **55**, 184-192.
- De Simoni M. G., Perego C., Ravizza T., Moneta D., Conti M., Marchesi F., De Luigi A., Garattini S. and Vezzani A. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2623-2633.
- Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* **36**, 174-84.
- Dube C., Vezzani A., Behrens M., Bartfai T. and Baram T. Z. (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann. Neurol.* **57**, 152-155.
- Dutov A. A., Tolpyshev B. A., Petrov A. P. and Gladun V. N. (1986) Use of cavinton in epilepsy. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova* **86**, 850-855.
- Engel D. and Jonas P. (2005) Presynaptic action potential amplification by voltage-

- gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **45**, 405-417.
- Engel J. Jr. (1995) Concepts of epilepsy. *Epilepsia* **36 Suppl 1**, S23-29.
- Fieschi C., Lenzi G. L., Zanette E., Orzi F. and Passero S. (1980) Effects on EEG of the osmotic opening of the blood-brain barrier in rats. *Life Sci.* **27**, 239-243.
- Frank M. G., Barrientos R. M., Thompson B. M., Weber M. D., Watkins L. R. and Maier S. F. (2012) IL-1RA injected intra-cisterna magna confers extended prophylaxis against lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory and sickness responses. *J. Neuroimmunol.* **252**, 33-39.
- French J.A., Kanner A.M., Bautista J. y col. (2004) Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment of refractory epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology* **62**, 1261-1267.
- Galvan E. and Sitges M. (2004) Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na⁺ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes. *Neurochem. Res.* **29**, 347-355.
- Giulian D., Young D.G., Woodward J., Brown D.C. and Lachman L.B. (1988) Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J. Neurosci.* **8**, 709-714.
- Golan H., Levav T., Mendelsohn A. and Huleihel M. (2004) Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb. Cortex* **14**, 97-105.
- Gorter J. A., van Vliet E. A., Aronica E., Breit T., Rauwerda H., Lopes da Silva F. H. and Wadman W. J. (2006) Potential new antiepileptogenic targets indicated by

- microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **26**, 11083-11110.
- Graumlich J. F., McLaughlin R. G., Birkhahn D., Shah N., Burk A., Jobe P. C. and Dailey J. W. (2000) Subcutaneous microdialysis in rats correlates with carbamazepine concentrations in plasma and brain. *Epilepsy Res.* **40**, 25-32.
- Haghikia A., Ladage K., Lafenetre P., Haghiki A., Hinkerohe D., Smikalla D., Haase C. G., Dermietzel R. and Faustmann P. M. (2008) Intracellular application of TNF-alpha impairs cell to cell communication via gap junctions in glioma cells. *J. Neurooncol.* **86**, 143-152.
- Heida J. G., Boisse L. and Pittman Q. J. (2004) Lipopolysaccharide-induced febrile convulsions in the rat: short-term sequelae. *Epilepsia* **45**, 1317-1329.
- Heida J. G., Pittman Q. J. (2005) Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia* **46**, 1906-1913.
- Himmerich H., Bartsch S., Hamer H., Mergl R., Schönherr J., Petersein C., Munzer A., Kirkby K. C., Bauer K. and Sack U. (2013) Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 1751-1759.
- Hsu H. C., Tang N. Y., Liu C. H. and Hsieh C. L. (2013) Antiepileptic Effect of Uncaria rhynchophylla and Rhynchophylline Involved in the Initiation of c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylation of MAPK Signal Pathways in Acute Seizures of Kainic Acid-Treated Rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2013**, 961289.
- Jeon K. I., Xu X., Aizawa T., Lim J. H., Jono H., Kwon D. S., Abe J., Berk B. C., Li J. D. and Yan C. (2010) Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA **107**, 9795-9800.

Krueger J.M., Fang J., Taishi P., Chen Z., Kushikata T. and Gardi J. (1998) Sleep.

A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann. NY Acad. Sci.* **856**, 148-159.

Kwan P., Brodie M.J. (2000) Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J.*

Med. **342**, 314-319

Lasoń W., Chlebicka M., Rejdak K. (2013) Research advances in basic mechanisms

of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol. Rep.* **65**, 787-801.

Letiembre M., Hao W., Liu Y., Walter S., Mihaljevic I., Rivest S., Hartmann T. and

Fassbender K. (2007) Innate immune receptor expression in normal brain aging,

Neuroscience **146**, 248–254.

Löscher W. (2002) Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of

clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* **16**, 669-694.

Löscher W., Puskarjov M. and Kaila K. (2013) Cation-chloride cotransporters

NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* **69**, 62-74.

Marchi N., Angelov L., Masaryk T., Fazio V., Granata T., Hernandez N., Hallene K.,

Diglaw T., Franic L., Najm I. and Janigro D. (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* **48**, 732-742.

Marchi N., Fan Q., Ghosh C., Fazio V., Bertolini F., Betto G., Batra A., Carlton E.,

Najm I., Granata T. and Janigro D. (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* **33**, 171-181.

Maroso M., Balosso S., Ravizza T., Liu J., Aronica E., Iyer A. M., Rossetti C., Molteni

M., Casalgrandi M., Manfredi A. A., Bianchi M. E. and Vezzani A. (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be

- targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* **16**, 413-419.
- Maroso M., Balosso., Ravizza T., Liu J., Bianchi M.E., Vezzani A. (2011) Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: The importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J. Intern. Med.* **270**, 319-326.
- Minami M., Kuraishi Y., Yamaguchi T., Nakai S., Hirai Y. and Satoh M. (1990) Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 832-837.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2004) Vinpocetine inhibits the epileptic cortical activity and auditory alterations induced by pentylentetrazole in the guinea pig in vivo. *Epilepsy Res.* **60**, 63-71.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2006) Additive effects of antiepileptic drugs and pentylentetrazole on hearing. *Neurosci. Lett.* **406**, 276-280.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2008) Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine. *Clin. Neurophysiol.* **119**, 2608-2614.
- Noebels J.L. (1996) Targeting epilepsy genes. *Neuron* **16**, 241-244.
- Panayiotopoulos C.P. (2012) The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. *Epilepsia* **53**, 399-404.
- Pavone A. and Cardile V. (2003) An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia* **44**, 34-39.
- Perucca P., Gilliam F.G. (2012) Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol.* **11**, 792-802.
- Plata-Salaman C. R., Ilyin S. E., Turrin N. P., Gayle D., Flynn M. C., Romanovitch

- A. E., Kelly M. E., Bureau Y., Anisman H. and McIntyre D. C. (2000) Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **75**, 248-258.
- Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A. (1991) Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na⁺ channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Mol. Pharmacol.* **40**, 756-765.
- Ravizza T. and Vezzani A. (2006) Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience* **137**, 301-308.
- Ravizza T., Gagliardi B., Noe F., Boer K., Aronica E. and Vezzani A. (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **29**, 142-160.
- Reagan-Shaw S., Nihal M. and Ahmad N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**, 659-661.
- Reid A. Y., Galic M. A., Teskey G. C., Pittman Q. J. (2009) Febrile seizures: current views and investigations. *Can. J. Neurol. Sci.* **36**, 679-686.
- Rodgers K. M., Hutchinson M. R., Northcutt A., Maier S. F., Watkins L. R. and Barth D. S. (2009) The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain* **132**, 2478–2486.
- Rogawski M.A., Loscher W. (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 553-564.
- Rostene W., Guyon A., Kular L., Godefroy D., Barbieri F., Bajetto A., Banisadr G.,

- Callewaere C., Conductier G., Rovere C., Melik-Parsadaniantz S. and Florio T. (2011) Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. *Front Neuroendocrinol.* **32**, 10–24.
- Rowley N.M., Madsen K.K. and Schousboe A. (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem. Int.* **61**, 546-558.
- Sinclair D. B. (2003) Prednisone therapy in pediatric epilepsy. *Pediatr. Neurol.* **28**, 194-198.
- Sinha S., Patil S. A., Jayalekshmy V. and Satishchandra P. (2008) Do cytokines have any role in epilepsy?. *Epilepsy Res.* **82**, 171-176.
- Sirven J.I., Noe K., Hoerth M., Drazkowski J. (2012) Antiepileptic drugs 2012: recent advances and trends. *Mayo Clin. Proc.* **87**, 879-89.
- Sitges M. and Nekrassov V. (2004) Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG, the auditory brainstem responses and hearing. *Clin. Neurophysiol.* **115**, 2711-2717.
- Sitges M., Aldana B. I., Gomez C. D. and Nekrassov V. (2012) The antidepressant sertraline prevents the behavioral and EEG changes induced in two animal models of seizures. *Epilepsy Behav.* **25**, 511-516.
- Sitges M., Aldana B.I., Chiu L.M., Nekrassov V. (2009) Characterization of phenytoin, carbamazepine, vinpocetine and clorgyline simultaneous effects on sodium channels and catecholamine metabolism in rat striatal nerve endings. *Neurochem. Res.* **34**, 470-479.
- Sitges M., Chiu L. M. and Nekrassov V. (2006) Single and combined effects of carbamazepine and vinpocetine on depolarization-induced changes in Na⁺, Ca²⁺

and glutamate release in hippocampal isolated nerve endings. *Neurochem. Int.* **49**, 55-61.

Sitges M., Chiu L. M., Guarneros A. and Nekrassov V. (2007a) Effects of carbamazepine, phenytoin, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate and vinpocetine on Na⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate in hippocampal nerve endings. *Neuropharmacology* **52**, 598-605.

Sitges M., Galvan E. and Nekrassov V. (2005) Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Neurochem. Int.* **46**, 533-540.

Sitges M., Guarneros A. and Nekrassov V. (2007b) Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca²⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate: comparison with the Na⁺ channel-mediated release. *Neuropharmacology* **53**, 854-862.

Sitges M., Nekrassov V. (1999) Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem. Res.* **24**, 1585-1591.

Sitges M., Sanchez-Tafolla B. M., Chiu L. M., Aldana B. I. and Guarneros A. (2011) Vinpocetine inhibits glutamate release induced by the convulsive agent 4-aminopyridine more potently than several antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* **96**, 257-266.

Stienen M. N., Haghikia A., Dambach H., Thone J., Wiemann M., Gold R., Chan A., Dermietzel R., Faustmann P. M., Hinkerohe D. and Prochnow N. (2011) Anti-inflammatory effects of the anticonvulsant drug levetiracetam on electrophysiological properties of astroglia are mediated via TGFβ1 regulation. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 491-507.

- Suda S., Katsura K., Kanamaru T., Saito M. and Katayama Y. (2013) Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **707**, 26-31.
- Taylor C. P. and Narasimhan L. S. (1997) Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Adv. Pharmacol.* **39**, 47-98.
- Turrin N. P., Gayle D., Ilyin S. E., Flynn M. C., Langhans W., Schwartz G. J. and Plata-Salaman C. R. (2001) Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res. Bull.* **54**, 443-453.
- Vargas C., Tannhauser M., Barros H.M. (1998) Dissimilar effects of lithium and valproic acid on GABA and glutamine concentrations in rat cerebrospinal fluid. *Gen Pharmacol.* **30**, 601-604.
- Vereczkey L., Szentirmay Z. and Szporiny L. (1979) Kinetic metabolism of vinpocetine in the rat. *Arzneimittelforschung* **29**, 953-956.
- Verhelst H., Boon P., Buyse G. Ceulemans B., D'Hooghe M., Meirleir L. D., Hasaerts D., Jansen A., Lagae L., Meurs A., Coster R. V. and Vonck K. (2005) Steroids in intractable childhood epilepsy: clinical experience and review of the literature. *Seizure* **14**, 412-421.
- Vezzani A., Balosso S. and Ravizza T. (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav. Immun.* **22**, 797-803.
- Vezzani A., Conti M., De Luigi A., Ravizza T., Moneta D., Marchesi F. and De Simoni M.G. (1999) Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J. Neurosci.* **19**, 5054-5065.

- Vezzani A., Friedman A. and Dingledine R. J. (2013) The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**, 16-24.
- Vezzani A., Maroso M., Balosso S., Sanchez M.A., Bartfai T. (2011) IL-1 receptor/Toll-like receptor signalling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav. Immun.* **25**, 1281–1289.
- Vezzani A., Moneta D., Conti M., Richichi C., Ravizza T., De Luigi A., De Simoni M.G., Sperk G., Andell-Jonsson S., Lundkvist J., Iverfeldt K. and Bartfai T. (2000) Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11534-11539.
- Vezzani A., Moneta D., Richichi C., Aliprandi M., Burrows S.J., Ravizza T., Perego C. and De Simoni M.G. (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* **43**, Suppl 5, 30-35.
- Vohora D., Saraogi P., Yazdani M.A., Bhowmik M., Khanam R., Pillai K.K. (2010) Recent advances in adjunctive therapy for epilepsy: focus on sodium channel blockers as third-generation antiepileptic drugs. *Drugs Today (Barc)* **46**, 265-277.
- Wickenden A.D., Yu W., Zou A. y col. (2000) Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **58**, 591-600.

ANEXOS

El primer artículo de esta sección corresponde al estudio descrito en este trabajo. El segundo artículo corresponde a otro de los proyectos del Laboratorio de la Dra. Sitges en el que también participe durante el doctorado.

ORIGINAL
ARTICLEThe anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus

Carlos D. Gómez, Rudolf M. Buijs and María Sitges

*Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México***Abstract**

In the present study, the effects of the two classical anti-epileptic drugs, carbamazepine and valproic acid, and the non-classical anti-seizure drug vinpocetine were investigated on the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the hippocampus of rats by PCR or western blot after the administration of one or seven doses. Next, the effects of the anti-seizure drugs were investigated on the rise in cytokine expression induced by lipopolysaccharides (LPS) inoculation *in vivo*. To validate our methods, the changes induced by the pro-convulsive agents 4-aminopyridine, pentylentetrazole and pilocarpine were also tested. Finally, the effect of the anti-seizure drugs on seizures and on the concomitant rise in pro-inflammatory cytokine expression induced by 4-aminopyridine was explored. Results show that vinpocetine and carbamazepine reduced the expression of IL-1 β and TNF- α

from basal conditions, and the increase in both pro-inflammatory cytokines induced by LPS. In contrast, valproic acid failed to reduce both the expression of the cytokines from basal conditions and the rise in IL-1 β and TNF- α expression induced by LPS. Tonic-clonic seizures induced either by 4-aminopyridine, pentylentetrazole or pilocarpine increased the expression of IL-1 β and TNF- α markedly. 4-aminopyridine-induced changes were reduced by all the tested anti-seizure drugs, although valproic acid was less effective. We conclude that the anti-seizure drugs, vinpocetine and carbamazepine, whose mechanisms of action involve a decrease in ion channels permeability, also reduce cerebral inflammation.

Keywords: 4-aminopyridine, Anti-epileptic drugs, brain inflammation, epilepsy, lipopolysaccharides, sodium channels. *J. Neurochem.* (2014) 10.1111/jnc.12784

A role of brain pro-inflammatory cytokines in the generation and maintenance of seizures and in the establishment of chronic epileptic foci is indicated by several studies. For instance, increased levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and other pro-inflammatory cytokines in several animal models of epilepsy, as well as in the serum and cerebrospinal fluid from epileptic patients samples has been found (De Simoni *et al.* 2000; Plata-Salaman *et al.* 2000; Dube *et al.* 2005; Gorter *et al.* 2006; Ravizza and Vezzani 2006; Ravizza *et al.* 2008; Sinha *et al.* 2008; Vezzani *et al.* 2013). Interestingly, in mixed glial cell cultures, the blockage of Na⁺ channels by tetrodotoxin or by the anti-epileptic drug phenytoin, inhibited microglial activation and secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α induced by lipopolysaccharides (LPS) (Black *et al.* 2009). The pharmacological down-modulation of voltage-sensitive Na⁺ channels, which are critical in the

initiation and conduction of brain action potentials, is particularly effective for the control of epileptic seizures (Catterall 1999). Accordingly, anti-epileptic drugs that reduce voltage-sensitive Na⁺ channel permeability are among the most effective in seizure control (Taylor and Narasimhan 1997). Several *in vitro* studies have been devoted to exploring the effects of anti-epileptic drugs on brain cells responsible for inflammatory cascades (Pavone and Cardile

Received April 3, 2014; revised manuscript received May 26, 2014; accepted May 30, 2014.

Address correspondence and reprint requests to María Sitges, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, México D.F., México. E-mail: sitges@biomedicas.unam.mx

Abbreviations used: LPS, lipopolysaccharides; PVDF, polyvinylidene fluoride; TBST, tris-buffered saline tween; TNF, tumor necrosis factor.

2003; Haghikia *et al.* 2008; Black *et al.* 2009; Stienen *et al.* 2011; Dambach *et al.* 2014). Nevertheless, the question of whether anti-seizure drugs are capable of affecting brain inflammation *in vivo* has not been directly addressed.

Vinpocetine (ethyl apovincamine-22-oate) is a neuroprotective drug that inhibits brain pre-synaptic Na⁺ channel-mediated responses more potently and effectively than several anti-epileptic drugs of the first and second generations including carbamazepine (Sitges *et al.* 2005, 2006, 2007a, 2011). In contrast to vinpocetine and carbamazepine, the anti-epileptic valproic acid, whose mechanism of action mainly involves an increase in GABAergic transmission (Löscher 2002), was unable to decrease presynaptic ionic channels permeability in a broad range of concentrations (Sitges *et al.* 2007b). In the guinea pig vinpocetine, like carbamazepine and other classic anti-epileptic drugs inhibited the epileptiform electroencephalographic (EEG) activity pharmacologically induced by different convulsive agents (Nekrassov and Sitges 2004, 2006, 2008; Sitges and Nekrassov 2004). In addition, vinpocetine has been shown to reduce nuclear factor-kappa B-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells, endothelial cells, macrophages and epithelial cells (Jeon *et al.* 2010). Interestingly, to address the unmet medical need for the control of seizures in refractory epileptic patients, anti-inflammatory therapies are starting to be considered as prospective new potential treatments (Sinclair 2003; Verhelst *et al.* 2005; Reid *et al.* 2009; Maroso *et al.* 2010; Löscher *et al.* 2013).

In the present study, to explore whether anti-seizure drugs that differ in their mechanisms of action could affect brain inflammation differently, the effect of the *in vivo* administration of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on the expression of two amply recognized pro-inflammatory markers was investigated in the hippocampus. Because the hippocampus is a highly epileptogenic brain structure in which seizures have shown to increase pro-inflammatory cytokines (De Simoni *et al.* 2000; Plata-Salaman *et al.* 2000; Ravizza *et al.* 2008).

Materials and methods

Drugs

Vinpocetine, carbamazepine and valproic acid were kindly donated by Psicofarma S.A. de C.V. (México). 4-aminopyridine, pilocarpine and lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli*, serotype 0127:B8) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pentylenetetrazole was from MP Biochemicals Inc (Aurora, OH, USA).

The vehicles used to dissolve the anti-seizure drugs were different: vinpocetine was dissolved in saline acidified with HCl and adjusted to pH 4 with NaOH; carbamazepine in dimethylsulfoxide and valproic acid in saline. 4-aminopyridine pentylenetetrazole, pilocarpine and LPS were dissolved in saline. All the drugs were administered *i.p.* at a small volume (1 mL/kg). In the case of carbamazepine, which was dissolved in an organic vehicle, the volume used was smaller (*i.e.* 0.5 mL/kg).

The dose of vinpocetine used of 5 mg/kg was chosen on the basis of our previous experience in the guinea pig showing that at this dose vinpocetine completely prevents the epileptiform EEG activity induced either by pentylenetetrazole or by 4-aminopyridine (Nekrassov and Sitges 2004, 2008; Sitges and Nekrassov 2004). In the case of carbamazepine we used a dose of 50 mg/kg to test its effect on the hippocampal inflammation markers, because in a previous study we found that even at a dose of 25 mg/kg carbamazepine completely prevented the epileptiform EEG activity induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole in the rat (Sitges *et al.* 2012). In the case of valproic acid, we also used a dose of 50 mg/kg because in the guinea pig a lower dose (30 mg/kg) prevented the EEG epileptiform activity induced by pentylenetetrazole in 70% of the animals (Nekrassov and Sitges 2006).

The pro-convulsive agents, 4-aminopyridine and pentylenetetrazole were used at doses that in the rat induce seizures in 100% of the animals (Sitges *et al.* 2012), and the pilocarpine dose was chosen on the basis of previous studies. For instance see Ravizza *et al.* (2008). The dose of LPS used (100 µg/kg inoculated *i.p.*) was selected based on previous studies demonstrating that a single *i.p.* administration of LPS at that dose increases the expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampus (Turrin *et al.* 2001; Frank *et al.* 2012).

Experimental animals

In the present study, 126 male Wistar rats (291 ± 1.1 g initial weight) divided in 26 groups were included. Groups were defined by the substance(s) to be injected (Table S1). To test the effect of drugs on IL-1β and TNF-α mRNA expression in the hippocampus by reverse transcription-PCR 18 animal groups were formed. The other eight groups were used to test the effect of anti-seizure drugs on the expression of the IL-1β protein in the hippocampus by western blot. Animals were housed in a 12 h light–dark cycle in stable conditions of temperature and with access to food and water *ad libitum*. Animals were from the Instituto de Investigaciones Biomédicas Animal House at the Universidad Nacional Autónoma de México, and the Experiments were carried out in compliance with the Guidelines for Animal Experimentation and with the approval of the “Laboratory Animals Care and Use Committee”.

As there was no difference between the IL-1β and TNF-α mRNA expression in animals injected with the vehicles was found, all animals administered with the different vehicles were included in group 1 (veh). The effect of one or several doses of the anti-seizure drugs was tested in the following groups: group 2 that was injected once with vinpocetine at a dose of 5 mg/kg, group 3 injected once with carbamazepine at a dose of 50 mg/kg and group 4 injected once with valproic acid also at a dose of 50 mg/kg. The four groups used to test the effect of the repeated doses of vehicle or anti-seizure drug were: group 5, that was injected daily with the different vehicles for 1 week, and groups 6, 7 and 8, that were administered for 1 week with one daily injection of vinpocetine (5 mg/kg), carbamazepine (50 mg/kg) or valproic acid (50 mg/kg), respectively. The animals of these eight groups were sacrificed by decapitation 90 min after the single or the last injection. This time was chosen on the basis of previous studies showing that the anti-seizure drugs tested here reach an adequate brain concentration around this time (Vereczkey *et al.* 1979; Blotnik *et al.* 1996; Graumlich *et al.* 2000).

The effect of the anti-seizure drugs also was tested on the expression of the IL-1 β protein by western blot. For this purpose eight additional groups were formed; namely, group 9 injected once with saline, group 10 injected once with vinpocetine (5 mg/kg), group 11 injected once with carbamazepine (50 mg/kg) and group 12 with valproic acid (50 mg/kg). Groups 13, 14, 15 and 16 got a daily injection for 1 week of saline, vinpocetine (5 mg/kg), carbamazepine (50 mg/kg) or valproic acid (50 mg/kg), respectively. The animals of these groups were sacrificed by decapitation also 90 min after the single or the last injection.

The effect of 100 μ g/kg LPS on IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the hippocampus was determined by PCR in animals sacrificed 30 min, 1, 3 and 6 h following LPS. As shown in Figure S1, the maximum increase in IL-1 β and TNF- α mRNA expression was found in the group exposed to LPS for 1 h. Thus, the effect of the anti-seizure drugs on the increase in cytokines mRNA expression induced by LPS was tested 1 h following LPS in three additional groups; namely group 18 that was pre-administered with 5 mg/kg vinpocetine 90 min before LPS, and groups 19 and 20 that were pre-administered with 50 mg/kg carbamazepine or 50 mg/kg valproic acid, respectively, 90 min before LPS.

The effect of seizures induced by different pro-convulsive agents on IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the hippocampus also was explored. For this purpose, three groups were formed: group 21 administered with 2.5 mg/kg 4-aminopyridine, group 22 with 50 mg/kg pentylenetetrazole and group 23 with 340 mg/kg pilocarpine. All animals exposed to the pro-convulsive agents were observed for 30 min after the first tonic-clonic seizure, and then they were sacrificed by decapitation. In the 30 min of observation none of the animals died in status epilepticus.

The last three groups were formed to test the effect of the anti-seizure drugs on seizures induced by 2.5 mg/kg 4-aminopyridine. We chose this pro-convulsive drug because its mechanism of action involves changes in voltage sensitive presynaptic Na⁺ channels permeability (Galvan and Sitges 2004). Thus, group 24 was pre-administered with vinpocetine (5 mg/kg) 90 min before 4-aminopyridine, and groups 25 and 26 with carbamazepine (50 mg/kg) or valproic acid (50 mg/kg) 90 min before 4-aminopyridine, respectively. All these animals were observed for 1 h following 4-aminopyridine injection and then sacrificed by decapitation.

Detection of IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the hippocampus by PCR

The brains of the animals submitted to the different experimental conditions were removed and the hippocampus of both hemispheres dissected out. For the total RNA extraction, the dissected hippocampi were placed in sterile tubes containing 1 mL of

TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and frozen at -80°C until used. Total RNA extraction was performed after hippocampus homogenization (15 strokes with a AA Teflon homogenizer, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA samples were suspended in 50 μ L of nuclease-free water.

To determine the amount and purity of total RNA in each sample a nanodrop spectrophotometer (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) was used. The integrity of total RNA was assessed by agarose gel electrophoresis using ethidium bromide staining.

cDNA was obtained by reverse transcription of the total RNA using the kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Life Technologies). For this purpose, a small aliquot containing 2 μ g of RNA suspended in nuclease-free water was mixed with 0.5 μ L Oligo (dT)₂₀ (50 μ M) and 0.5 μ L annealing buffer and brought up to a final volume of 4 μ L with nuclease-free water. This mixture was incubated at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min and then chilled on ice. For reverse transcription, 1 μ L of III/RNaseOUT[™] enzyme mix and 5 μ L of the 2X first-strand reaction mix (10 mM MgCl₂ and 1 mM of each dNTP) were added before incubation at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 50 min. The reaction was stopped by heating the mixture at 85 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The cDNA resulting from this procedure was stored at -20°C until use.

IL-1 β and TNF- α mRNA expression was evaluated by PCR using the kit GoTaq[®] DNA Polymerase. Briefly, 1.5 μ L of cDNA (250 ng/ μ L) were amplified in a mixture containing 2 μ L of 5X green buffer, 0.8 μ L of MgCl₂ (25 mM), 0.25 μ L of PCR nucleotide mix (10 mM), 0.5 μ L of the sense primer (10 pM), 0.5 μ L of the antisense primer (10 pM), 0.05 μ L of DNA Polymerase (5 u/ μ L) and 4.4 μ L of sterile Milli-Q water (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

PCR reactions were done in an Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA). The temperature cycling conditions were: initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 34 cycles, including denaturation at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, primer annealing for 45 s at 58 $^{\circ}\text{C}$ for IL-1 β and β -actin or at 66 $^{\circ}\text{C}$ for TNF- α , and primer extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. A final primer extension was performed at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min after which the samples were immediately cooled at 4 $^{\circ}\text{C}$. The PCR primers used are shown in Table 1.

The amplified amount of pro-inflammatory cytokine mRNA was normalized by the amplified β -actin mRNA. A negative control in the absence of sample was run in parallel.

PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the signal intensity of the resulting bands measured by densitometry using a MiniBIS Pro Gel Documentation System (Bio-America, Miami, FL, USA) and the Image J software developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Results are the relative expression of the pro-inflammatory cytokines mRNA (IL-1 β mRNA/ β -actin mRNA or TNF- α mRNA/ β -actin mRNA ratio).

Table 1 Nucleotide sequence of the sense and antisense primers used for PCR

Target	Sense primer	Antisense primer	Product size	GenBank accession
IL-1 β	CCAGGATGAGGACCCAAGCA	TCCCGACCATTGCTGTTTCC	519 bp	NM_031512.2
TNF- α	AAGCCCGTAGCCACGTCGTA	GCCCGCAATCCAGGCCACTAC	663 bp	NM_012675.3
β -actin	ATCGTGGGCCGCCCTAGGCA	ACGTACATGGCTGGGGTGTG	302 bp	NM_031144.2

Detection of IL-1 β protein expression in the hippocampus by western blot

The dissected hippocampi of groups 9 to 16 were placed in sterile tubes and frozen at -80°C until used. Total protein extraction was performed by hippocampus homogenization (10 strokes with a Thomas Scientific AA Teflon homogenizer) in 1 mL of lysis buffer (25 mM TrisHCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethanesulfonyl-fluoride and 1 μL of the HaltTM Protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The mixture was incubated at 4°C for 1 h and then centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C . The resulting supernatants were collected and stored at -80°C until protein determination by Lowry.

For electrophoresis 50 μg of total protein were loaded per line and separated on a 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide electrophoresis gel at 100 V for 90 min. Separated proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) microporous membranes at 200 mA for 60 min using an electro-blotting system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The blots were stained (Ponseau S from Sigma-Aldrich) to confirm equal protein loading, and unstained with Tris-buffered saline Tween (TBST, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Non-specific binding to PVDF membranes was blocked by 5% Blotto non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) in TBST for 1 h at 24°C . Membranes were then incubated 20 h at 4°C with a rabbit anti-IL-1 β polyclonal antibody (catalog number SC-7884, 31 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1 : 500 in 5% non-fat dry milk in TBST. After washing three times with TBST for 15 min, membranes were incubated with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (goat anti-rabbit polyclonal antibody from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) diluted 1 : 1000 in 5% non-fat dry milk in TBST for 1 h.

β -Actin was used as loading control. To detect β -actin expression, the PVDF membranes were stripped (using a buffer containing 1.5% glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 1% Tween 20, pH 2.2) and re-probed with mouse anti- β -actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1 : 5000 in 5% non-fat dry milk in TBST for 1 h at 24°C . Then membranes were washed three times with TBST for 15 min before incubation with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (goat anti-mouse polyclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1 : 10 000 in 5% non-fat dry milk in TBST for 1 h.

Proteins were visualized in Biomax light films (Sigma-Aldrich) using the ImmobilonTM Western Chemiluminiscent horseradish peroxidase substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Band intensities were measured by densitometry also using the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To adjust for possible loading errors, IL-1 β band intensities were normalized against the β -actin band intensities, obtained in the corresponding lanes.

Statistical analysis

One-way ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test was used for the statistical evaluations. Statistical analyses were performed with SigmaPlot version 11.0 (Systat Software, Erkrath, Germany). The criterion for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Acute and chronic effects of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the hippocampus

The effect of the anti-seizure drugs injected once or daily for 1 week on IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the hippocampus is shown in Fig. 1. The upper part of this figure shows a similar decrease in IL-1 β mRNA expression after one or after several doses. For instance, IL-1 β expression in animals administered once or for 7 days with vehicles was lowered by the single dose of vinpocetine (G2) or carbamazepine (G3), as well as by the repeated doses of vinpocetine (G6) and carbamazepine (G7). In contrast, valproic acid failed to modify IL-1 β mRNA expression from basal conditions after single (G4) or repeated doses (G8).

The lower part of Fig. 1 shows that also in the case of TNF- α messenger expression the anti-seizure drugs induced very similar decrease after 1 or 7 doses, except that repeated

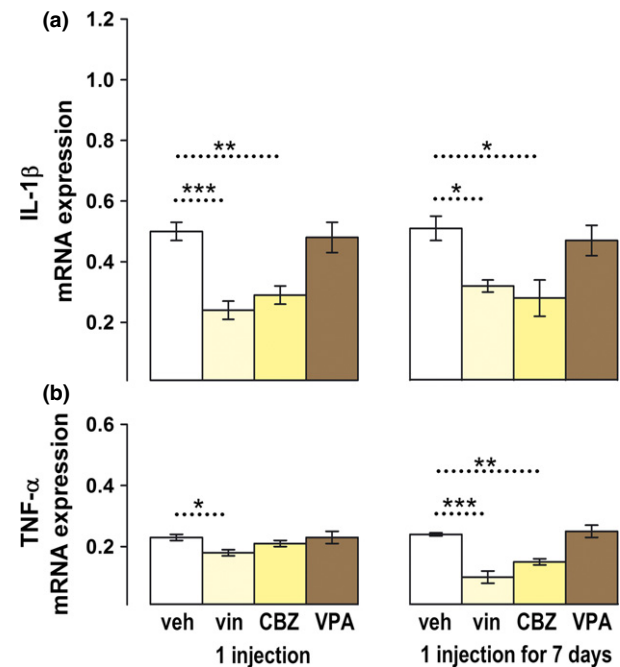


Fig. 1 Effect of the anti-seizure drugs on pro-inflammatory cytokine mRNA expression in the rat hippocampus. Relative IL-1 β / β -actin (a) and tumor necrosis factor (TNF)- α / β -actin (b) mRNA expression measured by PCR in the hippocampi of animals administered with one dose (left bars) of vehicle (veh, G1), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G2), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G3) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G4), and with seven doses (right bars) of vehicle (veh, G5), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G6), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G7) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G8). Results are the mean \pm SEM values of 12 (G1), 4 (G2 to G4), 6 (G5) or 3 (G6 to G8) animals per group. * $p \leq 0.04$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ between the dashed line connecting experimental conditions.

injections of carbamazepine were necessary to decrease TNF- α significantly.

A representative experiment showing bands of IL-1 β , TNF- α and β -actin mRNA expression from animals injected with one (left gels) or seven doses of the anti-seizure drugs (right gels) is shown in Figure S2.

As shown in Figure S3 the vehicles used to dissolve the drugs tested did not modify the hippocampal mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines. Therefore, all animals treated with the different drugs were compared against a general control that is referred to as 'vehicle' in the figures for simplicity. Although it is worthy to mention that the same statistic significance between groups injected with a drug and its respective vehicle was found.

Acute and chronic effects of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on the expression of IL-1 β protein in the hippocampus

In order to investigate whether the potential anti-inflammatory effect of vinpocetine and carbamazepine at the doses tested also affected IL-1 β protein levels in the hippocampus, the same treatment was used and IL-1 β was detected by western blot. Fig. 2 shows that in animals injected once with vinpocetine (G10) or with carbamazepine (G11) the expression of IL-1 β protein was below baseline values. In the groups injected with seven vinpocetine (G14) and

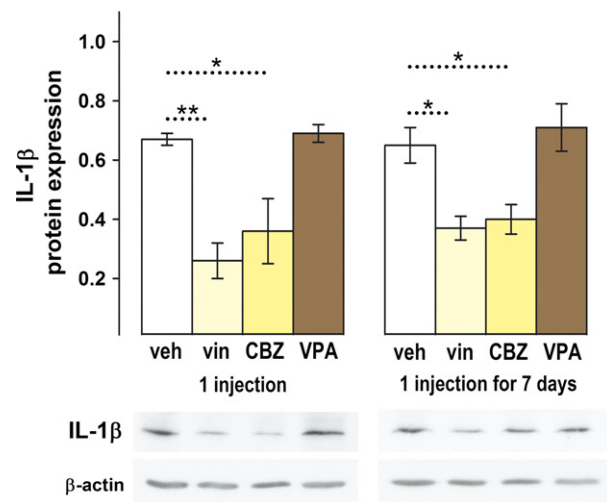


Fig. 2 Anti-seizure drugs effects on IL-1 β protein expression. The expression of IL-1 β was measured by western blot in the hippocampi of rats administered with one dose (left bars) of vehicle (veh, G9), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G10), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G11) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G12); and with seven doses (right bars) of vehicle (veh, G13), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G14), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G15) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G16). Results are the mean \pm SEM values of four animals per group. * $p \leq 0.04$ and ** $p < 0.01$ between the dashed line linking experimental conditions.

carbamazepine (G15) doses the expression of IL-1 β protein also was lower than in the group injected with seven doses of vehicle (G13).

Effect of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on LPS-induced increase in IL-1 β and TNF- α mRNA expression

Figure 3 shows that the IL-1 β and TNF- α mRNA expression detected in the hippocampus of the group of animals sacrificed 1 h following LPS (G17) was significantly reduced in the animals pre-administered with vinpocetine (G18) and carbamazepine (G19) before LPS, and unchanged in the group pre-administered with valproic acid before LPS (G20).

Tonic-clonic seizures and IL-1 β and TNF- α mRNA expression changes induced by different pro-convulsive agents in the hippocampus

Animal groups injected with 4-aminopyridine (G21), pentylenetetrazole (G22) or pilocarpine (G23), all developed at

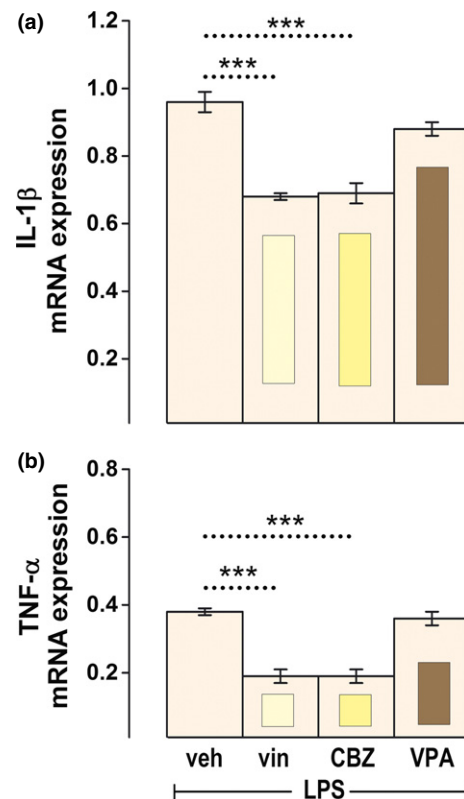


Fig. 3 Effect of the anti-seizure drugs on the increase in IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression induced by lipopolysaccharides (LPS) in the hippocampus. Relative IL-1 β / β -actin (a) and TNF- α / β -actin (b) mRNA expression in the groups inoculated with 100 μ g/kg LPS and pre-administered with vehicle (veh, G17), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G18), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G19) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G20). Results are the mean \pm SEM values of 5 (G17) and 4 (G18 to G20) animals per group. *** $p < 0.001$ between the experimental conditions linked with the dashed line.

least one generalized tonic-clonic seizure. Pentylentetrazole induced the first tonic-clonic seizure with a latency of 1.5 ± 0.2 min, and 4-aminopyridine and pilocarpine with latencies of around 20 and 30 min, respectively. The generalized tonic-clonic seizures lasted around 1 min in all cases, but the number of generalized tonic-clonic seizures induced by each pro-convulsive agent within the 30 min following the first generalized seizure varied. In G21, 4 of the 6 animals administered with 4-aminopyridine presented a second tonic-clonic seizure, and in the G22 only one of the 7 animals injected with pentylentetrazole presented a second tonic-clonic seizure. In the group administered with pilocarpine (G23), 3 additional tonic-clonic seizures were induced in all the animals within the 30 min following the first generalized tonic-clonic seizure, and 2 animals even presented a fifth tonic-clonic seizure within that time period. All pro-convulsive agents, 4-aminopyridine, pentylentetrazole and pilocarpine, induced a significant increase in both IL-1 β (Fig. 4a) and TNF- α mRNA expression (Fig. 4b) in the hippocampus of these animals.

Effect of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on tonic-clonic seizures and on the increase in IL-1 β and TNF- α mRNA expression induced by 4-aminopyridine

To further test our hypothesis that the effect of the anti-seizure drugs on brain inflammation is linked to their action on ion channels, we also tested the effect of the anti-seizure drugs on the expression of the pro-inflammatory cytokines in the hippocampi of rats exposed to 4-aminopyridine, which induces seizures modifying the permeability of several presynaptic ionic channels (Galvan and Sitges 2004; Sitges *et al.* 2011). In the group administered with 4-aminopyridine, behavioral changes such as piloerection, grooming and wet dog shakes usually preceded the generalized tonic-clonic seizures with limb extensions. Table 2 shows that in the animals pre-injected with the anti-seizure drugs 90 min before 4-aminopyridine, the latency of these behavioral changes was increased. In the groups pre-administered with vinpocetine and carbamazepine the generalized tonic-clonic seizures were completely prevented and not all the animals presented wet dog shakes. In the group pre-administered with valproic acid, prevention of the behavioral changes was less conspicuous and 4-aminopyridine still induced a continuous tremor of the whole body musculature.

To test whether the effect of anti-convulsive drugs on 4-aminopyridine-induced seizures was reflected in the increase in IL-1 β and TNF- α mRNA expression induced by 4-aminopyridine, the expression of these messengers in the hippocampus of the groups pre-administered once with saline, vinpocetine, carbamazepine or valproic acid before 4-aminopyridine was determined.

Figure 5a shows that the expression of IL-1 β mRNA observed in G21, that was the group administered with the pro-convulsive agent 4-aminopyridine, was decreased in all

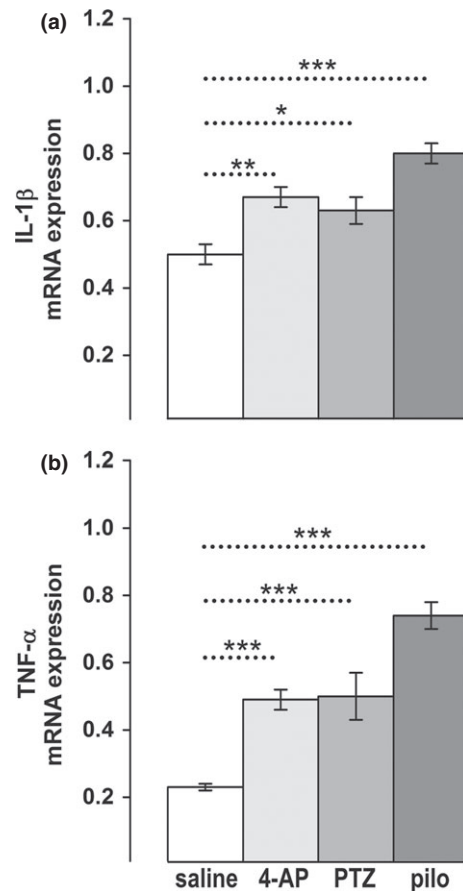


Fig. 4 Effect of pro-convulsive agents on the pro-inflammatory cytokines expression in the hippocampus. Relative IL-1 β / β -actin (a) and tumor necrosis factor (TNF)- α / β -actin (b) mRNA expression measured by PCR 30 min following the first generalized tonic-clonic seizure in the hippocampi of animals administered with: saline, 2.5 mg/kg 4-aminopyridine (4-AP, G21), 50 mg/kg pentylentetrazole (PTZ, G22) or 340 mg/kg pilocarpine (pilo, G23). Results are the mean \pm SEM values of 4 (saline), 6 (G21), 7 (G22) and 4 (G23) animals per group. * $p \leq 0.03$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ between the dashed lines connecting experimental conditions.

the groups pre-administered with the anti-seizure drugs; namely, the vinpocetine (G24), the carbamazepine (G25) and the valproic acid (G26) groups. The decrease observed in the group pre-administered with valproic acid was, however, less pronounced. Moreover, in groups pre-administered with vinpocetine and carbamazepine before 4-aminopyridine the expression of IL-1 β was drawn even below basal conditions. The expression of IL-1 β in the control group injected only with vehicle (G1) was 0.50 ± 0.03 , in the group injected with vinpocetine before 4-aminopyridine (G24) 0.36 ± 0.03 ; and in the group injected with carbamazepine before 4-aminopyridine (G25) 0.29 ± 0.02 . The statistical difference between G1 and G24 was $p = 0.04$, and between G1 and G25 was $p < 0.001$.

Table 2 Effect of vinpocetine, carbamazepine and valproic acid on tonic-clonic seizures induced by 4-aminopyridine

Administered substances	Latency in min to the indicated behavior				#
	Piloerection	Grooming	WDS	First tonic-clonic seizure	
4-aminopyridine	3 ± 0.5	5 ± 0.6	7 ± 0.6	20 ± 2.0	6
vinpocetine + 4-aminopyridine	7 ± 1.1**	16 ± 1.0***	21 ± 1.8***	NO tonic-clonic seizures	4
carbamazepine + 4-aminopyridine	8 ± 1.3***	17 ± 1.3***	26 ± 1.7***	NO tonic-clonic seizures	4
valproic acid + 4-aminopyridine	3 ± 0.5	8 ± 0.6	16 ± 2.0**	continuous whole body tremor without hindlimb extensions	4

WDS, wet dog shakes.

Animals were observed for 60 min following 4-aminopyridine administration.

Vinpocetine, carbamazepine and valproic acid were injected at a dose of 5, 50 and 50 mg/kg, respectively.

The anti-seizure drugs were pre-administered 90 min before 4-aminopyridine.

Results are the mean ± SEM values of the indicated number (#) of animals per group.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between 4-aminopyridine alone and in combination with the indicated drug.

Figure 5b shows that the rise in TNF- α mRNA expression induced by 4-aminopyridine was only significantly prevented in G24 and G25, namely the groups pre-administered with vinpocetine and carbamazepine.

Discussion

The present study shows that an important property of some anti-seizure drugs is their capacity to exert cerebral anti-inflammatory effects. This conclusion is based on the decreased expression of the inflammation markers IL-1 β and TNF- α under basal conditions exerted by vinpocetine and carbamazepine in the hippocampus. The sensitivity of the rise in the pro-inflammatory cytokines induced by LPS to vinpocetine and carbamazepine also supports this conclusion. In the present study, we focused on IL-1 β and TNF- α because they are the main pro-inflammatory cytokines involved in triggering inflammatory responses, and because of the positive relationship between the increase in these particular cytokines and seizures (Dube *et al.* 2005; Balosso *et al.* 2013; Vezzani *et al.* 2013). However, other cytokines may also play a role in epilepsy and anti-epileptic treatment. For instance, IL-2, IL-4 and IL-6 have been shown to play a role in epilepsy too (Sinha *et al.* 2008); and anti-epileptic agents have been reported to influence IL-2 and IL-22 production (Himmerich *et al.* 2013).

It is amply recognized that the basis of the anti-seizure effects of vinpocetine and carbamazepine involves inhibition of Na⁺ channel permeability. Accordingly, vinpocetine and carbamazepine have been shown to inhibit Na⁺ channel-mediated Glu release in cerebral isolated nerve endings (Sitges *et al.* 2005, 2006, 2007a, 2011). In addition, they effectively prevented the EEG epileptiform activity induced by 4-aminopyridine (Sitges and Nekrassov 2004; Nekrassov and Sitges 2008; Sitges *et al.* 2012), which importantly involves several presynaptic ionic channels, including Na⁺ channels (Galvan and Sitges 2004; Sitges *et al.* 2011). Remarkably, our present study suggests that another

mechanism of action of these two anti-seizure drugs involves brain anti-inflammatory effects. Thus, we would like to propose a contribution of the cerebral anti-inflammatory effect of vinpocetine and carbamazepine in their anti-seizure action. This idea is supported by observations that brain inflammation may contribute to the induction of epilepsy, as is also suggested by the epileptic properties of LPS and the induced cytokine production in the brain (Heida *et al.* 2004). Moreover, vinpocetine and carbamazepine might be reducing both neuronal excitability and glial pro-inflammatory cytokine release with the concomitant inhibition of brain inflammation *in vivo* via their action on Na⁺ channels permeability. Because in glial cell cultures the anti-epileptic phenytoin that also exerts its anti-seizure effect by inhibiting Na⁺ channels was shown to reduce IL-1 β and TNF- α secretion (Black *et al.* 2009).

Using the body surface area normalization method for a 60 kg human (Reagan-Shaw *et al.* 2008), the 50 mg/kg of carbamazepine administered here to the rat correspond to a human equivalent dose of 486 mg. This dose is around the average carbamazepine dose given to epileptic patients in a day, and was able to reduce the expression of the pro-inflammatory markers in the rat hippocampus: a result suggesting that at therapy-relevant doses carbamazepine is capable of exerting anti-inflammatory effects in the brain. In the case of vinpocetine, the 5 mg/kg administered here to the rat would correspond to a human equivalent dose of 48.6 mg (using the body surface area normalization method for a 60 kg human), and there is evidence that at this dose vinpocetine controls seizures in epileptic patients (Dutov *et al.* 1986). The 50 mg/kg of valproic acid given to the rat here would correspond to a human equivalent dose of 486 mg for a 60 kg human; a dose that is around the lower dose of valproic acid given to epileptic patients. In a rat model of ischemia, valproic acid at a human equivalent dose of 2919 mg was found to reduce myeloperoxidase and ionized calcium binding adapter molecule 1 staining (Suda *et al.* 2013), the possibility that the failure of valproic acid to reduce the expression of the

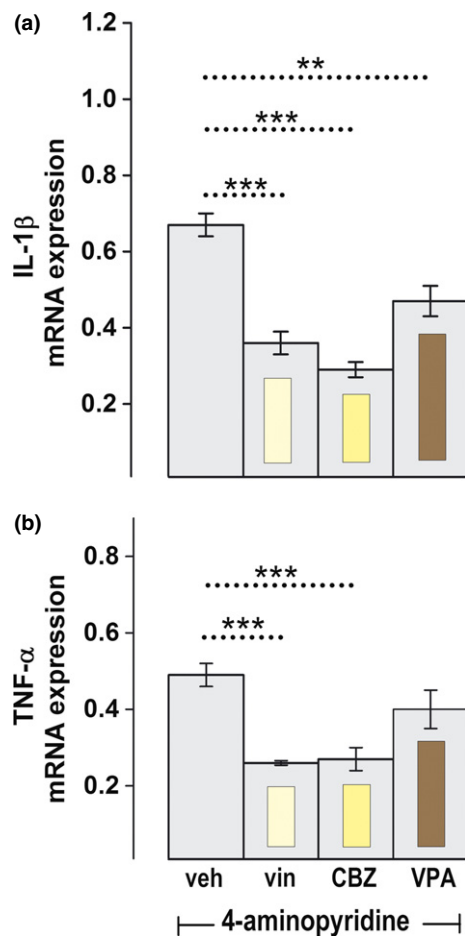


Fig. 5 Effect of the anti-seizure drugs on the increase in IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression induced by 4-aminopyridine in the hippocampus. Relative IL-1 β / β -actin (a) and TNF- α / β -actin (b) mRNA expression in the groups injected with 2.5 mg/kg 4-aminopyridine and pre-administered with vehicle (veh, G21), 5 mg/kg vinpocetine (vin, G24), 50 mg/kg carbamazepine (CBZ, G25) or 50 mg/kg valproic acid (VPA, G26). Results are the mean \pm SEM values of 6 (G21) or 4 (G24 to G26) animals per group. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 between the dashed lines connecting experimental conditions.

pro-inflammatory markers observed here in the hippocampus was related to the use of a low dose cannot be completely discarded. However, valproic acid administered to rats at a high human equivalent dose (2432 mg) for 3 days also failed to modify the expression of IL-1 β and TNF- α in the hippocampus (Hsu *et al.* 2013).

Taking into account that vinpocetine is rapidly eliminated (125 min half-life) in the rat (Vereczkey *et al.* 1979), it is very likely that the similar decrease in IL-1 β and TNF- α expression observed after the single and repeated vinpocetine doses was simply due to the daily vinpocetine clearance. In contrast, seven doses of carbamazepine were needed to decrease TNF- α expression, suggesting an additive effect of

this drug. Consistent with this, carbamazepine is still found in rat brain tissue around 15 h after its i.p. administration (Graumlich *et al.* 2000). Blotnik *et al.* (1996) determined a 14 h half-life for valproic acid in the rat brain following an intravenous administration of 20 mg/kg, and found that this drug reaches a high concentration in the rat brain tissue already after 10 min. However, the i.p. administration of 50 mg/kg valproic acid was unable to modify IL-1 β and TNF- α expression even after repeated doses.

The validity of the experimental design used here to unmask the cerebral anti-inflammatory effect of the anti-seizure drugs is strongly supported by our data showing that three different pro-convulsive agents were capable of exerting the opposite effect on the hippocampal expression of the pro-inflammatory markers. The observed increase produced by 4-aminopyridine, pentylenetetrazole and pilocarpine on pro-inflammatory cytokines also supports the idea that cerebral inflammation is a frequent phenomenon accompanying seizures. In addition, a positive relationship between the frequency and duration of tonic-clonic seizures and the severity of brain inflammation is suggested by our finding that the largest rise in pro-inflammatory cytokine expression in response to generalized tonic-clonic seizures was obtained in the group exposed to pilocarpine, the group that suffered the largest number of seizures.

4-aminopyridine was shown to increase Na⁺ and Ca²⁺ channel permeability (Galvan and Sitges 2004; Sitges *et al.* 2011). Vinpocetine and carbamazepine, which decrease presynaptic Na⁺ and Ca²⁺ channel permeability (Sitges *et al.* 2007a,b), were more effective than valproic acid in inhibiting the behavioral changes that precede the generalized tonic-clonic seizures induced by 4-aminopyridine. Supporting our interpretation that the decrease in ionic channel permeability reduces both neuronal excitability and glial pro-inflammatory cytokine release, vinpocetine and carbamazepine were also more effective than valproic acid in preventing the increase in TNF- α and IL-1 β expression induced by 4-aminopyridine. However, as the decrease in brain excitability due to the rise in GABAergic transmission induced by valproic acid is also expected to indirectly reduce excitability (with the concomitant activation of cerebral ion channels and brain inflammation), in the animals pre-exposed to valproic acid, seizures induced by 4-aminopyridine were less severe and the increase in IL-1 β expression induced by 4-aminopyridine was reduced.

Vinpocetine is known to decrease TNF- α and IL-1 β in several peripheral tissues by inhibiting nuclear factor-kappa B activity (Jeon *et al.* 2010). Seizures have been shown to increase blood-brain barrier permeability (Fieschi *et al.* 1980; Marchi *et al.* 2007, 2009). Therefore, a certain contribution of systemic cytokines in the group administered with vinpocetine cannot be discarded. However, in the hippocampus of animals that were not exposed to 4-aminopyridine and in which blood-brain barrier permeability was undisturbed by seizures, vinpocetine also decreased IL-1 β and TNF- α expression from basal conditions.

Finally, increased levels of pro-inflammatory cytokines in serum and cerebrospinal fluid samples from epileptic patients have been reported (Sinha *et al.* 2008). Although to characterize selective actions of specific anti-seizure drugs on brain inflammation markers, experimental animal models are likely to be more suitable. Because epileptic patients are usually medicated, and on the basis of present findings, seizures and some anti-epileptic drugs can both change the inflammatory markers expression.

Conclusion

In summary, the present results indicate that anti-seizure drugs with a mechanism of action that involves a decrease in Na⁺ channels permeability, like carbamazepine and the new anti-seizure drug vinpocetine, are highly effective in reducing the increased brain excitability accompanying seizures as well as in reducing cerebral inflammatory condition. Their action on both processes might make these anti-seizure drugs highly effective in suppressing or preventing epileptic seizures.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

The authors thank Araceli Guarneros, Luz María Chiu, and Mari-Carmen Basualdo for their excellent technical assistance, and Dr Robyn Hudson for kindly revising the text and her pertinent corrections. This study was partially supported by project IN200614 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México and by Psicofarma S.A. de C.V. Carlos Daniel Gómez was a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1. Experimental animal groups.

Figure S1. IL-1 β and TNF- α mRNA expression following lipopolysaccharide (LPS) *i.p.* inoculation.

Figure S2. Representative experiment showing bands of IL-1 β and TNF- α mRNA expression from animals injected with one (left gels) or seven doses (right gels) of the indicated anti-seizure drug.

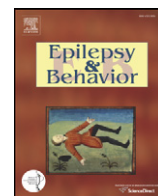
Figure S3. IL-1 β and TNF- α messenger expression in the hippocampus of animals preinjected with the vehicles used to dissolve the different drugs.

References

Balosso S., Ravizza T., Aronica E. and Vezzani A. (2013) The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures. *Exp. Neurol.* **247**, 267–271.

- Black J. A., Liu S. and Waxman S. G. (2009) Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* **57**, 1072–1081.
- Blotnik S., Bergman F. and Bialer M. (1996) Disposition of valpromide, valproic acid, and valnoctamide in the brain, liver, plasma, and urine of rats. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 560–564.
- Catterall W. A. (1999) Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv. Neurol.* **79**, 441–456.
- Dambach H., Hinkerohe D., Prochnow N., Stienen M. N., Moifang Z., Haase C. G., Hufnagel A. and Faustmann P. M. (2014) Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia* **55**, 184–192.
- De Simoni M. G., Perego C., Ravizza T., Moneta D., Conti M., Marchesi F., De Luigi A., Garattini S. and Vezzani A. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2623–2633.
- Dube C., Vezzani A., Behrens M., Bartfai T. and Baram T. Z. (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann. Neurol.* **57**, 152–155.
- Dutov A. A., Tolpyshev B. A., Petrov A. P. and Gladun V. N. (1986) Use of cavinton in epilepsy. *Zh. Nevropatol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova* **86**, 850–855.
- Fieschi C., Lenzi G. L., Zanette E., Orzi F. and Passero S. (1980) Effects on EEG of the osmotic opening of the blood-brain barrier in rats. *Life Sci.* **27**, 239–243.
- Frank M. G., Barrientos R. M., Thompson B. M., Weber M. D., Watkins L. R. and Maier S. F. (2012) IL-1RA injected intra-cisterna magna confers extended prophylaxis against lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory and sickness responses. *J. Neuroimmunol.* **252**, 33–39.
- Galvan E. and Sitges M. (2004) Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na⁺ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes. *Neurochem. Res.* **29**, 347–355.
- Gorter J. A., van Vliet E. A., Aronica E., Breit T., Rauwerda H., Lopes da Silva F. H. and Wadman W. J. (2006) Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **26**, 11083–11110.
- Graumlich J. F., McLaughlin R. G., Birkhahn D., Shah N., Burk A., Jobe P. C. and Dailey J. W. (2000) Subcutaneous microdialysis in rats correlates with carbamazepine concentrations in plasma and brain. *Epilepsy Res.* **40**, 25–32.
- Haghikia A., Ladage K., Lafenetre P., Haghikia A., Hinkerohe D., Smikalla D., Haase C. G., Dermietzel R. and Faustmann P. M. (2008) Intracellular application of TNF-alpha impairs cell to cell communication via gap junctions in glioma cells. *J. Neurooncol.* **86**, 143–152.
- Heida J. G., Boisse L. and Pittman Q. J. (2004) Lipopolysaccharide-induced febrile convulsions in the rat: short-term sequelae. *Epilepsia* **45**, 1317–1329.
- Himmerich H., Bartsch S., Hamer H., Mergl R., Schönherr J., Petersein C., Munzer A., Kirkby K. C., Bauer K. and Sack U. (2013) Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 1751–1759.
- Hsu H. C., Tang N. Y., Liu C. H. and Hsieh C. L. (2013) Antiepileptic effect of uncaria rhynchophylla and rhynchophylline involved in the initiation of c-jun n-terminal kinase phosphorylation of MAPK signal pathways in acute seizures of kainic acid-treated rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, 961289.
- Jeon K. I., Xu X., Aizawa T., Lim J. H., Jono H., Kwon D. S., Abe J., Berk B. C., Li J. D. and Yan C. (2010) Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 9795–9800.
- Löscher W. (2002) Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* **16**, 669–694.

- Löscher W., Puskarjov M. and Kaila K. (2013) Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* **69**, 62–74.
- Marchi N., Angelov L., Masaryk T. *et al.* (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* **48**, 732–742.
- Marchi N., Fan Q., Ghosh C. *et al.* (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* **33**, 171–181.
- Maroso M., Balosso S., Ravizza T. *et al.* (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* **16**, 413–419.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2004) Vinpocetine inhibits the epileptic cortical activity and auditory alterations induced by pentylenetetrazole in the guinea pig *in vivo*. *Epilepsy Res.* **60**, 63–71.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2006) Additive effects of antiepileptic drugs and pentylenetetrazole on hearing. *Neurosci. Lett.* **406**, 276–280.
- Nekrassov V. and Sitges M. (2008) Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine. *Clin. Neurophysiol.* **119**, 2608–2614.
- Pavone A. and Cardile V. (2003) An *in vitro* study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia* **44**, 34–39.
- Plata-Salaman C. R., Ilyin S. E., Turrin N. P., Gayle D., Flynn M. C., Romanovitch A. E., Kelly M. E., Bureau Y., Anisman H. and McIntyre D. C. (2000) Kindling modulates the IL-1 β system, TNF- α , TGF- β 1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **75**, 248–258.
- Ravizza T. and Vezzani A. (2006) Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience* **137**, 301–308.
- Ravizza T., Gagliardi B., Noe F., Boer K., Aronica E. and Vezzani A. (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **29**, 142–160.
- Reagan-Shaw S., Nihal M. and Ahmad N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**, 659–661.
- Reid A. Y., Galic M. A., Teskey G. C. and Pittman Q. J. (2009) Febrile seizures: current views and investigations. *Can. J. Neurol. Sci.* **36**, 679–686.
- Sinclair D. B. (2003) Prednisone therapy in pediatric epilepsy. *Pediatr. Neurol.* **28**, 194–198.
- Sinha S., Patil S. A., Jayalekshmy V. and Satishchandra P. (2008) Do cytokines have any role in epilepsy? *Epilepsy Res.* **82**, 171–176.
- Sitges M. and Nekrassov V. (2004) Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG, the auditory brainstem responses and hearing. *Clin. Neurophysiol.* **115**, 2711–2717.
- Sitges M., Galvan E. and Nekrassov V. (2005) Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Neurochem. Int.* **46**, 533–540.
- Sitges M., Chiu L. M. and Nekrassov V. (2006) Single and combined effects of carbamazepine and vinpocetine on depolarization-induced changes in Na⁺, Ca²⁺ and glutamate release in hippocampal isolated nerve endings. *Neurochem. Int.* **49**, 55–61.
- Sitges M., Chiu L. M., Guarneros A. and Nekrassov V. (2007a) Effects of carbamazepine, phenytoin, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate and vinpocetine on Na⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate in hippocampal nerve endings. *Neuropharmacology* **52**, 598–605.
- Sitges M., Guarneros A. and Nekrassov V. (2007b) Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca²⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate: comparison with the Na⁺ channel-mediated release. *Neuropharmacology* **53**, 854–862.
- Sitges M., Sanchez-Tafolla B. M., Chiu L. M., Aldana B. I. and Guarneros A. (2011) Vinpocetine inhibits glutamate release induced by the convulsive agent 4-aminopyridine more potently than several antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* **96**, 257–266.
- Sitges M., Aldana B. I., Gomez C. D. and Nekrassov V. (2012) The antidepressant sertraline prevents the behavioral and EEG changes induced in two animal models of seizures. *Epilepsy Behav.* **25**, 511–516.
- Stienen M. N., Haghikia A., Dambach H. *et al.* (2011) Anti-inflammatory effects of the anticonvulsant drug levetiracetam on electrophysiological properties of astroglia are mediated via TGF β 1 regulation. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 491–507.
- Suda S., Katsura K., Kanamaru T., Saito M. and Katayama Y. (2013) Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **707**, 26–31.
- Taylor C. P. and Narasimhan L. S. (1997) Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Adv. Pharmacol.* **39**, 47–98.
- Turrin N. P., Gayle D., Ilyin S. E., Flynn M. C., Langhans W., Schwartz G. J. and Plata-Salaman C. R. (2001) Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res. Bull.* **54**, 443–453.
- Vereczkey L., Szentirmay Z. and Szporny L. (1979) Kinetic metabolism of vinpocetine in the rat. *Arzneimittelforschung* **29**, 953–956.
- Verhelst H., Boon P., Buyse G. *et al.* (2005) Steroids in intractable childhood epilepsy: clinical experience and review of the literature. *Seizure* **14**, 412–421.
- Vezzani A., Friedman A. and Dingledine R. J. (2013) The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**, 16–24.



The antidepressant sertraline prevents the behavioral and EEG changes induced in two animal models of seizures

María Sitges^{a,*}, Blanca I. Aldana^a, Carlos D. Gómez^a, Vladimir Nekrassov^b

^a Depto. de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

^b División de Investigación Básica y Aplicada, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2012

Revised 10 September 2012

Accepted 12 September 2012

Available online 12 November 2012

Keywords:

4-aminopyridine

Carbamazepine

Depression in epilepsy

Pentylenetetrazole

ABSTRACT

In order to investigate a potential anticonvulsive action of sertraline (i.p.), its effects on seizures, EEG epileptiform activity and EEG amplitude increases induced by two convulsive agents were evaluated and compared with the effects of carbamazepine. Around 20 min following 4-aminopyridine (4-AP, 2.5 mg/kg, i.p.), tonic-clonic seizures and epileptiform activity were observed in control animals. A single sertraline pre-injection of 2.5 mg/kg, but not of 0.75 mg/kg, prevented these changes to 4-AP. Repeated daily administration of 0.75 mg/kg for one week, however, effectively inhibited the changes induced by 4-AP. The first generalized tonic-clonic seizure and EEG changes in response to pentylenetetrazole (PTZ, 50 mg/kg, i.p.) were observed near the first minute in control animals. Single sertraline doses above 5 mg/kg prevented the PTZ-induced changes. Moreover, a single carbamazepine dose of 25 mg/kg (i.p.), but not of 15 mg/kg, prevented the changes induced by the above convulsive agents. An anti-seizure action of the antidepressant sertraline is strongly suggested by these findings.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Psychiatric disorders, particularly depression, represent frequent comorbidities in patients with epilepsy [1–6]. Nevertheless, the use of antidepressants in patients with epilepsy has been a controversial matter, as evidence suggests that antidepressants can facilitate the severity of seizures, particularly when used at high doses [7–9]. Sertraline is broadly prescribed for the treatment of depression [10,11], and some authors claim that it can be safely used to treat depression in individuals with epilepsy [12].

Voltage-gated Na⁺ channels are of critical importance in the generation and propagation of neuronal action potentials. In situations in which all neurons are firing, such as during epileptic seizures, a sustained and prolonged activation of voltage-sensitive Na⁺ channels takes place. Consistent with this, several of the most effective antiepileptic drugs are believed to reduce cerebral excitability and stop the paroxysmal neuronal activity that accompanies seizures by blocking Na⁺ channels.

Veratridine is a naturally occurring toxin that binds to the voltage sensor (site 2) of the Na⁺ channel, impeding its inactivation. In previous studies in cerebral isolated nerve endings we found that the rise in Na⁺ and the release of the excitatory amino acid neurotransmitter

glutamate induced by veratridine were sensitive to various antiepileptic drugs [13,14]. Interestingly, in a recent study, we also observed that sertraline was an effective inhibitor of the increase in Na⁺ and in neurotransmitter release induced by veratridine [15]. Thus, in the present study, the possible anticonvulsive effect of sertraline was investigated. For this purpose, the action of sertraline on seizure susceptibility to the convulsive agent 4-aminopyridine (4-AP), whose mechanism of action involves changes in brain pre-synaptic ion channel permeability, and to pentylenetetrazole (PTZ), whose mechanism of action has been related to a decrease in GABAergic transmission, was investigated. The action of the classical antiepileptic drug, carbamazepine, on seizure susceptibility to the above convulsive agents was also evaluated using the same experimental paradigm.

2. Materials and methods

2.1. Source of materials

4-AP was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), PTZ was obtained from MP Biochemicals Inc. (Aurora, Ohio), and sertraline was kindly donated by Psicofarma, S.A. de C.V. (México). Carbamazepine was obtained either from ICN Biomedicals Inc. (Ohio) or from Psicofarma, S.A. de C.V. (México).

2.2. Animals

One hundred and eight male Wistar rats weighing 310 ± 2 g were included in the present study. To evaluate the behavioral changes

* Corresponding author at: Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, México, D.F., México. Fax: +52 55 5622 9198.

E-mail address: sitges@biomedicas.unam.mx (M. Sitges).

induced by 4-AP or by PTZ at convulsive doses in the control and the experimental animal groups pre-treated with sertraline or carbamazepine, thirty-one animals were used. Seventy-seven additional animals were used to investigate the effects of sertraline and carbamazepine on the EEG changes induced by the convulsive agents. The EEG recordings were obtained in animals under anesthesia in order to minimize movement, stress, and muscular activity during seizures.

2.3. Animal groups in experiments designed to investigate the behavioral changes and seizures induced by the convulsive agents

Four animal groups comprising four animals per group were included in the experiments designed to test the effects of sertraline and carbamazepine on the behavioral changes and seizures induced by 4-AP (2.5 mg/kg, i.p.). One group was administered (i.p.) 2.5 mg/kg sertraline, the second group 25 mg/kg sertraline, the third 25 mg/kg carbamazepine, and the control group received the vehicle used to dissolve sertraline or DMSO, which was the vehicle used to dissolve carbamazepine. The vehicle used to dissolve sertraline contained 30% DMSO and 70% saline. In the animals pre-administered sertraline, the drug was injected 4 h before exposure to the convulsive agents. We chose this time because 4 h after its administration, sertraline has been reported to reach a high concentration in rat brain tissue [16]. Carbamazepine was pre-administered 2 h before exposure to the convulsive agent, taking into account the time to achieve the maximal carbamazepine concentration in rat brain [17].

In the experiments intended to test the effect of sertraline on seizures induced by PTZ, three animal groups comprising five animals per group were formed. Pentylentetrazole was dissolved in saline and administered i.p. at a dose of 50 mg/kg. One group was then injected (i.p.) with sertraline at a low dose (2.5 mg/kg), the second group with sertraline at a high dose (25 mg/kg), and the control group with the vehicle used to dissolve sertraline.

2.4. Animal groups included in the experiments designed to investigate the epileptiform encephalographic activity induced by 4-AP or by PTZ

Susceptibility to the epileptiform EEG activity induced by 4-AP was tested in three groups: a control group injected with vehicle, a 2.5 mg/kg sertraline pre-treated group, and a 25 mg/kg carbamazepine pre-treated group.

The susceptibility to the epileptiform EEG activity induced by PTZ was tested in nine groups, seven pre-injected with sertraline at additional doses within the range from 2.5 to 25 mg/kg, and two groups pre-injected with carbamazepine at doses of 15 and 25 mg/kg.

The effect of repeated administration of sertraline at a low dose on the epileptiform EEG activity induced by 4-AP was also tested. Three additional groups were included for this purpose: a control group pre-injected daily for seven days with vehicle, a group pre-injected daily with 0.75 mg/kg sertraline for seven days, and a group that received a single 0.75 mg/kg sertraline injection.

2.5. EEG recordings

To evaluate the changes in cortical excitability induced by 4-AP or by PTZ, a Nihon-Kohden Neuropack IV Mini (MEB-5304 K) system was used. Before obtaining the EEG recordings, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (50 mg/kg/10 mg/kg, i.p.). Subcutaneous needle electrodes were then placed rapidly over the left temporal area (active electrode) and over the left frontal area between the midline and the arched portion of the orbital crest (reference electrode). Once the baseline cortical EEG activity had been recorded for 2 min, the animal was carefully turned and injected with 4-AP (2.5 mg/kg) or with PTZ (50 mg/kg, i.p.). In the case of the

animals injected with 4-AP, cortical EEG activity was recorded for 2 min at three time intervals following 4-AP administration, namely from min 9 to 11, 19 to 21, and 29 to 31. In the case of the animals injected with PTZ, cortical EEG activity was recorded for 2 min at three time intervals following PTZ, namely from min 1 to 3, 9 to 11, and 29 to 31. These time intervals were chosen based on our previous experience of the effects of these convulsive agents on EEG epileptiform activity in the guinea pig [18]. To complete 2 min, twelve consecutive recordings of 10 s were obtained before and at the specific time intervals following the injection of the convulsive agent. These recordings were stored on floppy disks for future analysis.

For the EEG experiments, sertraline and carbamazepine also were pre-administered 4 or 2 h before the convulsive agent, respectively.

2.6. EEG amplitude quantification

In an attempt to quantify some of the EEG changes produced by the convulsive agents in the rats exposed to the different experimental conditions, the highest EEG peak amplitude value (EEG hpav) (in μV) of recordings taken before (baseline) and at the specific time intervals following administration of the convulsive agents was measured in each animal. We defined the EEG hpav as the average of the 12 highest positive to negative non-interrupted peaks (in μV) obtained from the 12 consecutive recordings of 10 s each (2-min total time interval). The difference between the 12 peaks of the highest amplitude obtained at a particular time interval was small (5% in most cases and never more than 10%), so that these averages were used directly to calculate the mean EEG hpav (\pm SEM) in each animal group.

2.7. Approval of the study protocol

Animal experiments were carried out in compliance with the Guidelines for Animal Experimentation and with the approval of the "Laboratory Animals Care and Use Committee" of the Biomedical Research Institute (Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM).

2.8. Statistics

Analysis of variance (ANOVA) was used for statistical evaluations. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of sertraline on the behavioral changes induced by 4-AP

The administration of 4-AP at a dose of 2.5 mg/kg increased exploratory activity and produced vocalizations and tremor of the vibrissal and masticatory muscles. These changes, which were commonly observed shortly after the injection, were followed by piloerection, grooming, and wet dog shakes. The first row in Table 1 shows that the latencies to some of these changes appeared within the first 10 min after the injection of 4-AP in control animals. These behavioral changes usually preceded a continuous tremor of the whole-body musculature that evolves to increased motor activity, finishing in a generalized tonic-clonic seizure around 20 min after 4-AP administration. Generalized tonic-clonic seizures to 4-AP always ended in a continuous tremor of the body accompanied by a fan-like position of the toes. Only one of the 4 control animals exposed to 2.5 mg/kg 4-AP died, 27 min after the first seizure. The other 3 control animals presented a second seizure after 46 ± 5 min and 3 h later recovered from the 4-AP-induced behavioral changes.

In the animals pre-administered 2.5 mg/kg sertraline, piloerection, grooming, and wet dog shakes were still shown with similar latencies as compared to the control group, although tonic-clonic seizures were not observed (second row in Table 1).

Table 1
Effect of sertraline at a low and a high dose on 4-AP-induced behavioral changes. Comparison with carbamazepine.

	Latency (min) to the different 4-AP-induced behavioral changes						
	Piloerection	Grooming	WDS	Tonic-clonic seizure	Number of seizures	Seizure duration (min)	
						1st	2nd
Control	2.7 ± 1.0	4.5 ± 0.6	7.0 ± 2.3	18 ± 2.1	1.8 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3
Sertraline 2.5 mg/kg	3.6 ± 0.5	4.3 ± 0.4	8.1 ± 1.9		No seizures to 4-AP		
Sertraline 25 mg/kg	11.7 ± 1.1*	15.1 ± 0.8*	26.3 ± 5.4*		No seizures to 4-AP		
Carbamazepine 25 mg/kg	6.7 ± 0.5*	14.0 ± 0.9*	21.2 ± 1.0*		No seizures to 4-AP		

WDS, wet dog shakes.

Animals were observed for 60 min following 4-AP.

Results are the mean ± SEM values of the 4 animals included in each group.

* $P < 0.01$ between control and sertraline 25 mg/kg or carbamazepine 25 mg/kg.

In the animals pre-administered either sertraline at the higher dose (25 mg/kg) or 25 mg/kg carbamazepine, the tonic-clonic generalized convulsions induced by 4-AP were completely prevented, and piloerection, grooming, and wet dog shake latencies were increased (last two rows in Table 1).

None of the animals pre-administered sertraline or carbamazepine died after 4-AP.

3.2. Effect of sertraline on the behavioral changes induced by PTZ

The administration of 50 mg/kg PTZ rapidly induced marked behavioral changes in all the control animals pre-administered the vehicle. The first row in Table 2 shows that the latency to the first myoclonic seizure (whole-body jerk) and the first tonic-clonic seizure were close to the first minute. In general, the animals exposed to PTZ only showed one tonic-clonic seizure, which lasted around 2 min. The clonic seizure (spasms characterized by rapidly alternating muscular contraction and relaxation) usually was immediately followed by a tonic seizure (hind limb extension), or in some cases, the tonic seizure occurred between two episodes of clonic seizures. One control animal showed a second tonic-clonic seizure 7 min following PTZ.

The second row in Table 2 shows that seizures induced by PTZ were only prevented in one of five animals pre-administered 2.5 mg/kg sertraline. Nonetheless, latencies to the first myoclonic and the first tonic-clonic seizure were delayed by sertraline at the low concentration tested. The third row in Table 2 shows that in all the animals pre-administered sertraline at the tenfold higher dose (25 mg/kg), the behavioral changes accompanying seizures induced by PTZ were effectively suppressed.

Note that two of the five control animals died a few minutes after the first tonic-clonic seizure, whereas none of the animals pre-administered sertraline at any dose died (last column of Table 2).

Table 2
Effect of sertraline at a low and a high dose on the behavioral changes induced by PTZ.

	Latency (min) to the first PTZ-induced		Duration (min) of the tonic-clonic seizure	% of rats presenting seizures	% of death
	Myoclonic seizure	Tonic-clonic seizure			
Control	1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.4	100%	40%
Sertraline 2.5 mg/kg	2 ± 0.3*	3 ± 0.6*	0.8 ± 0.3	80%	0%
Sertraline 25 mg/kg	No behavioral changes to PTZ			0%	0%

Animals were observed for 30 min following PTZ.

Results are the mean ± SEM values of the 5 animals included in each group.

* $P < 0.05$ between control and sertraline 2.5 mg/kg.

3.3. Representative recordings of sertraline and carbamazepine inhibition of the epileptiform activity induced by the convulsive agents

The recordings shown in Fig. 1 illustrate the baseline cortical activity and the nature of the changes in the EEG induced by the convulsive agents, 4-AP and PTZ, at the indicated time intervals following their injection. Note that these changes were completely prevented by sertraline and carbamazepine at the indicated doses.

3.4. Effect exerted by sertraline and by carbamazepine at various doses on the rise in EEG amplitude induced by the convulsive agents

In an attempt to compute the EEG changes, the EEG hpav was measured before and at several time intervals following administration of the convulsive agents. The EEG hpav of 65 animals under baseline conditions (i.e., before the injection of the convulsive agents) was $39 \pm 2 \mu\text{V}$. Before 4-AP or PTZ administration, no significant difference among the baseline EEG hpav between the different animal groups was found.

Consistent with the latency to the first tonic-clonic seizure induced by 4-AP, the first more conspicuous EEG changes to 4-AP observed in the control group were seen around 20 min following 4-AP. These EEG changes were reflected by an increase of the baseline EEG hpav to $167 \mu\text{V}$. This fourfold increase in the EEG hpav increased further in the last 2-min interval recorded following 4-AP (first line in Table 3). These increases in EEG amplitude following 4-AP were practically abolished by sertraline at a dose of 2.5 mg/kg (second line in Table 3), as well as by carbamazepine at a dose of 25 mg/kg (third line in Table 3).

Also consistent with the latency to the tonic-clonic seizure induced by PTZ, the marked EEG changes induced by PTZ in control animals injected with vehicle were observed close to the second minute following the injection of PTZ. This marked EEG change was reflected by a fourfold increase (to $160 \mu\text{V}$) in the baseline EEG amplitude ($39 \mu\text{V}$). This rapid increase in the EEG hpav progressively decreased, twofold in the interval from 9 to 11 min following PTZ and only around 30% over the baseline in the interval from 29 to 31 min following PTZ (first row in Table 4).

The second line in Table 4 shows that although an increase in the EEG hpav after PTZ was still present in the animal group pre-administered sertraline at the lowest dose tested (2.5 mg/kg), it was statistically significantly lower than in the control group. The difference in the EEG hpav after PTZ between the control group and the 2.5 mg/kg sertraline-treated group was $P = 0.01$ from min 1 to 3, $P = 6 \times 10^{-8}$ from min 9 to 11, and $P = 0.04$ from min 29 to 31. It is worth mentioning that in two of the four animals pre-administered 2.5 mg/kg sertraline, PTZ still induced a marked EEG change, while in the other two animals PTZ failed to change the baseline EEG pattern. In the group pre-administered 5 mg/kg sertraline, the EEG changes following PTZ were observed in only one of the four animals. Consistent with this, the EEG hpav following PTZ was not only still higher than the baseline

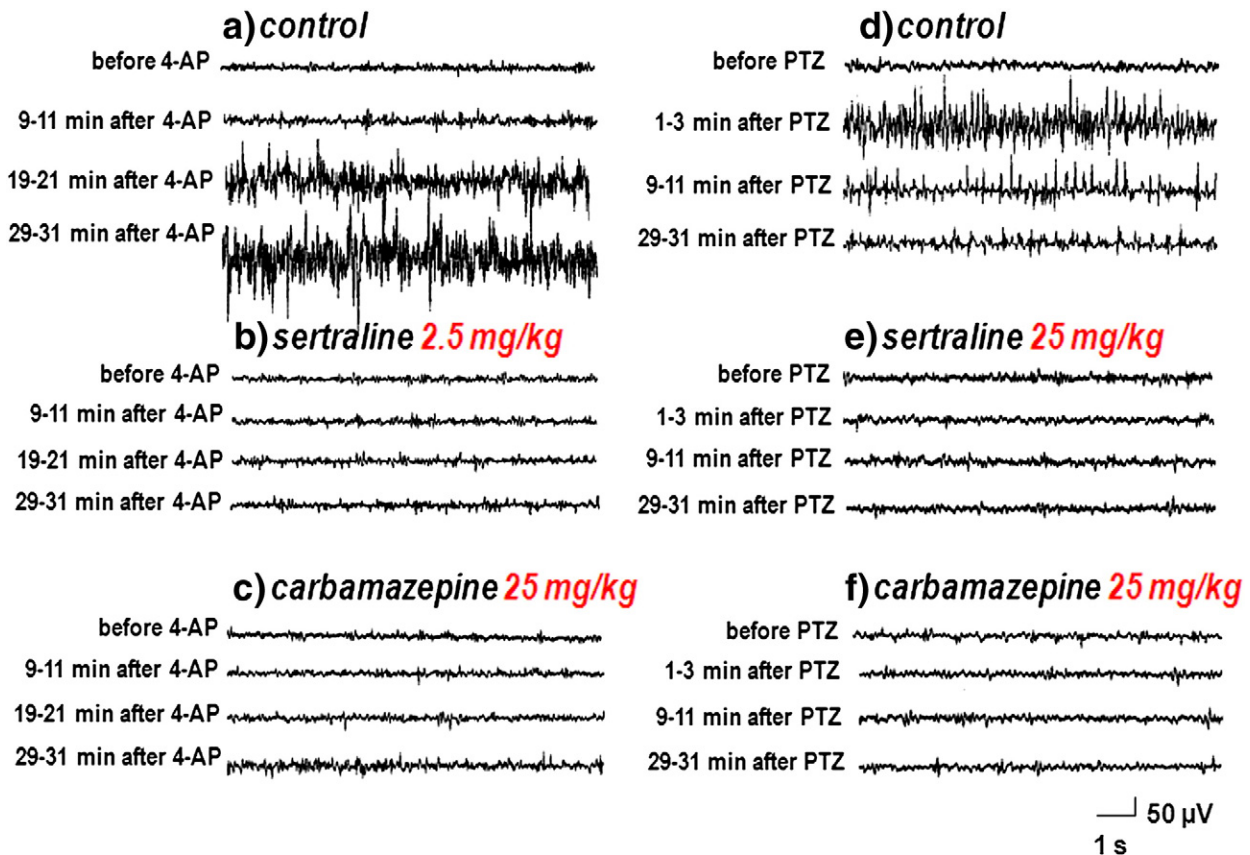


Fig. 1. Representative recordings of 4-AP and PTZ-induced EEG changes in the absence and presence of sertraline and carbamazepine at the indicated doses. Left graphs are representative EEG recordings taken before (*i.e.*, baseline EEG activity) and at the indicated time intervals following 4-AP in a control animal (a); a 2.5 mg/kg sertraline pre-administered animal (b); and a 25 mg/kg carbamazepine pre-administered animal (c). Right graphs are representative recordings taken before (*i.e.*, baseline EEG activity) and at the indicated time intervals following PTZ in: a control animal (d), a 25 mg/kg sertraline pre-administered animal (e) and a 25 mg/kg carbamazepine pre-administered animal (f).

EEG hpav of 39 μ V but also markedly lower than the EEG hpav produced by PTZ in the control group. The PTZ-induced changes in EEG cortical activity in the groups pre-administered sertraline at the higher doses tested, namely 10, 15, 20, and 25 mg/kg, were completely prevented. Consistently, in the groups pre-administered sertraline at doses equal or above 10 mg/kg, no significant differences between the baseline EEG hpav before ($39 \mu\text{V} \pm 2$) and following PTZ were observed.

The marked EEG changes induced by PTZ were practically unchanged by carbamazepine at a dose of 15 mg/kg but were abolished by carbamazepine at a higher dose (25 mg/kg). Consistently, 15 mg/kg carbamazepine was unable to prevent the rise in the EEG hpav induced by PTZ, while 25 mg/kg carbamazepine abolished the rise in the EEG hpav to PTZ (bottom rows in Table 4).

Table 3

Comparison of sertraline and carbamazepine effects on the increase in the EEG hpav induced by 4-AP.

Animal groups	EEG hpav ^a			Number of animals
	Intervals following 4-AP			
	Min 9 to 11	Min 19 to 21	Min 29 to 31	
Control	44 \pm 1.0	167 \pm 3.3	269 \pm 5.4	(10)
Sertraline 2.5 mg/kg	37 \pm 0.3*	43 \pm 1.2*	52 \pm 2.1*	(4)
Carbamazepine 25 mg/kg	38 \pm 1.4*	41 \pm 1.8*	50 \pm 2.7*	(4)

Results are the mean \pm SEM values of the indicated number of animals in each group.

^a hpav, highest peak amplitude value (in μ V).

* $P < 0.002$ between control and the indicated animal group at a specified time interval following 4-AP.

3.5. Comparison of the effect of acute and repeated administration of sertraline on the rise in the EEG amplitude induced by 4-AP

Since the epileptiform activity accompanied by the increases in EEG amplitude following 4-AP was practically abolished by sertraline at the dose of 2.5 mg/kg (Fig. 1b and second line in Table 3, respectively), a possible action of the antidepressant sertraline after repeated administration at a lower concentration was tested.

Table 5 shows that a week of a daily sertraline injection of 0.75 mg/kg effectively prevented the increase in EEG amplitude

Table 4

Dose-dependent effect of sertraline on PTZ-induced increase in EEG amplitude (as judged by the hpav). Comparison with carbamazepine.

Animal groups	EEG hpav ^a			Number of animals
	Intervals following PTZ			
	Min 1 to 3	Min 9 to 11	Min 29 to 31	
Control	160 \pm 6	94 \pm 2	62 \pm 4	(14)
Sertraline 2.5 mg/kg	108 \pm 30*	52 \pm 1*	47 \pm 2*	(4)
Sertraline 5.0 mg/kg	64 \pm 17*	46 \pm 4*	46 \pm 5*	(4)
Sertraline 10.0 mg/kg	39 \pm 2*	40 \pm 2*	39 \pm 2*	(4)
Sertraline 15.0 mg/kg	40 \pm 3*	40 \pm 2*	39 \pm 3*	(4)
Sertraline 20.0 mg/kg	38 \pm 2*	39 \pm 2*	40 \pm 3*	(4)
Sertraline 25.0 mg/kg	42 \pm 3*	41 \pm 1*	39 \pm 1*	(4)
Carbamazepine 15 mg/kg	127 \pm 8*	93 \pm 2	64 \pm 3	(5)
Carbamazepine 25 mg/kg	36 \pm 2*	39 \pm 2*	45 \pm 4*	(4)

The baseline EEG hpav before PTZ was $39 \pm 2 \mu\text{V}$.

Results are the mean \pm SEM values of the indicated number of animals in each group.

^a hpav, highest peak amplitude value (in μ V).

* $P < 0.04$ between control and the indicated animal group at the specified time interval following PTZ.

Table 1

EEG hpav induced by 4-AP in animals pre-administered with one or seven daily injections of sertraline at a low dose.

Animal groups	Number of daily injections	EEG hpav ^a		
		Intervals following 4-AP		
		Min 9 to 11	Min 19 to 21	Min 29 to 31
(a) Vehicle	1	44 ± 1.0	167 ± 3.3	269 ± 5.4
(b) Vehicle	7	44 ± 1.4	178 ± 16	279 ± 13
(c) Sertraline 0.75 mg/kg	1	42 ± 1.5	179 ± 16	280 ± 13
(d) Sertraline 0.75 mg/kg	7	36 ± 1.0*	40 ± 2.5*	50 ± 1.0*
P between (a) and (b)		0.77 (NS)	0.46 (NS)	0.42 (NS)
P between (a) and (c)		0.17 (NS)	0.15 (NS)	0.33 (NS)
P between (b) and (d)		0.003	0.0002	2.3 × 10 ⁻⁶

Results are the mean ± SEM values of at least 4 animals per group. (NS), no significant difference.

The mean ± SEM baseline EEG hpav of the included animals before 4-AP was 35 ± 0.3 μV.

^a hpav, highest peak amplitude value (in μV).

induced by 4-AP, whereas a single injection of sertraline at the same low dose failed to prevent the increase in EEG amplitude induced by 4-AP.

4. Discussion

The present study shows that a single i.p. injection of the antidepressant sertraline at doses in the range from 2.5 to 25 mg/kg inhibits the behavioral and the EEG changes induced in two pharmacological animal models of seizures. This effect was comparable to the clinically established antiepileptic drug carbamazepine administered i.p. at a dose of 25 mg/kg.

The characteristic behavioral changes in response to 4-AP that have been previously described in detail in the rat [19,20] were also observed in the present study. Also, the latency to the first myoclonic and tonic-clonic seizure as well as the mortality rate in response to PTZ were consistent with previous studies in which the convulsive behavior induced by PTZ administered i.p. at a similar dose to the rat was investigated [21,22].

Our findings that at the lowest dose tested (2.5 mg/kg) sertraline prevented tonic-clonic seizures induced by 4-AP in all animals (Table 2), whereas at that dose it only prevented tonic-clonic seizures induced by PTZ in one of five animals (Table 1) may be due to differences in 4-AP and PTZ mechanisms of action. Thus, sertraline is an effective inhibitor of brain pre-synaptic Na⁺ channel permeability [15] and among the changes induced by 4-AP on pre-synaptic ion channels permeability, 4-AP increases Na⁺ channel permeability [23]. In contrast, PTZ mechanism of action has been related to a decrease in GABAergic transmission [24,25].

In order to obtain an objective measure of the anticonvulsive effectiveness of sertraline and carbamazepine at the various doses tested, the epileptiform EEG cortical activity induced by 4-AP or PTZ in the absence and presence of those drugs was recorded in 65 animals. This allowed us to record the EEG amplitude at specific time intervals, which was used to construct Tables 3 and 4. The EEG hpav obtained from recordings using scalp EEG tracings taken for 2 min before and at specific time intervals following administration of a convulsive agent has been used previously in the guinea pig [18,26]. Here we measured the EEG hpav for the first time in the rat, as the EEG hpav is very consistent and can be used to compare the potential anti-seizure action of drugs using exactly the same parameters.

The animals pre-exposed to 25 mg/kg sertraline and particularly to 25 mg/kg carbamazepine showed some relaxed behavior, although under the present experimental conditions, sertraline and carbamazepine failed to change the baseline cortical excitability or the baseline EEG hpav *per se* in a measurable manner. The marked increase in the

EEG hpav observed around 20 min following 4-AP and after the first minute following PTZ was, however, inhibited by both sertraline and carbamazepine in a concentration-dependent manner confirming the anti-seizure action of sertraline.

In order to obtain the EEG recordings, the animals were anesthetized. A possible action of anesthesia in reducing seizures, however, is unlikely, since the latencies to the tonic-clonic seizures in non-anesthetized animals and to the epileptiform EEG changes induced in the anesthetized animals following administration of the convulsive agents were similar.

In patients with depression, the initial sertraline dose is generally 50 mg/day, which would be equivalent to 1 mg/kg taken by a 50 kg person, and is titrated as clinically needed to a maximal dose of 200 mg/day (that would be equivalent to 4 mg/kg). In the present study, a single sertraline dose of 2.5 mg/kg prevented seizures and the epileptiform EEG changes induced by 4-AP, and although it only prevented seizures induced by PTZ in 20% of the animals, it increased the latency to PTZ-induced seizures in the remaining animals. In addition, PTZ failed to induce the epileptiform EEG changes in half of the animals pre-administered 2.5 mg/kg sertraline, and at the dose of 5 mg/kg, which approximates the maximal dose used in depressive patients, sertraline effectively prevented the PTZ-induced epileptiform activity in 75% of the animals. Moreover, at doses above 5 mg/kg, sertraline completely prevented all PTZ-induced changes. On the other hand, a single carbamazepine dose administered by the same route (i.p.) and analyzed for its action on the changes induced by both convulsive agents using an identical paradigm was also required at a higher dose to control seizures or the epileptiform activity in the rat than to control seizures in patients with epilepsy. For instance, if we consider a minimal dose of carbamazepine of 400 mg/day for patients with epilepsy, which would correspond to 8 mg/kg for a 50 kg person, and an average dose of 1000 mg/day, which would correspond to 20 mg/kg of carbamazepine for a 50 kg person, the 15 mg/kg of carbamazepine administered to the rat would correspond to 750 mg/day for a 50 kg patient with epilepsy. However, the single carbamazepine dose of 15 mg/kg did not control the epileptiform activity induced by PTZ in the rat.

Antidepressants and antiepileptic drugs both need to be administered for a certain time before being able to produce their therapeutic action in patients. Our finding that the EEG epileptiform activity in response to 4-AP was insensitive to a single administration of 0.75 mg/kg sertraline, whereas the repeated administration of 0.75 mg/kg sertraline for 7 days completely prevented it, demonstrates that the anti-seizure action of sertraline can be achieved even at doses on a mg/kg basis below the minimal initial dose used in patients, though caution is certainly warranted in translating dosages in rodents to humans.

Finally, given the uncertainty regarding the use of antidepressants in patients with epilepsy, we think that the present results obtained in two different animal models of seizure strongly suggest a potential anti-seizure capability of the antidepressant sertraline worthy of further study in patients.

Acknowledgments

The authors thank Araceli Guarneros and Luz María Chiu for their excellent technical assistance and Dr. Robyn Hudson and Dr. Ruud Büijis for kindly revising the text and their pertinent corrections. This work was financially supported by project IN207912 from PAPIIT. Blanca I. Aldana scholarship was supported by SEP-CONACYT.

References

- [1] Kanner AM. Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. *Curr Opin Neurol* 2008;21:190–4.
- [2] Kanner AM, Trimble M, Schmitz B. Postictal affective episodes. *Epilepsy Behav* 2010;19:156–8.

- [3] Noe KH, Locke DE, Sirven JI. Treatment of depression in patients with epilepsy. *Curr Treat Options Neurol* 2011;13:371-9.
- [4] Danzer SC. Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 2011;233:22-32.
- [5] Stevanovic D, Jancic J, Lalic A. The impact of depression and anxiety disorder symptoms on the health-related quality of life of children and adolescents with epilepsy. *Epilepsia* 2011;52:e75-8.
- [6] Mula M. Epilepsy: bidirectional link between epilepsy and psychiatric disorders. *Nat Rev Neurol* 2012;8:252-3.
- [7] Preskorn SH, Fast GA. Tricyclic antidepressant-induced seizures and plasma drug concentration. *J Clin Psychiatry* 1992;53:160-2.
- [8] Pisani F, Oteri G, Costa C, Di Raimondo G, Di Perri R. Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. *Drug Saf* 2002;25:91-110.
- [9] Alper K, Schwartz KA, Kolts RL, Khan A. Seizure incidence in psychopharmacological clinical trials: an analysis of Food and Drug Administration (FDA) summary basis of approval reports. *Biol Psychiatry* 2007;62:345-54.
- [10] Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* 1997;340:249-58.
- [11] Sheehan DV, Kamijima K. An evidence-based review of the clinical use of sertraline in mood and anxiety disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2009;24:43-60.
- [12] Seethalakshmi R, Krishnamoorthy ES. Depression in epilepsy: phenomenology, diagnosis and management. *Epileptic Disord* 2007;9:1-10.
- [13] Sitges M, Chiu LM, Nekrassov V. Single and combined effects of carbamazepine and vinpocetine on depolarization-induced changes in Na(+), Ca(2+) and glutamate release in hippocampal isolated nerve endings. *Neurochem Int* 2006;49:55-61.
- [14] Sitges M, Chiu LM, Nekrassov V. Effects of carbamazepine, phenytoin, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate and vinpocetine on Na+ channel-mediated release of [3H]glutamate in hippocampal nerve endings. *Neuropharmacology* 2007;52:598-605.
- [15] Aldana BI, Sitges M. Sertraline inhibits presynaptic Na+ channel mediated responses in hippocampus isolated nerve endings. *J Neurochem* 2012;121:197-205.
- [16] Tremaine LM, Welch WM, Ronfeld RA. Metabolism and disposition of the 5-hydroxytryptamine uptake blocker sertraline in the rat and dog. *Drug Metab Dispos* 1989;17:542-50.
- [17] Graumlich JF, McLaughlin RG, Birkhahn D, et al. Subcutaneous microdialysis in rats correlates with carbamazepine concentrations in plasma and brain. *Epilepsy Res* 2000;40:25-32.
- [18] Nekrassov V, Sitges M. Effects of pentylentetrazole and 4-aminopyridine on the auditory brainstem response (ABR) and on the hearing sensitivity in the guinea pig in vivo. *Epilepsy Res* 2003;53:245-54.
- [19] Mihály A, Bencsik K, Solymosi T. Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in the rat. *J Neural Transm (Gen Sect)* 1990;79:59-67.
- [20] Weiczner R, Krisztin-Péva B, Mihály A. Blockade of AMPA-receptors attenuates 4-aminopyridine seizures, decreases the activation of inhibitory neurons but is ineffective against seizure-related astrocytic swelling. *Epilepsy Res* 2008;78:22-32.
- [21] Akamatsu N, Fueta Y, Endo Y, Matsunaga K, Uozumi T, Tsuji S. Decreased susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after low-frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett* 2001;310:153-6.
- [22] López-Meraz ML, González-Trujano ME, Neri-Bazán L, Hong E, Rocha LL. 5-HT1A receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 2005;49:367-75.
- [23] Galván E, Sitges M. Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na+ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes. *Neurochem Res* 2004;29:347-55.
- [24] Macdonald RL, Barker JL. Pentylentetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Nature* 1977;267:720-1.
- [25] Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:986-95.
- [26] Sitges M, Nekrassov V. Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG, the auditory brainstem responses and hearing. *Clin Neurophysiol* 2004;115:2711-7.