



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA SERTRALINA REDUCE LA PERMEABILIDAD DE LOS CANALES DE SODIO EN
SINAPTOSOMAS DE HIPOCAMPO Y LAS CONVULSIONES EN LA RATA *IN VIVO*.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
BLANCA IRENE ALDANA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA SITGES BERRONDO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA,
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. AGOSTO 2013



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

Blanca Irene Aldana García recibió una beca de Posgrado (No. 297737) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

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

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. **María Sitges Berrondo** por ser un ejemplo de excelencia académica, por compartirme sus conocimientos, su experiencia y su motivación. Le agradezco su interés en mi trabajo, en mi desempeño profesional, y sus consejos que me han ayudado a formarme como persona e investigadora. Gracias por tu invaluable apoyo, María.

A mi comité tutor: la Dra. Luisa Rocha Arrieta y al Dr. Miguel Pérez de la Mora por su análisis crítico de mi proyecto y mis presentaciones que semestre a semestre permitieron enriquecer éste trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Herminia Pasantes Ordoñez, Dr. Ricardo Tapia, Dr. Gerhard Heinze Martin y Dr. Rudolf Buijs por su valioso tiempo y sus comentarios en la revisión de ésta tesis.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que sustentó mis estudios de posgrado (CONACyT- 297737).

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** mi segunda casa, por todo lo que he recibido de ella y que espero retribuir.

Dedico esta Tesis:

A mis padres Irene García y José Aldana que son mi pilar y motivación para superarme, por soportar mis radicales cambios de humor y quererme incondicionalmente.

A mi Shell por quererme tal como soy y alentarme a veces a pesar mío. A mi abue Blanca Pérez por su apoyo, su amor y por consentirme siempre.

A Daniel Gómez por ser mi cómplice en este camino, por su apoyo y por las buenas discusiones académicas y no académicas. A mis amigas Gabriela González y Leticia Pérez por estar ahí aunque no estén ahí. A los amigos, sería difícil nombrarlos a todos.

INDICE

Resumen

Abstract

Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Organización de la Tesis	8
2. ANTECEDENTES	
2.1 Epilepsia	9
2.1.1 Clasificación de las crisis epilépticas	10
2.1.2 Modelos animales de convulsiones y epilepsia <i>in vivo</i>	11
2.1.3 Fármacos antiepilépticos	14
2.1.4 Mecanismos generales de acción de los antiepilépticos	14
2.1.5 Canales pre-sinápticos de Na ⁺ cerebrales y fármacos antiepilépticos	17
2.2 Depresión y fármacos antidepresivos	19
2.3 Sertralina	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
4. HIPOTESIS	25
5. OBJETIVOS	26

6. MÉTODOS

ESTUDIO I: Experimentos *in vitro*

6.1 Preparación de las terminales nerviosas aisladas de hipocampo	27
6.2 Determinación de la concentración interna de Na ⁺	28
6.3 Experimentos de liberación de [³ H]Glu precargado a las terminales	29
6.4 Detección de neurotransmisores endógenos	30
6.5 Determinación de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA	30
6.6 Determinación de las concentraciones de Glu y GABA	31

ESTUDIO II: Experimentos *in vivo*

6.7 Animales experimentales	32
6.8 Evaluación de los cambios conductuales inducidos por los agentes pro-convulsivos, 4-AP y PTZ.....	32
6.9 Detección de la actividad epileptiforme encefalográfica inducida por 4-AP o PTZ	33
6.10 Análisis estadístico	35

7. RESULTADOS

ESTUDIO I

La sertralina inhibe las repuestas mediadas por los canales presinápticos de Na⁺ en terminales nerviosas aisladas de hipocampo

7.1.1 Efecto de sertralina sobre el aumento en la concentración interna de Na ⁺ y sobre la liberación de [³ H]Glu inducido por veratridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo	36
---	----

7.1.2 Efecto de la ausencia de gradiente de Na ⁺ o de la presencia de tetrodotoxina sobre la liberación de [3H]Glu inducida con veratridina	39
7.1.3 Efectos simultáneos de sertralina sobre la distribución de neurotransmisores endógenos 5-HT, Glu y GABA en ausencia o en presencia de veratridina en condiciones libres de Ca ²⁺	40
7.1.4 Efecto de sertralina en ausencia o presencia de veratridina sobre las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en presencia de Ca ²⁺ externo	42
7.1.5 Efectos de 5-HT, sertralina y tetrodotoxina sobre el aumento en la concentración interna de Na ⁺ inducido con veratridina	44

ESTUDIO II

La sertralina previene los cambios conductuales y la actividad epileptiforme en el EEG en dos modelos animales de convulsiones

7.2.1 Efecto de la sertralina sobre los cambios conductuales inducidos por 4-AP y PTZ a dosis convulsivas	48
7.2.2 Comparación del efecto de la sertralina y la carbamazepina sobre la actividad epileptiforme del EEG inducida por 4-AP y PTZ.....	52
7.2.3 Comparación de los efectos de la administración aguda y repetida de sertralina sobre el aumento en la amplitud del EEG inducido por 4-AP	56

8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES GENERALES	66
10. BIBLIOGRAFIA	67

ANEXOS

Indice de figuras

Figura 1. Esquema de los principales modelos animales de convulsiones y tipos específicos de crisis epilépticas	13
Figura 2. Inhibición que producen varios fármacos antiepilépticos a concentraciones crecientes sobre la liberación de glutamato (Glu) inducida por veratridina en sinaptosomas de hipocampo.	18
Figura 3. Fórmula semidesarrollada de la sertralina	23
Figura 4. Principio del método de determinación de la concentración interna de Na^+ en los sinaptosomas.....	29
Figura 5. Esquema del procedimiento experimental para estudiar los efectos de la sertralina o de carbamazepina sobre cambios en la actividad epileptiforme del EEG inducidos por 4-AP o PTZ.....	35
Figura 6. La sertralina de manera dependiente de dosis disminuye el aumento en el Na^+ inducido con veratridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo	37
Figura 7. La sertralina de manera dependiente de dosis inhibe la liberación de [^3H]Glu inducida con veratridina	38
Figura 8. El aumento en la liberación de [^3H]Glu inducida con veratridina en sinaptosomas de hipocampo depende de la entrada de Na^+ a través de canales de Na^+ sensibles a tetrodotoxina	39
Figura 9. La respuesta del Na^+ evocada con veratridina es insensible a 5-HT	45
Figura 10. La 5-HT a altas concentraciones no disminuye el aumento en el Na^+ inducido por pre-despolarización con veratridina	46
Figura 11. El aumento en el Na^+ inducido por pre-despolarización con veratridina es sensible a sertralina y a tetrodotoxin	47
Figura 12. Registros representativos de los cambios en el EEG inducidos con 4-AP y PTZ en ausencia y en presencia de sertralina o carbamazepina a las dosis indicadas.....	53

Indice de tablas

Tabla 1. <i>Fármacos antiepilépticos: principales blancos moleculares y eficacia clínica.....</i>	16
Tabla 2. <i>Tratamientos antidepresivos disponibles</i>	22
Tabla 3. <i>Distribución de 5-HT y de neurotransmisores aminoácidos en ausencia y presencia de sertralina en condiciones libres de Ca^{2+}</i>	41
Tabla 4. <i>Cambios netos en la distribución de neurotransmisores que induce la veratridina en ausencia y presencia de sertralina (en condiciones libres de Ca^{2+}).....</i>	42
Tabla 5. <i>Efecto de sertralina sobre la distribución de 5-HT y 5- HIAA en condiciones de reposo en presencia de Ca^{2+} externo</i>	43
Tabla 6. <i>Efecto de la sertralina sobre los cambios netos en la distribución de monoaminas inducidos con veratridina en presencia de Ca^{2+} externo</i>	44
Tabla 7. <i>Efecto de sertralina a una dosis baja y a una dosis alta sobre los cambios conductuales inducidos con 4-AP</i>	50
Tabla 8. <i>Efecto de sertralina a una dosis baja y a una dosis alta sobre los cambios conductuales inducidos con PTZ</i>	52
Tabla 9. <i>Comparación de los efectos de sertralina y carbamazepina sobre el aumento en el hpav del EEG inducido con 4-AP</i>	54
Tabla 10. <i>Efecto dosis-dependiente de sertralina sobre los cambios en la amplitud del EEG (a juzgar por el hpav) inducidos con PTZ. Comparación con la carbamazepina.....</i>	56
Tabla 11. <i>Cambios en el hpav del EEG inducidos con 4-AP en animales pre-administrados con una o siete inyecciones de sertralina a una dosis baja</i>	57

Resumen

La sertralina es un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina ampliamente prescrito para el tratamiento de la depresión. La depresión representa una de las comorbilidades más frecuentes en pacientes con epilepsia. Aunque existen evidencias de que algunos antidepresivos pueden disminuir el umbral convulsivo, la sertralina aparentemente puede ser usada de manera segura para tratar la depresión en pacientes epilépticos. Varios de los fármacos antiepilépticos más efectivos reducen la excitabilidad cerebral y detienen la actividad neuronal paroxística que acompaña a las convulsiones mediante el bloqueo de los canales de sodio (Na^+) sensibles a voltaje. Estos canales son determinantes en la generación y conducción de los potenciales de acción neuronales. Resulta interesante que en dos estudios electrofisiológicos en cultivos de células embrionarias de riñón humano y en células GH3 de pituitaria de rata se encontró que la sertralina también disminuye la actividad de los canales de Na^+ . Considerando que en situaciones en las que todas las neuronas están disparando tal como ocurre durante las convulsiones epilépticas, los canales de Na^+ se activan de manera sostenida y prolongada y que estos canales se encuentran particularmente concentrados en las terminales sinápticas, en el presente trabajo se investigó una posible acción de la sertralina sobre los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ . Con este propósito, estudiamos el efecto de la sertralina sobre las respuestas inducidas por apertura de los canales de Na^+ con la toxina de origen natural veratridina, a saber, el aumento en el Na^+ (a juzgar por el indicador selectivo para este ion, SBFI) y la liberación de neurotransmisores en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) de hipocampo, una estructura cerebral particularmente susceptible a la generación de convulsiones. Nuestros resultados muestran que la sertralina en un rango micromolar bajo, inhibió progresivamente el aumento en el Na^+ , la liberación de glutamato radioactivo pre-cargado a las terminales, y la liberación de los neurotransmisores endógenos serotonina, glutamato y GABA (detectados por HPLC) inducidos por despolarización con veratridina tanto en ausencia como en presencia de Ca^{2+} externo. Además, en condiciones de reposo, la sertralina aumentó la concentración externa de serotonina a expensas de su concentración interna, y no alteró las

concentraciones de los neurotransmisores aminoácidos o del principal metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindol acético. Este aumento selectivo de la sertralina sobre la concentración externa de serotonina es consistente con la acción inhibitoria de la sertralina sobre el transportador de esta monoamina. Sin embargo, es poco probable que la sertralina inhiba la permeabilidad de los canales de Na^+ pre-sinápticos mediante el aumento en la serotonina externa ya que la serotonina en un amplio rango de concentración no inhibió el aumento en el Na^+ inducido por veratridina. Con base en estos resultados que demuestran que además de inhibir la recaptura de serotonina, la sertralina, al igual que varios fármacos antiepilépticos, es un inhibidor efectivo de los canales pre-sinápticos de Na^+ , también investigamos una posible acción anti-convulsiva de la sertralina en dos modelos animales *in vivo*. Con este objetivo evaluamos los efectos de la sertralina sobre las convulsiones, la actividad epileptiforme y el aumento en la amplitud del EEG inducidos por los agentes convulsivos 4-aminopiridina (4-AP) y pentilentetrazol (PTZ) y comparamos los efectos de la sertralina con los efectos del fármaco antiepiléptico clásico carbamazepina. Encontramos que una sola pre-inyección de 2.5 mg/kg de sertralina, pero no de 0.75 mg/kg, previno las convulsiones tónico-clónicas y la actividad epileptiforme del EEG inducidos por 4-AP. La administración diaria de 0.75 mg/kg de sertralina durante siete días, sin embargo, inhibió eficazmente los cambios inducidos por 4-AP. Por otro lado, la sertralina administrada a dosis por encima de 5 mg/kg inhibió tanto las convulsiones tónico-clónicas, como los cambios en el EEG en respuesta a PTZ. Además, una sola dosis de carbamazepina 25 mg/kg, pero no de 15 mg/kg, previno los cambios inducidos por ambos agentes convulsivos. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren un potencial anti-convulsivo del antidepresivo sertralina digno de estudios adicionales en pacientes.

Abstract

Sertraline is a selective serotonin reuptake inhibitor broadly prescribed for the treatment of depression. Depression is a common co-morbidity in patients with epilepsy. Although some antidepressants lower seizure threshold, sertraline apparently can be safely used to treat depression in epileptic individuals. Several of the most effective antiepileptic drugs reduce cerebral excitability and stop the brain paroxysmal neuronal activity accompanying seizures by blocking voltage sensitive Na^+ channels. These channels are of critical importance in the generation and propagation of neuronal action potentials. Interestingly, in cultured human embryonic kidney cells and in rat pituitary GH3 cells sertraline reduced Na^+ channel activity. Taking into account that 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 and that in comparison with other parts of the neuron, Na^+ channels in pre-synaptic boutons are particularly abundant, a possible sertraline action on cerebral pre-synaptic Na^+ channels was investigated in the present study. For this purpose, the effect of sertraline on responses induced by the Na^+ channel opener, veratridine, namely the increase in Na^+ (as judged by the Na^+ selective indicator dye, SBFI) and in neurotransmitter release in isolated nerve endings (synaptosomes) from the hippocampus, a particularly epileptogenic brain structure was investigated. Our results show that sertraline in the low micromolar range (1.5-25 μM) progressively inhibits the rise in Na^+ and the release of pre-loaded [^3H]Glutamate as well as the release of endogenous serotonin, glutamate and GABA (detected by HPLC) induced by veratridine depolarization either under external Ca^{2+} -free conditions or in the presence of external Ca^{2+} . In addition, under non-depolarized conditions, sertraline (25 μM) increased the external concentration of serotonin at expense of its internal concentration, and unchanged the external and internal concentrations of the amino acid neurotransmitters and of the serotonin main metabolite, 5-HIAA. This result is consistent with the sertraline inhibitory action of the serotonin transporter. However, sertraline is unlikely to inhibit pre-synaptic Na^+ channels permeability by increasing external serotonin. Because serotonin in a wide concentration range (1-1000 μM) did not change the veratridine-

induced increase in Na^+ . Since present results demonstrate that besides the inhibition of serotonin reuptake, sertraline is an effective inhibitor of pre-synaptic Na^+ channels controlling neurotransmitter release as several antiepileptic drugs are, a potential anti-convulsive action of sertraline was also investigated. For this purpose, its effects on seizures, EEG epileptiform activity and EEG amplitude increases induced by two convulsive agents were evaluated and compared with the effects of the classic antiepileptic drug, carbamazepine. Our findings show that a single sertraline pre-injection of 2.5 mg/kg, but not of 0.75 mg/kg, prevented tonic-clonic seizures and EEG epileptiform activity following 4-aminopyridine (4-AP). Repeated daily administration of 0.75 mg/kg for one week, however, effectively inhibited the changes induced by 4-AP. On the other hand, single sertraline doses above 5 mg/kg prevented the generalized tonic-clonic seizure and EEG changes in response to pentylenetetrazole (PTZ). Moreover, a single carbamazepine dose of 25 mg/kg, but not of 15 mg/kg, prevented the changes induced by the above convulsive agents. Present findings strongly suggest a potential anti-seizure capability of the antidepressant sertraline worthy of further study in patients.

Abreviaturas

[³H]Glu, glutamato radioactivo

4-AP, 4-aminopiridina

5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT, 5-Hidroxitriptamina, serotonina

Ca²⁺, calcio

EEG, electroencefalograma

GABA, ácido γ-aminobutírico

Glu, glutamato

HPAV, highest peak amplitude value (valor de la amplitud del pico máximo)

HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia

ISRS, inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina

KRH, buffer Krebs Ringer HEPES estándar

Na⁺, sodio

PTZ, pentilentetrazol

SBFI, sodium-binding benzofuran isophthalate (indicador selectivo para sodio)

WDS, wet dog shakes (sacudidas de perro mojado)

1. INTRODUCCIÓN

“Los melancólicos generalmente se convierten en epilépticos y los epilépticos en melancólicos: lo que determina la preferencia es la dirección que toma la enfermedad, si está sobre el cuerpo, epilepsia; si está sobre la inteligencia, melancolía...” Hipócrates, 400 a.C.

En pacientes con epilepsia, la depresión representa una de las comorbilidades psiquiátricas más frecuentes (Kanner 2008; Kanner y col. 2010; Danzer 2011; Noe y col. 2011; Stevanovic y col. 2011; Mula 2012). La prevalencia de la depresión en pacientes epilépticos ha sido difícil de estimar debido principalmente a la diversidad de muestras poblacionales en los diferentes estudios, la falta de notificación de los síntomas depresivos por parte de los pacientes, así como un diagnóstico médico incorrecto. No obstante, existe un consenso entre diversos autores que la prevalencia de la depresión en pacientes con epilepsia es mayor que en la población general. Dicha prevalencia se estima en un rango de 20 a 55% en pacientes con convulsiones recurrentes y de 3 a 9% en pacientes con epilepsia controlada (Tellez-Zenteno y col. 2007; Kanner 2008). Más aún, en pacientes con epilepsia refractaria se ha mostrado que la depresión es una de las variables más importantes que tienen un impacto negativo sobre la calidad de vida, incluso más que la frecuencia y la gravedad de las crisis epilépticas (Gilliam 2002). Además, el riesgo de suicidio se ha estimado que es 10 veces mayor en pacientes con epilepsia que en la población general (Bell y Sander 2009; Hesdorffer y col. 2012). Se ha sugerido la existencia de mecanismos patogénicos en común entre la epilepsia y la depresión. Dichos mecanismos involucran por ejemplo una hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, así como trastornos en diferentes sistemas de neurotransmisores, particularmente serotonina y norepinefrina (Hesdorffer y col. 2000; Kanner 2003; Hesdorffer y col. 2006; Kondziella y col. 2007). En conjunto estas observaciones permiten sugerir que la depresión puede ser más que un proceso reactivo a la epilepsia. Por lo tanto surge la necesidad de encontrar un tratamiento farmacológico adecuado para controlar los síntomas depresivos en pacientes epilépticos.

La sertralina, es un fármaco ampliamente prescrito para el tratamiento de la depresión que pertenece a la familia de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (Koe y col. 1983; Bolden-Watson y Richelson 1993; Tatsumi y col. 1997; Sheehan y Kamijima 2009). Existe

evidencia de que algunos antidepresivos pueden disminuir el umbral convulsivo (Preskorn y Fast 1992; Pisani y col. 2002; Alper y col. 2007). Opuestamente, se ha sugerido que la sertralina aparentemente puede ser usada de manera segura para tratar la depresión en pacientes epilépticos (Seethalakshmi y Krishnamoorthy 2007). Por otro lado, entre los fármacos antiepilépticos más efectivos para controlar las crisis convulsivas están los que disminuyen la permeabilidad de los canales de Na^+ sensibles a voltaje. En este sentido, en dos estudios electrofisiológicos se encontró que la sertralina también es capaz de inhibir dichos canales (Huang y col. 2006); (Wang y col. 2008). Por lo tanto, en el presente estudio se investigaron las propiedades anticonvulsivas de la sertralina a diferentes niveles de complejidad.

1.1 Organización de la tesis

En el presente trabajo se muestran los estudios dirigidos a investigar los efectos de la sertralina sobre uno de los principales blancos farmacológicos de varios de los agentes anticonvulsivos más efectivos, *i.e.* los canales cerebrales pre-sinápticos de sodio (Na^+), así como los estudios para explorar el potencial anticonvulsivo la sertralina. Para ello, esta tesis se divide en 2 trabajos: el primero comprende el abordaje experimental *in vitro* con el que se investigó el efecto de la sertralina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo de rata. El segundo trabajo aborda los efectos de la sertralina sobre los cambios conductuales y electroencefalográficos en dos modelos animales de convulsiones inducidas farmacológicamente con los agentes 4-aminopiridina y pentilentetrazol, así como la comparación de los efectos de la sertralina sobre dichos cambios con los efectos del fármaco antiepiléptico clásico carbamazepina. Comienzo presentando algunas generalidades relevantes a dichos estudios en la sección de Antecedentes para continuar con una breve descripción de los métodos empleados en cada abordaje experimental.

Considerando que en los dos primeros artículos contenidos en la sección Anexos se incluye una descripción detallada de los resultados y una discusión correspondiente, en esta tesis presento un resumen de los resultados de cada trabajo y una discusión integral de los principales hallazgos obtenidos en dichos estudios.

Finalmente en la sección Anexos también incluyo otro trabajo de nuestro laboratorio en el que participé activamente durante el Doctorado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epilepsia

La epilepsia comprende un grupo de desórdenes caracterizados por episodios recurrentes y espontáneos de sincronización aberrante de la actividad eléctrica neuronal que pueden ser locales o extenderse a todas las regiones corticales simultáneamente y que se manifiestan en cambios conductuales y electroencefalográficos (Engel 1995; Noebels 1996). La epilepsia es una de las enfermedades cerebrales con mayor prevalencia que se estima entre el 1 y el 2% de la población aunque este estimado es mayor en los países subdesarrollados. El número de personas con epilepsia es uno de los argumentos para considerarla un problema de salud pública. La organización mundial de la salud estima que en el mundo existen de 2.7 a 41.3 por cada 1000 personas en riesgo de padecerla. 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 puede calcular que existen cerca de 1 a 2 millones de mexicanos con este riesgo y se calcula que en nuestro país el número de pacientes con epilepsia es 1.5 millones aproximadamente.

La etiología de la epilepsia 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 producir epilepsia. Así, estudios neuroquímicos y farmacológicos indican que tanto la disminución en la neurotransmisión inhibitoria del ácido γ -aminobutírico (GABA) como el aumento en la transmisión excitatoria del neurotransmisor excitador por excelencia, glutamato, pueden desencadenar actividad epiléptica (Bradford 1995; Rowley y col. 2012).

La epilepsia es un término general que incluye varios tipos de alteraciones. La Liga Internacional Contra la Epilepsia (International League Against Epilepsy, ILAE) separa las epilepsias y síndromes epilépticos de etiología conocida o formas sintomáticas (secundarias), de aquellas epilepsias idiopáticas (primarias) y criptogénicas o de etiología desconocida (Panayiotopoulos 2012). 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 y los procesos

inflamatorios asociados a estas alteraciones, malformaciones congénitas, alteraciones innatas del metabolismo, neoplasias e intoxicaciones. 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. En este caso, las crisis epilépticas usualmente son la única manifestación de enfermedad neurológica del paciente. Asimismo, se identifican por su relación con la edad de aparición y anormalidades electroencefalográficas típicas. Las formas criptogénicas se refieren a trastornos de causa desconocida, o aún no determinada. También se han relacionado con la edad de aparición y hallazgos electroencefalográficos, aunque con frecuencia estos últimos no tienen anormalidades bien definidas.

2.1.1 Clasificación de las crisis epilépticas

Las manifestaciones clínicas de la epilepsia son las alteraciones motoras y/o sensoriales relacionadas a este padecimiento (crisis epilépticas). La necesidad de clasificar a las crisis epilépticas radica tanto en el interés epidemiológico, con el fin de cuantificar su incidencia, como en el interés de seleccionar el tratamiento adecuado, ya que hasta la fecha la selección del fármaco antiepiléptico depende del tipo de crisis, independientemente de su etiología. En este sentido, con base en la localización de la actividad excesiva y/o hipsincrónica de las neuronas, la ILAE ha convenido en clasificar a las crisis de manera general, en parciales y generalizadas ([Panayiotopoulos 2012](#)).

En las crisis parciales la activación neuronal se encuentra localizada formando lo que se denomina foco epiléptico involucrando un hemisferio cerebral. A su vez, las crisis parciales se clasifican teniendo en cuenta si se altera o no la conciencia. Las crisis parciales simples son aquellas en las que la conciencia no se ve alterada; mientras que en las crisis parciales complejas existe pérdida de la conciencia. En este tipo de crisis complejas están involucradas estructuras del sistema límbico, principalmente el hipocampo y la amígdala. Una crisis parcial simple puede progresar a una crisis parcial compleja o a una generalizada.

En las crisis generalizadas, la hiperactividad neuronal involucra a ambos hemisferios, la conciencia se altera y se presentan manifestaciones motoras bilaterales. Las crisis generalizadas pueden además subdividirse en crisis convulsivas (clónicas, tónicas, así como

crisis tónico-clónicas generalizadas) y en crisis no convulsivas (crisis de ausencia, mioclónicas y atónicas) (Engel 2001; Seino 2006).

2.1.2 Modelos animales de convulsiones y epilepsia *in vivo*

Los modelos animales de convulsiones y de epilepsia han jugado un papel fundamental en el avance de nuestro entendimiento acerca de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos asociados con la epilepsia humana y han sido fundamentales en el descubrimiento y desarrollo preclínico de nuevos fármacos anticonvulsivos (Loscher 2011). El modelo experimental nos permite reproducir muchas manifestaciones de la epilepsia clínica, sobre todo las convulsiones, fenómeno conductual que refleja hiperexcitabilidad cortical sostenida. Además, el modelo experimental nos permite interpretar y fundamentar conceptos teóricos necesarios para entender los mecanismos que participan en el o los fenómenos epilépticos.

Uno de los propósitos principales del uso de modelos animales de epilepsia o de convulsiones es el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos (Loscher 2011). Como las epilepsias se dividen en epilepsias generalizadas y epilepsias parciales, los modelos animales de epilepsia también se dividen en dos grupos (Figura 1). El tipo del modelo (generalizado o parcial) depende tanto de las características del agente convulsivo, como de su intensidad o dosis, vía y manera de administración (aguda o crónica). Un mismo agente convulsivo puede inducir convulsiones generalizadas o parciales dependiendo de como es administrado. Por ejemplo, la aplicación aguda de un estímulo eléctrico de alta intensidad se utiliza como modelo de epilepsia generalizada, mientras que la aplicación crónica de descargas eléctricas de baja intensidad (“kindling”) se utiliza como modelo de epilepsia parcial. Esta correlación entre la manera de administración de un convulsivo (aguda o crónica) y el tipo de epilepsia que está reproduciendo en un animal se mantiene también en el caso de los convulsivos químicos. La vía de administración de un convulsivo químico también puede determinar el tipo de la crisis. La aplicación de un cristal de 4-aminopiridina (4-AP), por ejemplo, sobre la superficie del cerebro induce convulsiones parciales, mientras que la administración de una solución de 4-AP por vía intraperitoneal produce convulsiones generalizadas (Loscher 2002).

No obstante, los modelos principales y más comúnmente empleados para inducir crisis epilépticas son el choque eléctrico máximo y el pentilentetrazol (PTZ) (Loscher 2011). El tipo y la severidad de las convulsiones inducidas en estos dos modelos dependen de la intensidad de la corriente en el caso del choque eléctrico y en el caso del PTZ, de la dosis o la vía de inyección. Estos dos modelos son casi universalmente empleados para rastrear compuestos con propiedades anticonvulsivas, para el diseño racional y otros abordajes de desarrollo de fármacos (White 2003). El PTZ es un antagonista de los receptores de GABA en el sistema nervioso central (Macdonald y Barker 1977; Huang y col. 2001), disminuye la inhibición sobre la excitabilidad neuronal e induce crisis epilépticas (Loscher y col. 1991). La popularidad del PTZ se debe a que este agente induce convulsiones tónico-clónicas generalizadas que son reproducibles, previsibles y cuantificables en los animales *in vivo*, además de que el patrón del EEG producido por PTZ en los animales es parecido al de los humanos (White y col. 1998).

Además del PTZ, otro agente convulsivo utilizado en el presente trabajo para inducir convulsiones tónico-clónicas es la 4-AP, que se ha demostrado que induce actividad epileptiforme en rebanadas cerebrales *in vitro* como en modelos animales de convulsiones *in vivo* (Ives y Jefferys 1990; Perreault y Avoli 1991; Yamaguchi y Rogawski 1992; Psarropoulou y Avoli 1996; Armand y col. 1999; Nekrassov y Sitges 2003). Los cambios conductuales que induce la 4-AP en el animal *in vivo* incluyen alteraciones motoras que culminan en convulsiones tónico-clónicas generalizadas (Mihaly y col. 1990). El mecanismo de acción de la 4-AP es complejo e involucra cambios en la permeabilidad de los canales pre-sinápticos cerebrales de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ (Galindo y Sitges 2004; Galvan y Sitges 2004; Sitges y col. 2005). Más aún, la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores, incluyendo la del neurotransmisor aminoácido excitador más importante del cerebro, glutamato, que es por mucho, el neurotransmisor más concentrado en las terminales nerviosas cerebrales aisladas (Sitges y col. 2000).

Con base en lo anterior se puede concluir que los modelos animales de convulsiones inducidas farmacológicamente con diversos agentes tales como 4-AP y PTZ, permiten identificar potenciales fármacos anticonvulsivos y desenmascarar sus posibles mecanismos de acción.

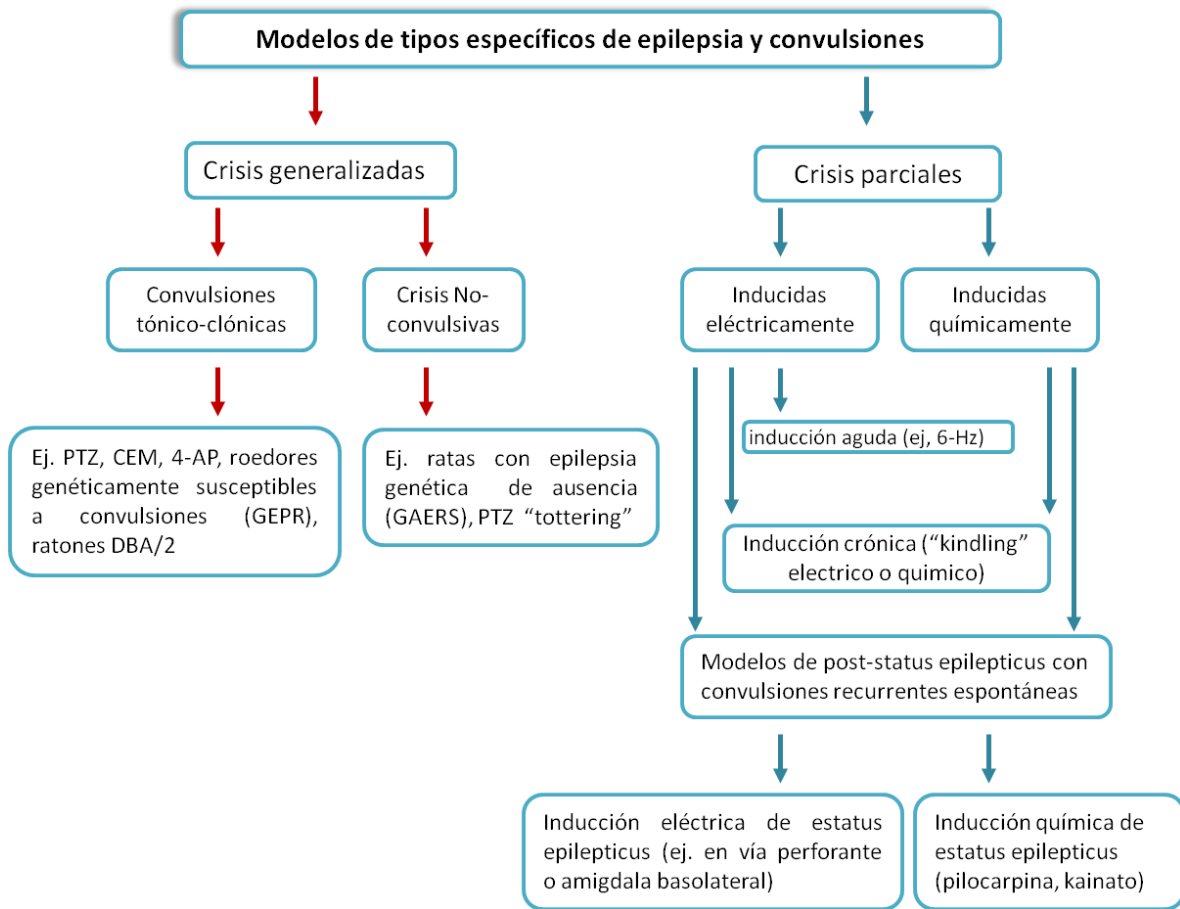


Figura 1. Esquema de los principales modelos animales de convulsiones y de tipos específicos de crisis epilépticas. Modificado de Loscher 2011. *Seizure* 20, 359–368.

2.1.3 Fármacos antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos actualmente disponibles en la clínica son capaces de controlar las crisis convulsivas en 60-70% de los pacientes con epilepsia (Kwan y Brodie 2000; French y col 2004). Además, el uso de estos fármacos se asocia con efectos secundarios adversos (Perucca y Gilliam 2012) particularmente cuando son administrados a altas dosis. Por lo tanto existe una necesidad médica no cubierta para el tratamiento de dicha enfermedad.

Cerca de 30 compuestos utilizados para el tratamiento de las epilepsias existen en el mercado e incluyen los antiepilépticos de primera generación o clásicos y los antiepilépticos de segunda y tercera generación. Los antiepilépticos clásicos incluyen a la fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, etosuximida y a las benzodiazepinas, tales como el diazepam, midazolam, clorazepato, clonacepam y lorazepam. Los antiepilépticos de segunda generación incluyen a la acetazolamida, lamotrigina, topiramato, oxcarbazepina, felbamato, fosfenitoína, gabapentina, mefenitoína, metsuximida, tiagabina, vigabatrina, zonisamida y levetiracetam. Finalmente dentro de los antiepilépticos de tercera generación se encuentra la eslicarbazepina, brivaracetam, carisbamato, fluorofelbamato, elpetrigina, lacosamida, rufinamida y safinamida (Vohora 2010; Sirven y col. 2012).

Aunque los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos que actualmente se comercializan no se comprenden totalmente, se ha propuesto que modulan la excitabilidad de las neuronas a través de efectos sobre canales iónicos, receptores y/o sobre el metabolismo de neurotransmisores, de manera que bloquean el disparo neuronal sostenido asociado a las convulsiones sin perturbar la actividad cerebral no epiléptica (Rogawski y Loscher 2004; Bialer y White 2010).

2.1.4 Mecanismos generales de acción de los antiepilépticos

Con base en su mecanismo de acción, los antiepilépticos pueden ser clasificados en tres grupos principales. (1) Los que modulan a los canales iónicos dependientes de voltaje, (2) los que aumentan la inhibición sináptica, y (3) los que inhiben la excitación sináptica sostenida (Rogawski y Loscher 2004). Estudios en modelos animales han demostrado que

el control de las convulsiones se puede lograr mediante el bloqueo de canales iónicos como los de calcio (Ca^{2+}) y particularmente mediante el bloqueo de los canales de Na^+ (Willow y Catterall 1982; Lukyanetz y col. 2002; Lingamaneni y Hemmings 2003; Lipkind y Fozzard 2010) como lo hacen los fármacos antiepilépticos más efectivos, y posiblemente también a través de la facilitación de canales de potasio como se ha propuesto para la retigabina (Wickenden y col. 2000). Los efectos anticonvulsivos también pueden ser producidos por fármacos que aumentan la neurotransmisión GABAérgica y que facilitan la inhibición mediada por los receptores de GABA tipo A (White y col. 1997; Löscher y Horstmann 1994; Rudolph y col. 1999), o en menor medida a través de efectos sobre los sistemas de glicina, los sistemas de neurotransmisores específicos incluyendo monoaminas tales como catecolaminas, serotonina e histamina, y los neuropéptidos (tales como péptidos opioides, galanina y neuropéptido Y) y el neuromodulador inhibitorio, adenosina (Van Dycke y col. 2010). Además, se ha encontrado que el bloqueo de los receptores de glutamato incluyendo los NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol), kainato y del grupo I de receptores metabotrópicos tipo mGluR1 y mGluR5, protege contra las convulsiones en modelos animales (Harty y Rogawski, 2000; Kaminski y col. 2004). En principio, es posible prevenir las convulsiones epilépticas al utilizar cualquiera de estas estrategias o una combinación de ellas. La Tabla 1 muestra las principales moléculas sobre las que actúan varios de los fármacos antiepilépticos de las tres generaciones, así como los tipos de crisis que estos fármacos son capaces de controlar.

Tabla 1. Fármacos antiepilépticos: principales blancos moleculares y eficacia clínica

Fármaco	Canales iónicos		GABA	Receptores de glutamato	Tipo de crisis			
	Na ⁺	Ca ²⁺			parciales	TCG	ausencia	mioclonías
Primera generación								
Benzodiazepinas	X	X	✓ GABA _A R	X	+	+	+	+
Carbamazepina	✓ I _{NaF}	X	X	X	+	+	-	-
Fenitoína	✓ I _{NaF} , I _{NaP}	X	X	X	+	+	-	-
Fenobarbital	X	X	✓ GABA _A R	✓ AMPA	+	+	-	-
Etosuximida	¿ I _{NaP} ?	✓ tipo-T	X	X	-	-	-	-
Valproato	¿ I _{NaP} ?	✓ ¿tipo-T?	✓ ↑ recambio de GABA	X	+	+	+	+
Segunda generación								
Felbamato	✓ I _{NaF}	✓ HVA	✓ GABA _A R	✓ NMDA	+	+	(+)	-
Fosfenitoína	✓ I _{NaF}	X	X	X	+	+	-	-
Gabapentina	X	✓ HVA (α2δ)	✓ ↑ recambio de GABA	X	+	+	-	-
Lamotrigina	✓ I _{NaF}	X	X	X	+	+	+	(+/-)
Levetiracetam*	X	✓ HVA	?	X	+	(+)	(+)	-
Oxcarbazepina	✓ I _{NaF}	X	X	X	+	+	-	-
Tiagabina	X	X	✓ transportador	X	+	+	-	-
Topiramato	X	✓ HVA	✓ GABA _A R	✓ KA/AMPA	+	+	(+)	(+)
Vigabatrina	X	X	✓ GABA transaminasa	X	+	+	-	-
Zonisamida	✓ I _{NaF}	✓ tipo-T	?	X	+	+	(+)	(+)
Tercera generación								
Eslicarbazepina	✓ I _{NaF}	X	X	X	Fármacos en fase de investigación pre-clínica y/o clínica			
Brivaracetam	✓ I _{NaF}	X	?	?				
Carisbamato		?	?	?				
Florofelbamato	✓ I _{NaF}	X	X	✓				
Elpetrigina		X	?	?				
Lacosamida	✓ I _{NaP}	X	X	✓				
Rufinamida	✓ I _{NaF}	X	X	X				
Safinamida	✓ I _{NaF}	✓ HVA	X	✓				
Vinpocetina	✓ I _{NaF}	✓	?	?				

✓, efecto reportado; X, efecto no reportado; ? efecto no estudiado o estudios controversiales

Eficacia clínica: +, indica estudios clínicos controlados y/o aceptación generalizada de su utilidad

(+), indica escasa evidencia de la eficacia clínica del tratamiento para el tipo específico de crisis

-, indica evidencia de la falta de eficacia clínica o aumento en las crisis

* El levetiracetam se une con alta afinidad a la proteína de vesícula sináptica 2A (SV2A) que se cree que participa en la liberación de neurotransmisores dependiente de Ca²⁺

AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; GABA_AR, receptores tipo A de GABA; HAV (high voltage activated) canales activados por alto voltaje;

I_{NaF}, corriente rápida de sodio; I_{NaP}, corriente lenta de sodio; KA, kainato; NMDA, N-metil D-aspartato; TCG, convulsiones tónico-clónicas generalizadas

Adaptada de Rogawsky y Loscher 2004 *Nat Rev Neurosci* 5, 553-64; Vohora y col. 2010 *Drugs Today (Barc)* 46, 265-77.

2.1.5 Los canales pre-sinápticos de Na⁺ cerebrales y fármacos antiepilépticos

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje son fundamentales en la regulación de la actividad eléctrica neuronal. Por ejemplo, en condiciones en las que todas las neuronas disparan sincrónicamente, tal como ocurre durante las convulsiones epilépticas, los canales de Na⁺ se activan de manera sostenida y prolongada. Consistentemente, se ha propuesto que varios de los fármacos antiepilépticos más comúnmente usados en la clínica, controlan la excitabilidad neuronal sincrónica y excesiva asociada a las convulsiones epilépticas mediante la inhibición dependiente de voltaje y frecuencia de los canales cerebrales de Na⁺ (Willow y Catterall 1982; Lukyanetz y col. 2002; Lingamaneni y Hemmings 2003; Rogawski y Loscher 2004; Lipkind y Fozzard 2010; Mantegazza y col. 2010).

En comparación con otras partes de la neurona, los canales de Na⁺ están particularmente concentrados en las terminales nerviosas cerebrales (Engel y Jonas 2005). Para explorar los efectos de un fármaco sobre los canales cerebrales pre-sinápticos de Na⁺, una preparación ideal son las terminales nerviosas aisladas del cerebro (sinaptosomas) ya que estas conservan muchas de las propiedades fisiológicas de las terminales nerviosas intactas, incluyendo una estrecha relación entre los flujos iónicos y la liberación de neurotransmisores durante el proceso de despolarización. El tamaño reducido de las terminales nerviosas (<0.5 μm) hace difícil el uso de técnicas electrofisiológicas convencionales para despolarizarlas. Sin embargo la entrada de Na⁺ a las terminales nerviosas cerebrales aisladas se puede incrementar empleando como herramienta farmacológica a la toxina de origen natural, veratridina, que se une al sensor de voltaje del canal de Na⁺ impidiendo su inactivación. Por otro lado, en las terminales nerviosas aisladas, se puede monitorear el cambio en la concentración interna de Na⁺ con la ayuda del indicador fluorescente selectivo para Na⁺, SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate) que cambia su emisión de fluorescencia en respuesta a cambios en la concentración de Na⁺. A juzgar por los cambios en la fluorescencia del SBFI, el aumento que induce la veratridina sobre la permeabilidad de los canales de Na⁺ se inhibe por el bloqueador de los canales de Na⁺, tetrodotoxina; es independiente de la concentración externa de Ca²⁺; y es insensible al bloqueo de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q con la ω-agatoxina TK y la ω-conotoxina GIVA (Sitges y col. 1998; Sitges y Galindo 2005). Por lo tanto, el que un fármaco inhiba las respuestas inducidas por veratridina, particularmente en ausencia de Ca²⁺, indica

una disminución en la permeabilidad de los canales de Na^+ . De acuerdo con esto, en estudios previos de nuestro laboratorio en terminales nerviosas aisladas de diferentes regiones cerebrales, se demostró que fármacos antiepilépticos tanto de la primera como de la segunda generación tales como carbamazepina, fenitoina, oxcarbazepina y lamotrigina, inhiben la liberación del neurotransmisor excitador glutamato inducida por activación de los canales pre-sinápticos de Na^+ con veratridina (Sitges y col. 2006; Sitges y col. 2007; Sitges y col. 2009) como se ilustra en la figura 2.

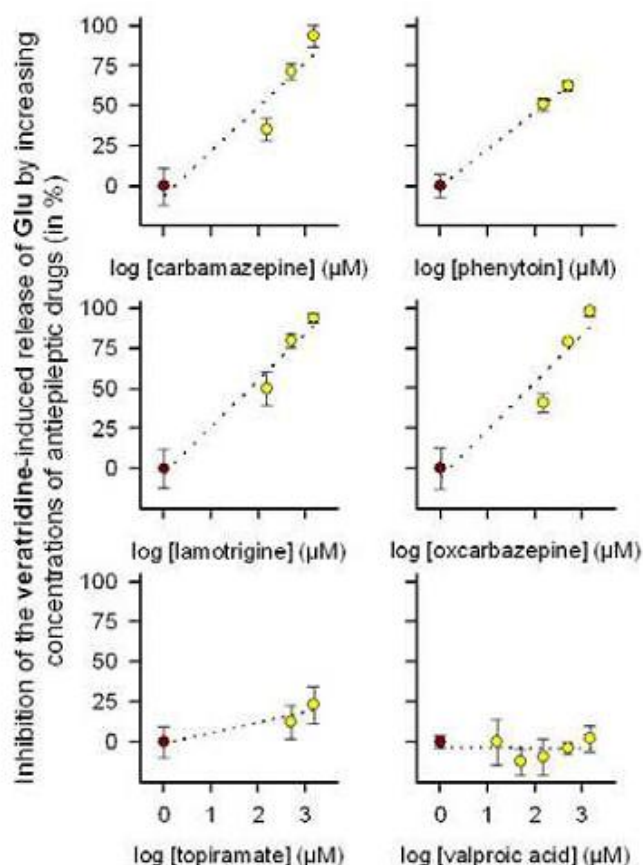


Figura 2. Inhibición que producen varios fármacos antiepilépticos a concentraciones crecientes sobre la liberación de glutamato (Glu) inducida por veratridina en sinaptosomas de hipocampo. Tomada de Sitges M (2011). Antiepileptic Drugs Targeting Cerebral Presynaptic Ion Channels Reduce Cerebral Excitability Decreasing Glutamate Release, Novel Treatment of Epilepsy (pp111-132), Prof. Humberto Foyaca-Sibat (Ed.).

2.2 Depresión y fármacos antidepresivos

La depresión, al igual que la epilepsia es un síndrome heterogéneo que comprende varios trastornos con diferentes causas y fisiopatologías. La depresión es un padecimiento psiquiátrico crónico, recurrente y potencialmente mortal que afecta hasta 20% de la población mundial y se encuentra dentro de las 10 principales causas de mortalidad de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (Miret y col. 2013). Los síntomas centrales de la depresión incluyen estados de ánimo abatido, anhedonia (incapacidad para experimentar placer mediante recompensas naturales), irritabilidad e incluso alteraciones en el apetito, en el sueño, en la memoria y en otras habilidades cognitivas (Nestler y col. 2002). A pesar de la prevalencia de la depresión y su considerable impacto, el conocimiento acerca de su fisiopatología es limitado en comparación con otros padecimientos crónicos. Esta falta de conocimiento posiblemente se debe a tres cuestiones principales: (1) en la mayoría de los casos la depresión es idiopática; (2) los cambios patológicos en el cerebro son detectados principalmente en estudios post-mortem; y (3) al ser un padecimiento tan heterogéneo cuyos síntomas centrales recaen sobre el estado de ánimo del individuo, el diagnóstico de la depresión suele ser subjetivo. Sin embargo, estudios en modelos animales de depresión, de imagenología de cerebro humano y estudios post-mortem de tejido cerebral de pacientes con depresión apoyan la contribución de regiones y circuitos cerebrales específicos (Berton y Nestler 2006). Regiones límbicas como el hipocampo y las áreas frontales de la corteza cerebral, se han asociado con las anormalidades cognitivas que suelen presentarse en los pacientes con depresión. Asimismo, la amígdala, que participa en el establecimiento de las asociaciones entre estímulos aversivos o de recompensa y las señales ambientales asociadas, también se ha involucrado en la patología de la depresión. Con base en la prevalencia de anhedonia que presentan la mayoría de las pacientes con depresión, se ha propuesto que alteraciones en los sistemas de recompensa cerebrales, tales como las neuronas dopaminérgicas del Área ventral tegmental y sus diferentes regiones blanco particularmente el núcleo accumbens, también podrían estar involucradas. Además, anormalidades en el apetito, en el sueño y en los ritmos circadianos sugieren la participación del hipotálamo (Drevets 2001).

Por otro lado, con respecto a los circuitos neuronales involucrados en la depresión, la hipótesis clásica de las monoaminas establece que la base bioquímica y neuroanatómica que subyace a la depresión es una deficiencia en los sistemas centrales noradrenérgicos y/o serotoninérgicos y que la restauración farmacológica de esta deficiencia monoaminérgica podría restablecer las funciones normales en pacientes con depresión (Hirschfeld 2000). Esta hipótesis se originó en los años 50's a partir de observaciones clínicas obtenidas de estudios acerca de dos compuestos desarrollados para condiciones no psiquiátricas: la iproniazida y la imipramina que tenían potentes efectos antidepresivos en humanos. Más adelante se mostró que ambos compuestos aumentaban la neurotransmisión de serotonina y de noradrenalina. También, se encontró que la reserpina, un agente que interfiere con el almacenamiento vesicular de monoaminas cerebrales y que era empleado en la clínica como antihipertensivo, producía síntomas depresivos en un grupo de pacientes hipertensos. Esta primera generación de fármacos proporcionó una base para el desarrollo de nuevas clases de antidepresivos que ofrecen un mejor índice terapéutico y menores tasas de efectos secundarios para la mayoría de los pacientes. Sin embargo, los "nuevos antidepresivos" todavía están diseñados para aumentar la transmisión de las monoaminas de manera aguda, ya sea inhibiendo la recaptura de la serotonina (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina o ISRS) o de noradrenalina (inhibidores selectivos de la recaptura de noradrenalina o ISRN), así como inhibiendo la degradación de las aminas cerebrales (por ejemplo, inhibidores de la enzima Monoamino-oxidasa). Como estos fármacos más recientes tienen un mecanismo de acción similar al de los primeros fármacos desarrollados fortuitamente, su eficacia intrínseca y la gama de los pacientes para los que el tratamiento tiene éxito siguen siendo limitados (Berton y Nestler 2006). No obstante, la causa de la depresión está lejos de ser una simple deficiencia de monoaminas cerebrales considerando que todos los fármacos antidepresivos disponibles se deben administrar por lo menos varias semanas para que sus efectos sobre los síntomas de la depresión se manifiesten. Actualmente se piensa que el aumento agudo en la concentración sináptica de monoaminas que inducen los antidepresivos puede producir cambios neuroplásticos secundarios que tienen lugar en una escala de tiempo más larga e implican cambios transcripcionales y traduccionales

(Berton y Nestler 2006). Incluso, recientemente se ha propuesto que la patología de la depresión podría estar asociada con procesos inflamatorios en el sistema nervioso central particularmente con el aumento de citocinas proinflamatorias en el cerebro (Leonard y Maes 2012; Catena-Dell'osso y col. 2013).

Aunque los tratamientos actuales para la depresión son generalmente seguros y eficaces, están lejos de ser ideales. Además de la necesidad de administrar los fármacos durante semanas o meses para obtener beneficios clínicos, los efectos secundarios siguen siendo un problema grave, incluso con los fármacos más nuevos. Más importante aún, cerca del 50% de todos los pacientes con depresión muestra una remisión completa con un tratamiento optimizado, incluyendo la combinación de varios fármacos y la psicoterapia. Por lo tanto todavía hay una necesidad de tratamientos con efectos más rápidos, más seguros y eficaces para la depresión, particularmente en pacientes con otras condiciones neurológicas existentes como es el caso de la epilepsia. Los tratamientos antidepresivos que están actualmente disponibles en la clínica se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos antidepresivos disponibles

Tipo de tratamiento	Mecanismo de acción conocido	Ejemplos
Farmacológico		
Tricíclicos	Inhibición mixta de los transportadores serotoninérgicos y noradrenérgicos	Imipramina, desipramina
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina	Inhibición del transportador serotoninérgico	Fluoxetina, citalopram, sertralina
Inhibidores selectivos de la recaptura de noradrenalina	Inhibición del transportador noradrenérgico	Atomoxetina, reboxetina
Inhibidores mixtos	Inhibición mixta de los transportadores serotoninérgicos y noradrenérgicos	Venlafaxina, duloxetina
Inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO)	Inhibición de la MAO _A . La inhibición de la MAO _B no tiene efectos antidepresivos	Tranilcipromina, fenelzina
Litio	Diversas acciones moleculares (inhibición de fosfatasa de fosfatidilinositol, de adenilil ciclasas, y de proteínas G), se desconoce cuales acciones son responsables de sus efectos antidepresivos	
Antidepresivos atípicos	Se desconocen los mecanismos que subyacen al efecto antidepresivo	Bupropion, mirtazapina, tianeptina
No-farmacológico		
Terapia electroconvulsiva	Estimulación general del cerebro	
Estimulación magnética	¿Estimulación general del cerebro? Un campo magnético se cree que afecta al cerebro al inducir corrientes eléctricas y despolarización neuronal.	
Estimulación del nervio vago	Se desconoce	
Estimulación cerebral profunda		
Psicoterapias		Cognitivo-conductual

Modificada de Berton y Nestler 2006 Nature Neuroscience 7,137-151

2.3 Sertralina

La sertralina [1S, 4S-N-metil-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilamina] cuya fórmula se muestra en la figura 3, se clasifica como inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS) (Koe y col. 1983; Bolden-Watson y Richelson 1993; Tatsumi y col. 1997; Sheehan y Kamijima 2009) y es el segundo inhibidor competitivo más potente del transportador de esta indolamina cerebral (Richelson 1994; Zhou y col. 2009).

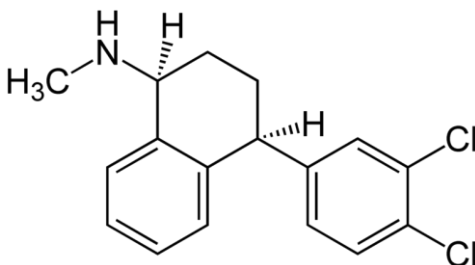


Figura 3. Fórmula semidesarrollada de la sertralina.

La sertralina está ampliamente prescrita para el tratamiento de la depresión (Sheehan y Kamijima 2009). Este fármaco fue el segundo antidepresivo más prescrito en el mercado americano en 2011 según la FDA (Grohol 2012) y su perfil de efectos secundarios es menor en comparación con otros ISRS (Ferguson 2001). Para el tratamiento de la depresión, el rango de dosis terapéutico de la sertralina va de 50 a 200 mg/día. Cabe mencionar que cerca del 66% de los pacientes se controlan satisfactoriamente con la dosis terapéutica más baja (50 mg/día) (Burke y Preskorn 1999; Sheehan y Kamijima 2009). Estudios farmacodinámicos sugieren que la sertralina sigue una farmacocinética lineal con una vida media de 24 a 36 h por lo que se puede administrar una sola dosis por día (Ronfeld y col. 1997; Mandrioli y col. 2012). Aunque la información sobre el metabolismo de la sertralina es limitada, se sabe que el metabolismo hepático es su vía de eliminación más importante. La N-desmetilación es el paso metabólico principal en la biotransformación de la sertralina. El metabolito N-desmetilado (N-desmetilsertralina) se elimina más lentamente debido a que tiene una vida media más larga que el fármaco original aunque no es farmacológicamente activo (Tremaine y col. 1989; Sprouse y col. 1996). Se ha demostrado que varias enzimas de la familia de citocromos (CYP) P450 cataliza la N-desmetilación de sertralina, siendo CYP2B6 la principal enzima seguida por CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 y

CYP2D6. La observación de que múltiples enzimas parecen estar implicadas en el metabolismo de sertralina sugiere que ningún fármaco administrado simultáneamente puede alterar sustancialmente la farmacocinética de la sertralina lo que le confiere una ventaja adicional en la polifarmacia (Obach y col. 2005).

Además de ser un conocido inhibidor de la recaptura de serotonina, en dos estudios electrofisiológicos se encontró que la sertralina también es capaz de modular a los canales de sodio. En cultivos de células embrionarias de riñón humano, la sertralina disminuyó la actividad del canal de sodio tipo $hNAV$ 1.3 evocada por estimulación de campo eléctrico (Huang y col. 2006); y en células GH3 de pituitaria de rata que expresan endógenamente las isoformas neuronales de canal de sodio tipo Nav 1.1, 1.2, 1.3 y Nav 1.6, la sertralina también inhibió las corrientes persistentes de sodio (Wang y col. 2008). Estos hallazgos en distintas preparaciones resultan interesantes a la luz de que la inhibición de los canales de Na^+ dependientes de voltaje es uno de los principales mecanismos propuestos por el que los antiepilépticos más efectivos controlan la excitabilidad neuronal excesiva que acompaña a las convulsiones epilépticas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en la elevada incidencia de trastornos psiquiátricos en pacientes epilépticos siendo la depresión el indicador más fuerte de mala calidad de vida en análisis clínicos, (Gilliam 2002; Kanner 2003) es necesario profundizar en el mecanismo de acción de fármacos antidepresivos como la sertralina con el fin de encontrar un tratamiento farmacológico que permita el control de los síntomas de la depresión en pacientes con epilepsia sin aumentar la severidad de las convulsiones e incluso identificar un fármaco antidepresivo con el potencial de controlar las convulsiones en estos pacientes.

4. HIPÓTESIS

Considerando que la sertralina disminuyó la actividad de los canales de Na^+ en dos diferentes preparaciones, y que en las terminales nerviosas cerebrales tanto el aumento en la concentración interna de Na^+ como la liberación de Glu inducidos por veratridina son dos respuestas sensibles a los fármacos anticonvulsivos que inhiben a los canales de Na^+ , la sertralina al actuar como un bloqueador de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ , posiblemente inhibe las respuestas inducidas con veratridina *in vitro* y tiene un efecto anticonvulsivo potencial *in vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

En el presente trabajo exploramos *in vitro* los efectos de la sertralina sobre los canales de Na⁺ en terminales nerviosas cerebrales aisladas que es donde se encuentran particularmente concentrados estos canales, y sobre los cambios conductuales y electroencefalográficos inducidos farmacológicamente en modelos animales *in vivo*.

5.2 *Objetivos particulares*

Estudio I:

- Explorar una posible acción de la sertralina sobre el aumento en la permeabilidad de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na⁺ mediante el estudio de sus efectos sobre el aumento en la concentración interna de Na⁺ y sobre la liberación de varios neurotransmisores, incluyendo el neurotransmisor excitador glutamato en terminales nerviosas aisladas de hipocampo en condiciones de reposo y de despolarización con veratridina.

Estudio II:

- Investigar una acción anticonvulsiva potencial de la sertralina sobre las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, sobre la actividad epileptiforme y el aumento en la amplitud del EEG inducidos con los agentes convulsivos 4-aminopiridina y pentilentetrazol.
- Comparar los efectos de la sertralina con los efectos del fármaco antiepiléptico clásico carbamazepina.

6. MÉTODOS

ESTUDIO I: Experimentos *in vitro*

6.1 Preparación de las terminales nerviosas aisladas de hipocampo

Las terminales nerviosas aisladas de cerebro o sinaptosomas son la porción pre-sináptica resultante de la separación abrupta del axón durante la homogenización del tejido. Los sinaptosomas llevan acabo reacciones metabólicas características de las células intactas, así como procesos neuronales tales como la despolarización y la liberación y recaptura de neurotransmisores (Erecinska y col. 1996).

Para obtener la preparación sinaptosomal, los hipocampos de ratas Wistar macho (250-300 g) fueron disecados, colocados inmediatamente en una solución de sacarosa isotónica 0.32 M (1:10 peso/vol) y fueron homogenizados (6 golpes de pistilo a 2000 rpm). La suspensión resultante se centrifugó a 1500 x *g* por 10 minutos y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 9000 x *g* por 20 minutos para obtener la fracción sinaptosomal cruda, P2, que se resuspendió en un buffer Krebs Ringer HEPES estándar (KRH). El procedimiento anterior se realizó a 4 °C. Para los experimentos de liberación de [³H]Glu, la fracción P2 se purificó siguiendo el método previamente descrito (Rodriguez y Sitges 1996). La composición del KRH en miliMolar es: NaCl 127, KH₂PO₄ 1.2, KCl 3.37, CaCl₂ 1, MgSO₄ 1.18, HEPES-Na⁺ 20 y dextrosa 5.6, el pH se ajustó a 7.4 burbujeando con una mezcla de CO₂/O₂. Para eliminar la contribución de los canales de calcio en la respuesta a la despolarización con veratridina, los sinaptosomas fueron resuspendidos o perfundidos con KRH en donde el Ca²⁺ se sustituyó por EGTA 100 mM. Donde se indica el KRH libre de Ca²⁺ también contenía: sertralina, serotonina (5-HT), o tetrodotoxina a las concentraciones indicadas en las figuras. Las terminales nerviosas expuestas a estas condiciones fueron despolarizadas con el mismo medio pero que contenía veratridina a una concentración final de 10 μM. En algunos experimentos, los efectos de los fármacos también fueron estudiados en sinaptosomas suspendidos en KRH con Ca²⁺.

6.2 Determinación de la concentración interna de Na⁺

La cuantificación de la concentración interna de Na⁺ se realizó utilizando el indicador fluorescente selectivo para este ion, SBFI-AM (sodium-binding benzofuran isophthalate- acetoxymethyl ester) mediante un método descrito previamente (Sitges y col. 1998; Sitges y col. 2006) cuyo principio se ilustra en la figura 4. Brevemente, la fracción sinaptosomal P2 se incubó con el indicador (10 μM) por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, el indicador no incorporado se eliminó mediante dos ciclos de dilución y centrifugación (13000 x *g* por 10 minutos cada centrifugación). El pellet resultante se resuspendió en 1.6 ml de KRH libre de Ca²⁺ y se mantuvo a 4°C en la oscuridad. La concentración interna de Na⁺ se estimó en intervalos de 3 a 5 s a partir de la fluorescencia emitida por el marcador en alícuotas (150 μl) de esta suspensión sinaptosomal colocadas en celdas. La fluorescencia fue detectada con un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS-50) conectado a una computadora compatible. En los experimentos cuyos resultados se muestran en las figuras 6-11, la proporción 340/380 fue monitoreada en condiciones basales por varios minutos en ausencia o presencia de sertralina o de 5-HT antes de la despolarización. Una alícuota de una solución concentrada de veratridina se agregó a la celda (10 μM concentración final) para despolarizar a los sinaptosomas. En los experimentos cuyos resultados se muestran en las figuras 10 y 11, después de monitorear la proporción 340/380 basal por varios minutos, los sinaptosomas fueron expuestos a veratridina 10 μM y posteriormente a los diferentes agentes estudiados (5-HT, sertralina o tetrodotoxina). Después de cada adición los datos fueron colectados por varios minutos. La concentración milimolar de Na⁺ dentro de las terminales se estimó usando una curva de calibración respectiva obtenida en paralelo para cada experimento como se reportó en estudios previos (Galindo y Sitges 2004; Sitges y col. 2006).

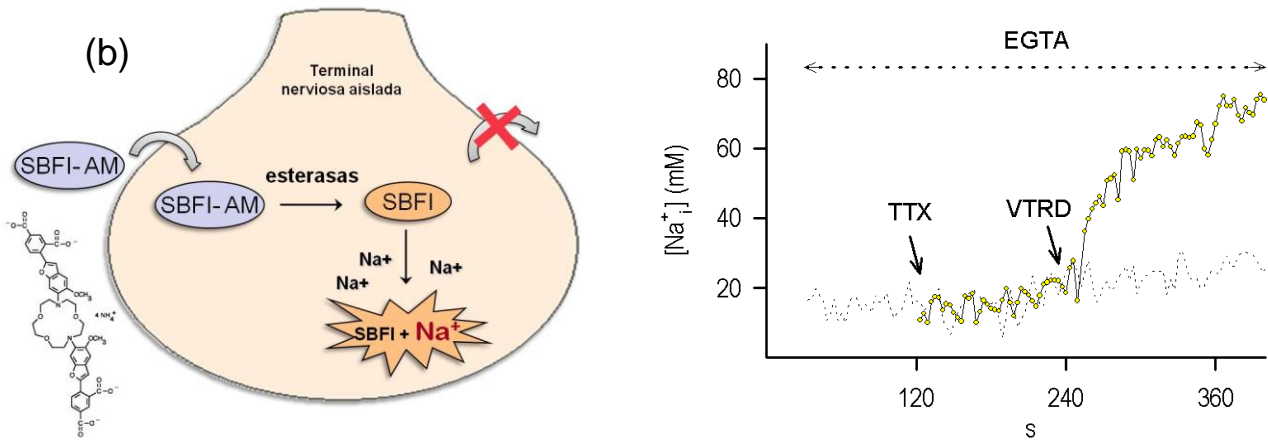


Figura 4. Principio del método de determinación de la concentración interna de Na^+ en los sinaptosomas. (a) Representación de una terminal nerviosa aislada que ilustra el fundamento de esta estrategia experimental. La forma acetoximetilester (AM) del SBFI es permeable a la membrana y una vez incorporada a la terminal es hidrolizada por esterasas inespecíficas intracelulares. La molécula de SBFI liberada es impermeable a la membrana y cambia su intensidad de fluorescencia al unirse al Na^+ en el citosol, este cambio se puede detectar a lo largo del tiempo en una población de terminales sometidas a diferentes condiciones experimentales. (b) Empleando este método se demostró que el aumento en la permeabilidad de los canales de Na^+ inducido con veratridina (VTRD) es sensible al bloqueador de los canales de Na^+ , tetrodotoxina (TTX) y es independiente de la concentración externa de Ca^{2+} (Sitges y col. 1998 *Neurochem Int* 32, 177-190).

6.3 Experimentos de liberación de [^3H]Glu precargado a las terminales

Aproximadamente 1.6 mg de las terminales aisladas de hipocampo se resuspendieron en KRH (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron con [^3H]Glu (1 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ de proteína) a 37 $^\circ\text{C}$ por 25 minutos. Alícuotas (1 ml) de estas terminales precargadas se colocaron sobre filtros de 0.65 μm (Millipore) puestos en cámaras multiperforadas. Después de lavar la radiactividad no incorporada mediante superfusión con KRH libre de Ca^{2+} , el flujo se ajustó a 0.5 ml/min y las fracciones fueron colectadas a intervalos de 1 minutos durante varios minutos. Para los experimentos que se muestran en la figura 7, los sinaptosomas fueron perfundidos primero con KRH libre de Ca^{2+} en ausencia (control) o en presencia de sertralina a concentraciones crecientes y después con el mismo medio respectivo que además contenía veratridina 10 μM . La radioactividad liberada en cada fracción que se recolectó y la que quedó en los filtros al final del experimento se cuantificó en un contador de centelleo (LS 6500 Beckman Scintillation Counter). Los resultados están expresados en porcentaje liberado en cada minuto de la radiactividad total (*i.e.* la radiactividad liberada en los minutos de perfusión más la que permaneció en el interior de las terminales).

6.4 Detección de neurotransmisores endógenos

Los sinaptosomas de hipocampo resuspendidos en KRH libre de Ca^{2+} o en KRH, como se indica en las tablas 3-6 fueron pre-incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Alícuotas de $500\text{ }\mu\text{l}$ de esta suspensión (conteniendo $926 \pm 84\text{ }\mu\text{g}$ de proteína/ml) fueron incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos bajo las diferentes condiciones experimentales. A saber, ausencia o presencia de: sertralina ($25\text{ }\mu\text{M}$), veratridina ($10\text{ }\mu\text{M}$) o sertralina $25\text{ }\mu\text{M}$ más veratridina $10\text{ }\mu\text{M}$. La incubación se detuvo por centrifugación a $12\text{ }000 \times g$ por 5 minutos. Los sobrenadantes resultantes que contenían los neurotransmisores liberados fueron transferidos a viales, se les agregó una alícuota de una mezcla de ácido perclórico PCA/EDTA ($0.1\text{M}/ 0.1\text{ mM}$ concentración final), y fueron almacenados a -40°C para el análisis posterior. Los pellets resultantes fueron resuspendidos en $500\text{ }\mu\text{l}$ de una solución de PCA 0.1 M / EDTA 0.1 mM pH 1.4 , y mezclados vigorosamente en vortex. Estas condiciones drásticas garantizan la descarga completa de neurotransmisores (5-HT, glutamato y GABA) que estuvieran dentro de los sinaptosomas. Con la finalidad de estandarizar las concentraciones de neurotransmisores por miligramo de proteína sinaptosomal, la suspensión conteniendo los sinaptosomas rotos se centrifugó. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 1 ml de solución de NaOH 5 mM y se utilizaron para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry (Lowry y col. 1951). Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación, que contenían los neurotransmisores que se encontraban dentro de cada muestra de sinaptosomas, fueron guardados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis posterior. Las muestras que contenían los neurotransmisores liberados y retenidos fueron inyectadas en el sistema HPLC.

6.5 Determinación de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA

Veinte microlitros de las muestras suspendidas en PCA/EDTA fueron inyectados directamente en el sistema HPLC (Waters) para su análisis. El sistema HPLC consiste en una bomba de suministro (modelo 510), un inyector Rheodyne, una columna analítica (resolve, C18, $150 \times 3.9\text{ mm}$ de diámetro interno, tamaño de partícula de $5\text{ }\mu\text{m}$), controlado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un detector electroquímico (modelo DECADE), con carbón vidriado usado a un voltaje de $+0.8\text{ V}$ contra un electrodo de KCl (3M) de referencia (rango 1 nA). Una fase móvil

compuesta por un buffer de ácido orto-fosfórico 50 mM/ácido cítrico 50 mM, pH 3.1 ajustado con KOH, conteniendo metanol 13% (v/v), ácido octanosulfónico 100 mg/l y EDTA20 mg/l, una tasa de flujo de 1 ml/min se aplicó para la elución de los 5-HT y de su principal metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en las muestras experimentales fueron calculadas con curvas de calibración obtenidas de la inyección de concentraciones crecientes de una mezcla de estándares externos (5-HT, 5-HIAA, glutamato y GABA) al sistema de HPLC. La liberación de 5-HT endógena se refiere al balance entre la 5-HT liberada y la 5-HT recapturada de nuevo en 10 minutos de incubación. La 5-HT total (o el 5-HIAA total) se refiere a la suma de la 5-HT (o 5-HIAA) liberada más la 5-HT (o 5-HIAA) retenida en una alícuota de sinaptosomas expuestos a una condición experimental específica.

Los resultados se expresaron como la concentración en pmol/mg de proteína sinaptosomal de 5-HT o 5-HIAA liberados o retenidos dentro de los sinaptosomas.

6.6 Determinación de las concentraciones de glutamato (Glu) y GABA

Veinte microlitros de cada muestra resuspendida en 0.1 M PCA/0.1 EDTA fueron mezclados con 40 µl de *o*-ftalaldehído. Después de 120 s (tiempo estricto), una alícuota de 20 µl fue inyectada en el sistema de HPLC. Se usó una columna analítica (Nova-pak C-18, 75 x 3.9 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 10µm) a 25°C y un detector de fluorescencia ajustado a 360 nm (longitud de onda de excitación) y 450 nm (longitud de emisión). Para la elución de los aminoácidos se aplicó un programa de elución de gradiente lineal: eluente A (30 mM de buffer de acetato de sodio, pH 6.8) de 90% a 70%, y un eluente B (metanol) de 10% a 30%, a una tasa de flujo de 1 ml/min. Las concentraciones de Glu y GABA en las muestras experimentales fueron calculadas con las curvas de calibración mencionadas en el apartado anterior. Los resultados se expresaron como la concentración en nmol/mg de proteína sinaptosomal de neurotransmisor aminoácido (Glu o GABA) liberado o retenido dentro de los sinaptosomas.

ESTUDIO II: Experimentos *in vivo*

6.7 Animales experimentales

Ciento ocho ratas macho Wistar ($310 \pm 2g$) fueron incluidas en los experimentos que se describen a continuación. Treinta y un animales fueron utilizados para evaluar los cambios conductuales inducidos por 4-aminopiridina (4-AP) o pentilentetrazol (PTZ) a dosis convulsivas en los grupos de animales control y en los grupos de animales experimentales previamente tratados con sertralina o carbamazepina. Setenta y siete animales adicionales fueron utilizados para investigar los efectos de la sertralina y la carbamazepina sobre los cambios en el electroencefalograma (EEG) inducidos por los agentes convulsivos. Los registros de EEG se obtuvieron en animales bajo anestesia con el fin de minimizar el movimiento, el estrés y la actividad muscular durante las convulsiones.

6.8 Evaluación de los cambios conductuales inducidos por los agentes pro-convulsivos 4-AP y PTZ

Cuatro grupos de animales (4 animales por grupo) fueron utilizados en los experimentos diseñados para estudiar los efectos de la sertralina y carbamazepina sobre los cambios conductuales y sobre las convulsiones inducidas con 4-AP (2.5 mg/kg, i.p.). A un grupo de animales se le administró (i.p.) 2.5 mg/kg de sertralina, a un segundo grupo, 25 mg/kg de sertralina, al tercer grupo 25 mg/kg de carbamazepina, mientras que el grupo control recibió el vehículo usado para disolver la sertralina (DMSO 30%/ salina70%) o DMSO, que es el vehículo que se usó para disolver la carbamazepina. En los animales previamente administrados con sertralina, este fármaco se inyectó 4 h antes de la exposición a los agentes convulsivos. Elegimos este tiempo debido a que se ha reportado que 4 h después de su administración, la sertralina alcanza una concentración máxima en tejido de cerebro de rata (Tremaine y col. 1989). La carbamazepina se administró 2 h antes de la exposición al agente convulsivo, tomando en cuenta el tiempo en el que se alcanza la máxima concentración de carbamazepina en cerebro de rata (Graumlich y col. 2000). Los animales pre- administrados con vehículo, sertralina o carbamazepina fueron observados durante 60 minutos a partir de la inyección de 4-AP. Se midió la latencia (en minutos), a los principales

cambios conductuales, a saber: piloerección, acicalamiento (grooming) y “sacudidas de perro mojado” (wet dog shakes), así como la latencia y duración de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas.

Con el propósito de estudiar el efecto de la sertralina sobre las convulsiones inducidas por PTZ, tres grupos de animales que incluían 5 animales por grupo fueron usados. El PTZ se disolvió en solución salina y se administró i.p. a una dosis de 50 mg/kg. Un grupo fue inyectado (i.p.) con sertralina a una dosis baja (2.5 mg/kg), un segundo grupo con sertralina a una dosis alta (25 mg/kg), y el grupo control fue inyectado con el vehículo usado para disolver la sertralina. Los animales fueron observados durante 30 minutos a partir de la inyección de PTZ y se midió la latencia a la primera convulsión mioclónica y a la primera convulsión tónico-clónica generalizada, así como la duración de esta última.

6.9 Detección de la actividad epileptiforme encefalográfica inducida por 4-AP o PTZ

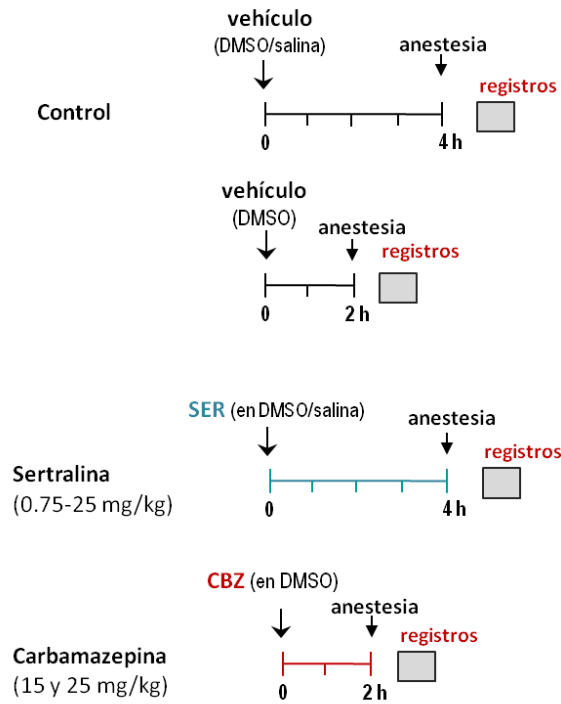
La susceptibilidad a la actividad epileptiforme del EEG inducida por 4-AP se estudió en tres grupos animales: un grupo control inyectado con vehículo, un grupo pre-tratado con 2.5 mg/kg de sertralina y un grupo pre-tratado con 25 mg/kg de carbamazepina. El efecto de la administración repetida de sertralina a dosis bajas sobre la actividad epileptiforme del EEG inducida por 4-AP también fue estudiado. Tres grupos adicionales se incluyeron con este propósito: un grupo control en el que los animales fueron inyectados con vehículo diariamente durante siete días, un grupo de animales pre-inyectados con 0.75 mg/kg de sertralina diariamente durante siete días, y un grupo que recibió una sola inyección de sertralina 0.75 mg/kg. Por otro lado, la susceptibilidad a la actividad epileptiforme del EEG inducida por PTZ fue investigada en nueve grupos: siete grupos de animales pre-inyectados con sertralina en un rango de dosis desde 2.5 a 25 mg/kg, y dos grupos de animales pre-inyectados con carbamazepina a dosis de 15 y 25 mg/kg. La figura 5 ilustra de manera resumida la estrategia experimental y el orden de las inyecciones en los animales en los que se obtuvo el EEG.

Para evaluar los cambios en la excitabilidad cortical inducidos por 4-AP o por PTZ, utilizamos un sistema Nihon Kohden Neuropack IV-Mini (MEB-5304 K). Antes de obtener los registros de EEG, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina

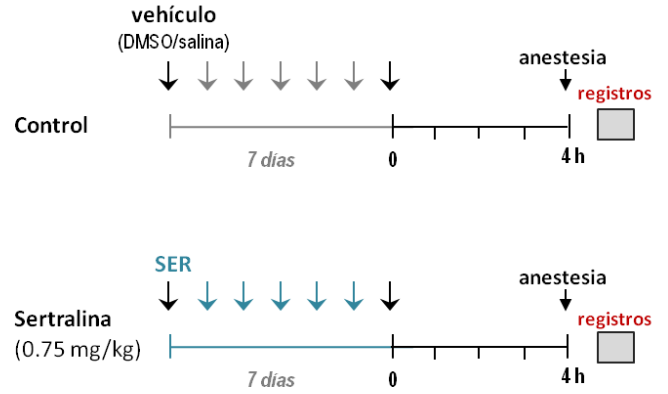
(50 mg/kg/10 mg/kg, i.p.). Electrodo subcutáneos de aguja se colocaron rápidamente en el área temporal izquierda (electrodo activo) y sobre el área frontal izquierda, entre la línea media y la porción arqueada de la cresta orbital (electrodo de referencia). Una vez que la actividad cortical basal del EEG se había registrado durante 2 minutos, el animal fue volteado cuidadosamente y se le inyectó 4-AP (2.5 mg/kg i.p.) o PTZ (50 mg/kg, i.p.). En el caso de los animales inyectados con 4-AP, la actividad cortical en el EEG fue registrada durante 2 minutos en tres intervalos de tiempo después de la administración de 4-AP, es decir, de 9 a 11, de 19 a 21 y de 29 a 31 minutos. En el caso de los animales inyectados con PTZ, la actividad cortical en el EEG se registró durante 2 minutos a tres intervalos de tiempo después de PTZ, a saber, de 1 a 3, de 9 a 11, y de 29 a 31 minutos. Estos intervalos de tiempo se eligieron con base en estudios anteriores donde se investigaron los efectos de estos agentes convulsivos sobre la actividad epileptiforme del EEG en el cobayo (Nekrassov y Sitges 2003). Para completar 2 minutos, se obtuvieron doce registros consecutivos de 10 segundos antes de la inyección del agente pro-convulsivo y en los intervalos de tiempo específicos después de su inyección. Estos registros se almacenaron en discos flexibles para su análisis. Para los experimentos de EEG, la sertralina y la carbamazepina también fueron pre-administradas 4 o 2 h respectivamente, antes de la administración del agente pro-convulsivo.

En un intento por cuantificar algunos de los cambios en el EEG producidos por los agentes convulsivos en los animales expuestos a las diferentes condiciones experimentales, el valor (en μV) de la amplitud del pico máximo (*hpav*) de los registros de EEG tomados antes (basal) y en los intervalos de tiempo específicos después de la administración de los agentes pro-convulsivos se midió en cada uno de los animales. Hemos definido el EEG *hpav* como el promedio de los 12 picos no interrumpidos más altos tomando desde su extremo positivo al extremo negativo (en μV) obtenidos en los 12 registros consecutivos de 10 s cada uno (intervalo total de 2 minutos). La diferencia entre las amplitudes de los 12 picos obtenidos en un intervalo de tiempo particular fue pequeña (5% en la mayoría de los casos y nunca más de 10%), por lo que estos promedios se utilizaron directamente para calcular el promedio del *hpav* (\pm ESM) del EEG en cada grupo de animales.

Grupos animales (administración aguda)



Grupos animales (administración crónica)



Registros de EEG

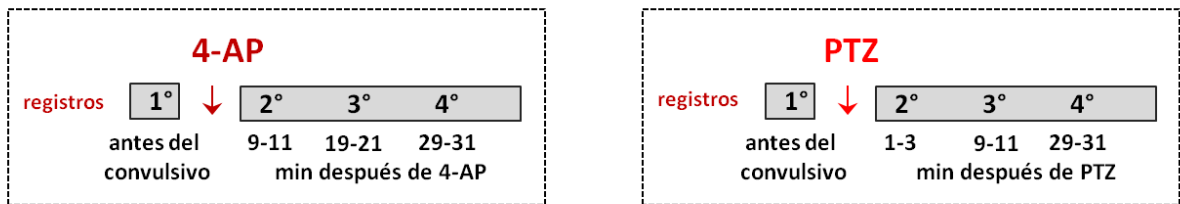


Figura 5. Esquema del procedimiento experimental para estudiar los efectos de la sertralina (SER) o de carbamazepina (CBZ) sobre los cambios en la actividad epileptiforme del EEG inducidos por 4-aminopiridina (4-AP) o por pentilentetrazol (PTZ) a dosis convulsivas.

6.11 Análisis estadístico

Para las evaluaciones estadísticas se utilizaron análisis de varianza (ANOVA). La diferencia entre los datos fue considerada estadísticamente significativa si $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Los resultados que comprende el presente trabajo están descritos en detalle en cada uno de los artículos incluidos en la sección Anexos, por lo que a continuación hago un resumen de los principales hallazgos.

ESTUDIO I

7.1.1 Efecto de sertralina sobre el aumento en la concentración interna de Na^+ y sobre la liberación de [^3H]Glu inducidos por veratridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo

Con el propósito de explorar un posible efecto inhibitorio de la sertralina sobre los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ , medimos tanto los cambios en la concentración interna de este ión como en la liberación del neurotransmisor excitador, glutamato (Glu) en terminales nerviosas aisladas de hipocampo que fueron expuestas a sertralina antes y después de la despolarización con veratridina. Con el objetivo de eliminar cualquier contribución de los canales de Ca^{2+} en el aumento en la concentración interna de Na^+ y en liberación de Glu inducidos con veratridina, las series experimentales representadas en las figuras 6 y 7 se llevaron a cabo en ausencia de Ca^{2+} externo.

Las figuras 6 y 7 muestran que la sertralina en un rango micromolar bajo, inhibe progresivamente tanto el aumento en el Na^+ como la liberación de glutamato radioactivo ([^3H]Glu) inducido por despolarización con veratridina. Cabe destacar que en condiciones de reposo, es decir, antes de la exposición a veratridina, la concentración interna de Na^+ o la liberación basal [^3H]Glu no se modificaron en presencia de sertralina.

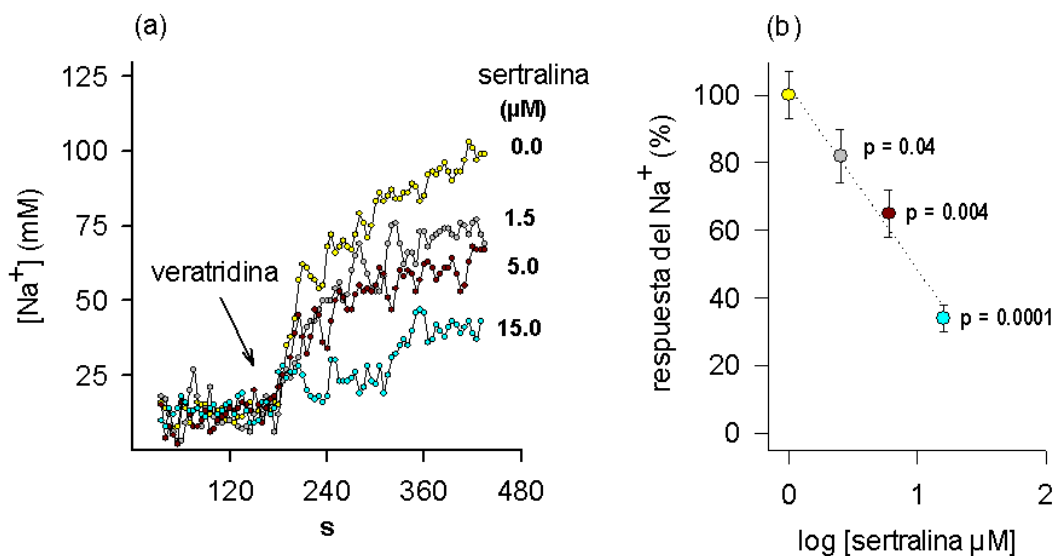


Figura 6. La sertralina de manera dependiente de dosis disminuye el aumento en Na⁺ inducido con veratridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo. La concentración citoplásmica de Na⁺ se estimó con la técnica descrita en Métodos en terminales precargadas con SBFI. Los puntos se tomaron en intervalos de 5 s. Después de detectar durante tres minutos el nivel basal de Na⁺ en ausencia (0 μM) o en presencia de sertralina a las concentraciones indicadas, las terminales fueron expuestas a veratridina 10 μM y la concentración citoplásmica de Na⁺ fue monitoreada durante varios minutos más. **(a)** Experimento representativo que muestra la respuesta del Na⁺ inducida con veratridina en ausencia o presencia de sertralina 1.5, 5 o 15 μM. **(b)** Inhibición dosis dependiente que ejerce la sertralina a concentraciones crecientes sobre el aumento en el Na⁺ inducido con veratridina (en porcentaje del control). Los resultados son el promedio ± ESM de 4 experimentos en preparaciones independientes. Las barras de error se omitieron para dar claridad a la gráfica, en ningún caso los errores exceden el 10% del valor promedio para cada punto.

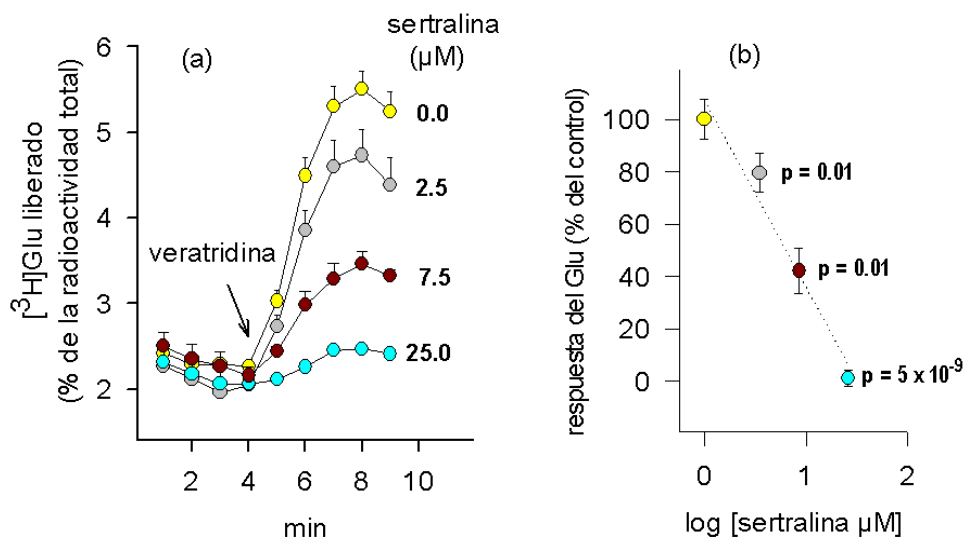


Figura 7. La sertralina de manera dependiente de dosis inhibe la liberación de [^3H]Glu inducida con veratridina. (a) Las terminales nerviosas aisladas de hipocampo fueron precargadas con [^3H]Glu y perfundidas con KRH-sin Ca^{2+} en ausencia (círculos amarillos) o en presencia de sertralina a las concentraciones indicadas durante varios minutos. Donde se indica (flecha), el medio se reemplazó rápidamente por uno que contenía veratridina 10 μM . **(b)** Liberación neta de [^3H]Glu inducida con veratridina durante 4 minutos (expresada en porcentaje del control) en ausencia (cero) o en presencia del log de la concentración indicada de sertralina (en μM). La respuesta a veratridina en ausencia de sertralina corresponde al 100%. La significancia estadística entre la respuesta inducida con veratridina en sinaptosomas control y en los sinaptosomas tratados con sertralina esta indicada para cada concentración de sertralina. Los resultados son el promedio \pm ESM de al menos 5 experimentos en preparaciones independientes.

7.1.2 Efecto de la ausencia de gradiente de Na^+ o de la presencia de tetrodotoxina sobre la liberación de $[\text{}^3\text{H}]\text{Glu}$ inducida con veratridina

La figura 8 muestra que el aumento en la liberación de $[\text{}^3\text{H}]\text{Glu}$ evocada con veratridina en terminales de hipocampo perfundidas con un medio libre de Ca^{2+} es abolido en ausencia de un gradiente de Na^+ (figura 8b) o cuando los canales de Na^+ son bloqueados con tetrodotoxina (figura 8c), una toxina de origen natural que se une de manera irreversible al poro externo del canal de Na^+ bloqueando así la entrada de este ion a la terminal.

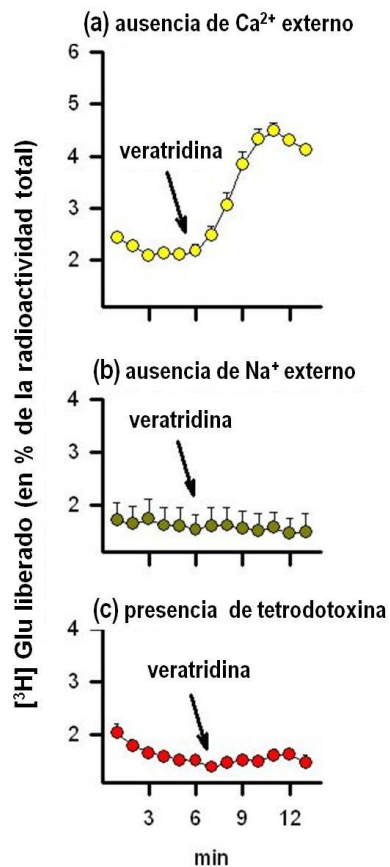


Figura 8. El aumento en la liberación de $[\text{}^3\text{H}]\text{Glu}$ inducida con veratridina en sinaptosomas de hipocampo depende de la entrada de Na^+ a través de canales de Na^+ sensibles a tetrodotoxina. Los sinaptosomas de hipocampo precargados con $[\text{}^3\text{H}]\text{Glu}$ fueron perfundidos con (a) KRH sin Ca^{2+} , (b) KRH sin Na^+ o (c) KRH que contenía $1 \mu\text{M}$ de tetrodotoxina. Donde se indica (flecha), el medio se reemplazó rápidamente por uno que también contenía veratridina $10 \mu\text{M}$. Los resultados son el promedio \pm ESM de 3 experimentos en preparaciones independientes.

7.1.3 Efectos simultáneos de sertralina sobre la distribución de los neurotransmisores endógenos 5-HT, Glu y GABA en ausencia o en presencia de veratridina en condiciones libres de Ca²⁺

Considerando que la sertralina se clasifica como un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (5-HT), investigamos su efecto sobre la concentración externa de esta indolamina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo en condiciones de reposo. Con este propósito empleamos un método que permite detectar los cambios producidos en la concentración de varios neurotransmisores endógenos en la misma alícuota de sinaptosomas incubados durante 10 minutos, por lo que también medimos el efecto de la sertralina sobre la distribución de los neurotransmisores aminoácidos, Glu y GABA.

La Tabla 3 muestra que en las terminales nerviosas aisladas de hipocampo expuestas a sertralina 25 μ M en ausencia de Ca²⁺ externo, la concentración externa de 5-HT aumentó ligeramente y la concentración interna de 5-HT disminuyó en una proporción similar al aumento en la 5-HT externa. Por otro lado, las concentraciones internas y externas de Glu o GABA, así como la concentración total de los tres neurotransmisores no se modificaron en presencia de sertralina. Cabe mencionar que la concentración del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), el principal metabolito de la 5-HT, tampoco se modificó con sertralina. Por ejemplo en los sinaptosomas control incubados en ausencia de Ca²⁺ externo, la concentración total de 5-HIAA fue 89 ± 3.8 pmol/mg de proteína sinaptosomal y en sinaptosomas expuestos a sertralina fue 84 ± 3.1 pmol/mg.

Tabla 3. Distribución de 5-HT y de neurotransmisores aminoácidos en ausencia y presencia de sertralina en condiciones libres de Ca²⁺

	5-HT externa	5-HT retenida	5-HT total
control	15 ± 1.2	42 ± 2.7	57 ± 3.8
sertralina 25 µM	23 ± 1.7*	34 ± 0.8*	56 ± 2.4
	Glu externo	Glu retenido	Glu total
control	8 ± 0.8	63 ± 3.9	71 ± 3.9
sertralina 25 µM	6 ± 0.9	58 ± 3.5	65 ± 3.8
	GABA externo	GABA retenido	GABA total
control	1 ± 0.1	11 ± 0.8	12 ± 0.8
sertralina 25 µM	1 ± 0.1	11 ± 0.7	12 ± 0.7

Las concentraciones de 5-HT están en pmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Las concentraciones de Glu y GABA están en nmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Los resultados son el promedio ± ESM de 5 experimentos en preparaciones independientes. * $p < 0.01$ entre el control y los sinaptosomas en presencia de sertralina

Para profundizar en el posible efecto de la sertralina sobre los canales de Na⁺, investigamos su efecto sobre la liberación de los tres neurotransmisores endógenos (5-HT, Glu y GABA) inducida por apertura de los canales de Na⁺ con veratridina. La primera columna en la Tabla 4 muestra que la sertralina 25 µM prácticamente abolió la liberación que induce la veratridina de todos los neurotransmisores estudiados en las terminales nerviosas aisladas de hipocampo. En esta Tabla, la liberación neta inducida con veratridina se refiere a la cantidad de neurotransmisor liberado por la veratridina menos la cantidad de neurotransmisor liberado basalmente en 10 minutos de incubación. Nótese que las concentraciones de los neurotransmisores retenidos dentro de las terminales son valores negativos porque equivalen a la cantidad de neurotransmisor que se pierde dentro de las terminales al ser liberado por la veratridina.

Tabla 4. Cambios netos en la distribución de neurotransmisores que induce la veratridina en condiciones libres de Ca²⁺ en ausencia y presencia de sertralina

	5-HT externa	5-HT retenida	5-HT total
veratridina	7.8 ± 1.2	-5.4 ± 1.4	2.4 ± 1.8
sertralina 25 µM + veratridina	-0.3 ± 0.4*	-0.1 ± 0.8*	-0.4 ± 1.1

	Glu externo	Glu retenido	Glu total
veratridina	32 ± 3.7	-27 ± 3.7	5 ± 5.8
sertralina 25 µM + veratridina	3 ± 0.6*	2 ± 3.6*	5 ± 3.5

	GABA externo	GABA retenido	GABA total
veratridina	10 ± 0.9	-5.1 ± 0.7	5 ± 0.9
sertralina 25 µM + veratridina	1 ± 0.2*	-0.3 ± 1.1*	1 ± 1.1*

Las concentraciones de 5-HT están en pmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Las concentraciones de Glu y GABA están en nmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Los resultados son el promedio ± ESM de 6 experimentos en preparaciones independientes. **p* < 0.01 entre los sinaptosomas en ausencia (veratridina) y en presencia de sertralina (sertralina + veratridina)

7.1.4 Efecto de sertralina en ausencia o en presencia de veratridina sobre las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en presencia de Ca²⁺ externo

Considerando que la síntesis de 5-HT depende de la presencia de Ca²⁺ en el medio (Kuhn y col. 1978) y que en condiciones libres de Ca²⁺ la concentración de 5-HT que encontramos en los sinaptosomas incubados durante 10 minutos fue baja (Tablas 3 y 4), también estudiamos el efecto de la sertralina sobre la concentración externa de 5-HT y de su metabolito en sinaptosomas de hipocampo incubados durante 10 minutos en un medio con Ca²⁺. La Tabla 5 muestra que de manera similar a lo que se observa en los sinaptosomas incubados bajo condiciones libres de Ca²⁺ externo, la sertralina aumentó la concentración externa de 5-HT y proporcionalmente disminuyó su concentración interna cuando hay Ca²⁺ en el medio. La concentración de 5-HIAA en sinaptosomas incubados en presencia de Ca²⁺ externo tampoco se modificó con sertralina. Sin embargo, la

concentración total de 5-HT en presencia de Ca^{2+} externo fue dos veces mayor que en ausencia de Ca^{2+} externo tanto en los sinaptosomas control como en los sinaptosomas expuestos a sertralina. Interesantemente, en presencia de Ca^{2+} externo, la concentración total de 5-HIAA disminuyó ligeramente.

Tabla 5. Efecto de sertralina sobre la distribución de 5-HT y 5- HIAA en condiciones de reposo en presencia de Ca^{2+} externo

	5-HT externa	5-HT retenida	5-HT total
control	20 ± 2.3	83 ± 3.3	103 ± 3.3
sertralina 25 μM	42 ± 4.5*	61 ± 8.1*	104 ± 4.5

	5-HIAA externo	5-HIAA retenido	5-HIAA total
control	45 ± 6.4	27 ± 3.1	72 ± 4.5
sertralina 25 μM	47 ± 5.8	28 ± 5.2	75 ± 4.2

Las concentraciones de indolaminas están en pmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Los resultados son el promedio ± ESM de 3 experimentos en preparaciones

independientes. * $p < 0.01$ entre el control y los sinaptosomas en presencia de sertralina.

El efecto de la despolarización con veratridina sobre la distribución de 5-HT y 5-HIAA en sinaptosomas control y en sinaptosomas expuestos a sertralina incubados en presencia de Ca^{2+} externo también se estudió (Tabla 6). Como ocurrió en los sinaptosomas incubados en presencia de Ca^{2+} externo, la veratridina aumentó la concentración externa de 5-HT a expensas de la 5-HT interna sin modificar la concentración total del neurotransmisor. En la Tabla 6 también se muestra que el aumento neto (menos la liberación basal respectiva) en la liberación de 5-HT inducido con veratridina también fue, como en ausencia de Ca^{2+} externo, prácticamente abolido por sertralina 25 μM , mientras que la concentración externa de 5-HIAA no se modificó por la despolarización con veratridina tanto en sinaptosomas control como en sinaptosomas expuestos a sertralina. La concentración de 5-HIAA dentro de la preparación sinaptosomal no fue modificada por la veratridina con o sin sertralina presente en el medio.

Tabla 6. Efecto de la sertralina sobre los cambios netos en la distribución de monoaminas inducidos con veratridina en presencia de Ca²⁺ externo

	5-HT externa	5-HT retenida	5-HT total
veratridina	29.4 ± 3.4	-27.3 ± 0.7	2.2 ± 2.8
sertralina 25 µM + veratridina	2.8 ± 1.3*	-9.7 ± 3.1*	-7.0 ± 1.8

	5-HIAA externo	5-HIAA retenido	5-HIAA total
veratridina	1.2 ± 2.8	-0.4 ± 2.1	0.8 ± 4.5
sertralina 25 µM + veratridina	-0.6 ± 0.5	-1.7 ± 0.6	-2.3 ± 2.7

Las concentraciones de indolaminas están en pmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Los resultados son el promedio ± ESM de al menos 3 experimentos en preparaciones independientes.

**p* < 0.005 entre las respuestas a veratridina en ausencia o en presencia de sertralina.

7.1.5 Efectos de 5-HT, sertralina y de tetrodotoxina sobre el aumento en la concentración interna de Na⁺ inducido con veratridina

Para explorar la posible participación de la 5-HT en la inhibición ejercida por la sertralina sobre el aumento en el Na⁺ inducido por despolarización, también estudiamos el efecto de 5-HT en un rango amplio de a concentraciones, sobre el aumento en el Na⁺ evocado con veratridina en sinaptosomas de hipocampo. En la figura 9a se muestra un experimento representativo de la respuesta del Na⁺ a veratridina en ausencia o presencia de 1 y 10 µM de 5-HT. La 5-HT a estas concentraciones no fue capaz de modificar la concentración interna de Na⁺ en condiciones de reposo o de despolarización con veratridina. El cambio neto en la concentración interna de Na⁺ inducido por veratridina en ausencia y presencia de la 5-HT (1 y 10 µM) se muestra en la figura 9b.

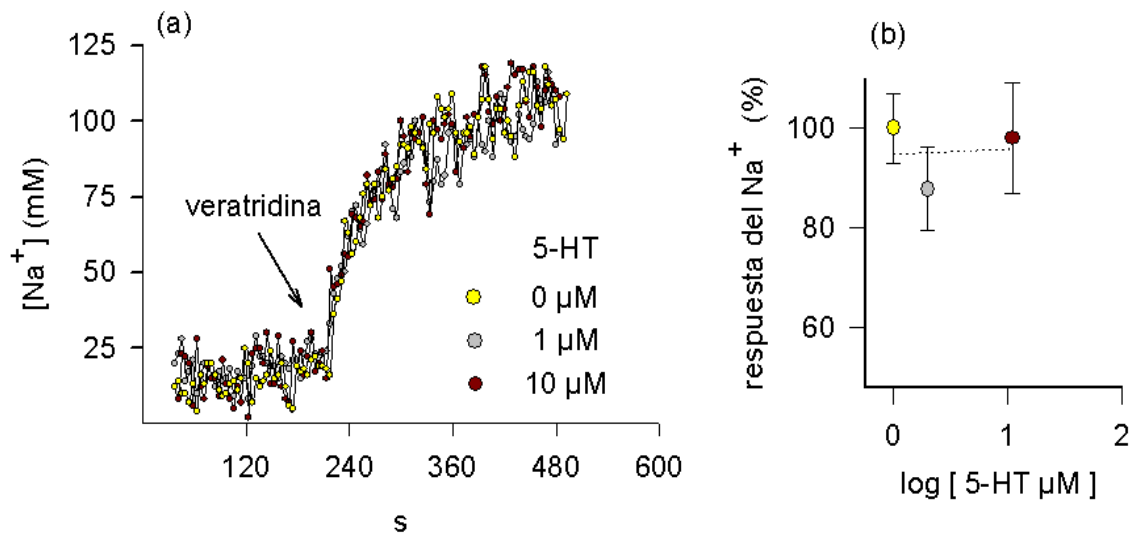


Figura 9. La respuesta del Na^+ evocada con veratridina es insensible a 5-HT. Después de detectar durante 3 minutos el nivel basal de Na^+ en los sinaptosomas de hipocampo precargados con SBFI y resuspendidos en KRH sin (0 μM) o con 5-HT a las concentraciones indicadas, las terminales nerviosas fueron expuestas a veratridina 10 μM y la concentración citoplásmica de Na^+ fue monitoreada durante varios minutos más. **(a)** Experimento representativo que muestra la respuesta del Na^+ a veratridina en ausencia o presencia de 5-HT 1 y 10 μM . **(b)** Respuesta del Na^+ a veratridina en ausencia o presencia de 5-HT 1 y 10 μM . La respuesta del Na^+ a veratridina en ausencia de 5-HT se tomó como el 100%. Los resultados son el promedio \pm ESM de 4 experimentos en preparaciones independientes.

También estudiamos la acción de la 5-HT en las terminales nerviosas aisladas de hipocampo pre-despolarizadas con veratridina. Utilizando este abordaje, la 5-HT a una concentración de 10 μM tampoco disminuyó el aumento en el Na^+ inducido por veratridina (figura 10a). Además, la 5-HT a concentraciones más altas (100 y 1000 μM) no fue capaz de inhibir el aumento en el Na^+ pre-sináptico inducido por veratridina (figuras 10b y c).

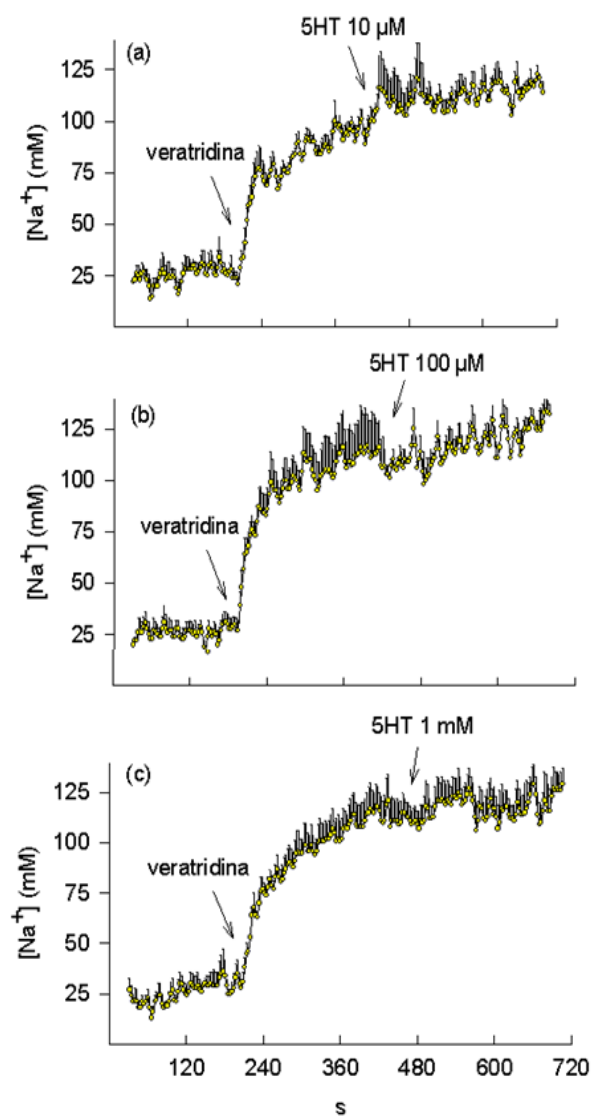


Figura 10. La 5-HT a altas concentraciones no disminuye el aumento en el Na^+ inducido por pre-despolarización con veratridina. Después de detectar el nivel basal de Na^+ interno durante 200 segundos aproximadamente, los sinaptosomas de hipocampo fueron despolarizados con veratridina 10 μ M (primera flecha) y la concentración de Na^+ fue monitoreada durante 4 minutos más. Las terminales nerviosas pre-despolarizadas fueron expuestas (segunda flecha) a 5-HT: **(a)** 10, **(b)** 100 y **(c)** 1000 μ M y el Na^+ fue monitoreado otros 4 minutos. Los resultados son experimentos representativos de 4 experimentos en preparaciones independientes para cada condición.

En contraste, utilizando el diseño experimental anterior encontramos que cuando los sinaptosomas son despolarizados con veratridina y después son expuestos a sertralina 25 μM , se observa que la sertralina inhibe el aumento en el Na^+ que induce la veratridina (figura 11a). Además, en las terminales nerviosas pre-despolarizadas con veratridina, la concentración de Na^+ también se aproxima progresivamente a los niveles basales dentro de los segundos sucesivos a la exposición a 1 μM del bloqueador de los canales de Na^+ , tetrodotoxina.

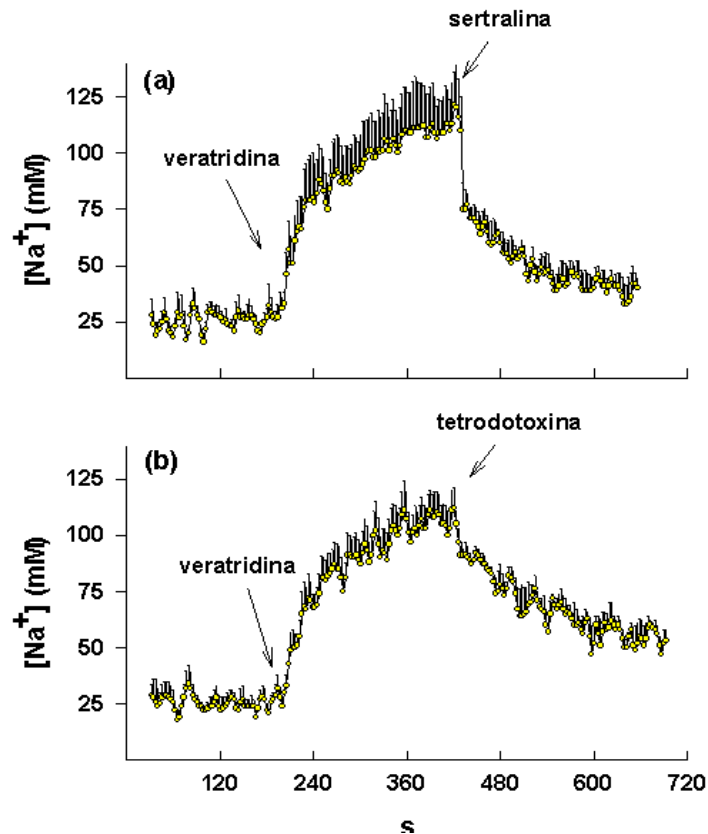


Figura 11. El aumento en el Na^+ inducido por pre-despolarización con veratridina es sensible a sertralina y a tetrodotoxina. Después de detectar el nivel basal de Na^+ , las terminales nerviosas de hipocampo fueron despolarizadas con veratridina 10 μM (primera flecha), y la concentración de Na^+ fue monitoreada durante 4 minutos. Las terminales nerviosas pre-despolarizadas fueron entonces expuestas (segunda flecha) a: **(a)** sertralina 25 μM o **(b)** tetrodotoxina 1 μM y el Na^+ fue monitoreado durante 4 minutos más. Los resultados son experimentos representativos de por lo menos 4 experimentos en preparaciones independientes para cada condición.

ESTUDIO II

En conjunto los resultados anteriores demuestran que la sertralina es un inhibidor efectivo del aumento en el Na^+ y de la liberación de neurotransmisores inducidos por apertura de los canales de Na^+ con veratridina. Considerando que estas respuestas mediadas por canales pre-sinápticos de Na^+ también son sensibles a varios de los fármacos antiepilépticos más efectivos (Sitges y col. 2007), a continuación investigamos un posible efecto anticonvulsivo de la sertralina *in vivo*. Con este propósito, evaluamos el efecto de la sertralina sobre las convulsiones, la actividad epileptiforme y el aumento en la amplitud del EEG inducidos por los agentes pro-convulsivos, 4-aminopiridina (4-AP), cuyo mecanismo de acción involucra cambios en la permeabilidad de los canales iónicos pre-sinápticos cerebrales (Galvan y Sitges 2004), y pentilentetrazol (PTZ) cuyo mecanismo de acción se ha relacionado con una disminución en la transmisión GABAérgica (Macdonald y Barker 1977; Huang y col. 2001). La acción del fármaco antiepiléptico clásico, carbamazepina sobre la susceptibilidad de las convulsiones inducidas con 4-AP y PTZ, también fue evaluada usando el mismo paradigma experimental.

7.2.1 Efecto de la sertralina sobre los cambios conductuales inducidos por 4-AP y PTZ a dosis convulsivas

La administración intraperitoneal de los agentes pro-convulsivos 4-AP y PTZ produce cambios conductuales característicos en los animales. Así, en animales control, la inyección de 4-AP a una dosis de 2.5 mg/kg aumentó la actividad exploratoria, produjo vocalizaciones y temblor de los músculos masticatorios y de las vibrisas. Estos cambios, que fueron comúnmente observados casi inmediatamente después de la inyección de 4-AP, fueron seguidos por piloerección, acicalamiento (grooming) y las “sacudidas de perro mojado” (wet dog shakes). La Tabla 7 muestra que las latencias a algunos de estos cambios aparecen dentro de los primeros 10 minutos después de la inyección de 4-AP. Estos cambios conductuales preceden a un temblor continuo de la musculatura de todo el cuerpo que dio lugar a una actividad motora aumentada, terminando en una convulsión tónico-clónica generalizada a los 18 ± 2.1 min después de la administración de 4-AP.

Después de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, el animal generalmente presenta temblor continuo del cuerpo acompañado por una característica posición de “abanico” de los dedos. Sólo uno de los 4 animales control expuestos a 2.5 mg/kg de 4-AP murió 27 minutos después de la primera convulsión. Los otros 3 animales control presentaron una segunda convulsión después de 46 ± 5 min, y aproximadamente 3 h después, estos animales se recuperaron de todos los cambios conductuales inducidos con 4-AP.

En los animales pre-administrados con 2.5 mg/kg de sertralina, la piloerección, el grooming y las “sacudidas de perro mojado” también se presentaron con latencias similares a las del grupo de control, aunque no se observaron convulsiones tónico-clónicas (segunda fila, Tabla 7). En los animales previamente administrados ya sea con sertralina a la dosis más alta (25 mg/kg) o con 25 mg/kg de carbamazepina, las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por 4-AP fueron inhibidas completamente y las latencias a la piloerección, al grooming y a las wet dog shakes, se incrementaron (dos últimas filas, Tabla 7). Es importante mencionar que ninguno de los animales pre-administrados con sertralina o carbamazepina murió después de la administración de 4-AP.

Tabla 7. Efecto de sertralina a una dosis baja y a una dosis alta sobre los cambios conductuales inducidos con 4-AP.
Comparación con la carbamazepina

	latencia (min) a los diferentes cambios inducidos con 4-AP						
	piloerección	grooming	WDS	convulsión tónico-clónica	número de convulsiones	duración de las convulsiones (min)	
						1 ^a	2 ^a
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
sertralina 2.5 mg/kg	3.6 ± 0.5	4.3 ± 0.4	8.1 ± 1.9		NO presentaron convulsiones		
sertralina 25 mg/kg	11.7 ± 1.1 *	15.1 ± 0.8 *	26.3 ± 5.4 *		NO presentaron convulsiones		
carbamazepina 25 mg/k	6.7 ± 0.5 *	14.0 ± 0.9 *	21.2 ± 1.0 *		NO presentaron convulsiones		

WDS, wet dog shakes (sacudidas de perro mojado).

Los animales fueron observados por 60 min después de la inyección de 4-AP.

Los resultados son el promedio ± ESM. Cada grupo incluyó 4 animales.

*, p < 0.01 entre el control y sertralina 25 mg/kg o carbamazepina 25 mg/kg.

Por otro lado, la administración i.p. de 50 mg/kg de PTZ indujo cambios evidentes en la conducta de todos los animales control pre-administrados con vehículo, incluso desde el primer minuto después de la inyección del pro-convulsivo. En la Tabla 8 se muestra que la latencia a la primera mioclonía (sacudidas involuntarias de todo el cuerpo) y a la primera convulsión tónico-clónica tuvo lugar cerca del primer minuto. En general, los animales expuestos a PTZ sólo presentaron una convulsión tónico-clónica que duró en promedio 1.5 ± 0.4 min. La convulsión clónica (espasmos caracterizados por contracción y relajación muscular alternadas rápidamente) generalmente fue seguida inmediatamente por una convulsión tónica (extensión de las extremidades posteriores), o en algunos casos la convulsión tónica se produjo entre dos episodios de convulsiones clónicas. Sólo un animal control mostró una segunda convulsión tónico-clónica 7 minutos después de la administración de PTZ.

La segunda fila de la Tabla 8 muestra que sólo uno de los cinco animales pre-administrados con 2.5 mg/kg de sertralina, no presentó convulsiones después de la inyección de PTZ. No obstante, las latencias a la primera mioclonía y a la primera convulsión tónico-clónica aumentaron con la administración de sertralina a la concentración más baja probada (2.5 mg/kg). En todos los animales pre-administrados con sertralina a una dosis diez veces mayor (25 mg/kg), los cambios conductuales que acompañan a las convulsiones inducidas por PTZ fueron suprimidos efectivamente (tercera fila, Tabla 8). Cabe mencionar que dos de los cinco animales control murieron a los 3 y 12 minutos después de la primera convulsión tónico-clónica respectivamente, mientras que ninguno de los animales pre-administrados con sertralina a cualquier dosis, murió (última columna de la Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de sertralina a una dosis baja y a una dosis alta sobre los cambios conductuales inducidos con PTZ

	<i>latencia (min) a la primera convulsión inducida con PTZ</i>		duración (min) de la primera convulsión tónico-clónica	% de ratas que presentaron convulsiones	Tasa de mortalidad
	<i>convulsión mioclonica</i>	<i>convulsión tónico-clonica</i>			
control	1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.4	100%	40%
sertralina 2.5 mg/kg	2 ± 0.3 *	3 ± 0.6 *	0.8 ± 0.3	80%	0%
sertralina 25 mg/kg	NO presentaron convulsiones			0%	0%

Los animales fueron observados durante 30 min después de la inyección de PTZ.

Los resultados son el promedio ± ESM de los 5 animales incluidos en cada grupo.

*, $p < 0.05$ entre el control y sertralina 2.5 mg/kg.

7.2.2 Comparación del efecto de la sertralina y la carbamazepina sobre la actividad epileptiforme del EEG inducida por 4-AP y PTZ

Los registros que se muestran en la figura 12 ilustran la actividad basal cortical y la naturaleza de los cambios en el EEG inducidos por los agentes pro-convulsivos, 4-AP y PTZ en los intervalos de tiempo indicados después de su inyección. Los registros obtenidos de animales inyectados con vehículo (control), con sertralina o carbamazepina fueron similares antes de la inyección de los convulsivos (primer trazo en figura 12a-f). La administración de 4-AP indujo actividad epileptiforme cortical a juzgar por el aumento en la amplitud del EEG, en los intervalos de tiempo de 19 a 21 minutos y de 29 a 31 minutos después de la inyección de 4-AP, siendo mayor la amplitud de la actividad eléctrica cortical en este último intervalo (figura 12a). En contraste, la administración de 4-AP no fue capaz de inducir la actividad epileptiforme en los animales inyectados con sertralina 2.5 mg/kg o con carbamazepina 25 mg/kg (figura 12b y c). Por otro lado, la administración de PTZ indujo actividad epileptiforme en el intervalo de 1 a 3 minutos después de la inyección de PTZ (figura 12d). El aumento en la actividad eléctrica cortical del EEG se mantuvo aunque con menor amplitud, hasta el minuto 31 después del PTZ. No obstante, en los animales inyectados con sertralina 25 mg/kg o con carbamazepina 25 mg/kg, los cambios en la actividad eléctrica cortical que induce el PTZ fueron inhibidos completamente a juzgar por los registros de EEG como los que se muestran en la figura 12e y f).

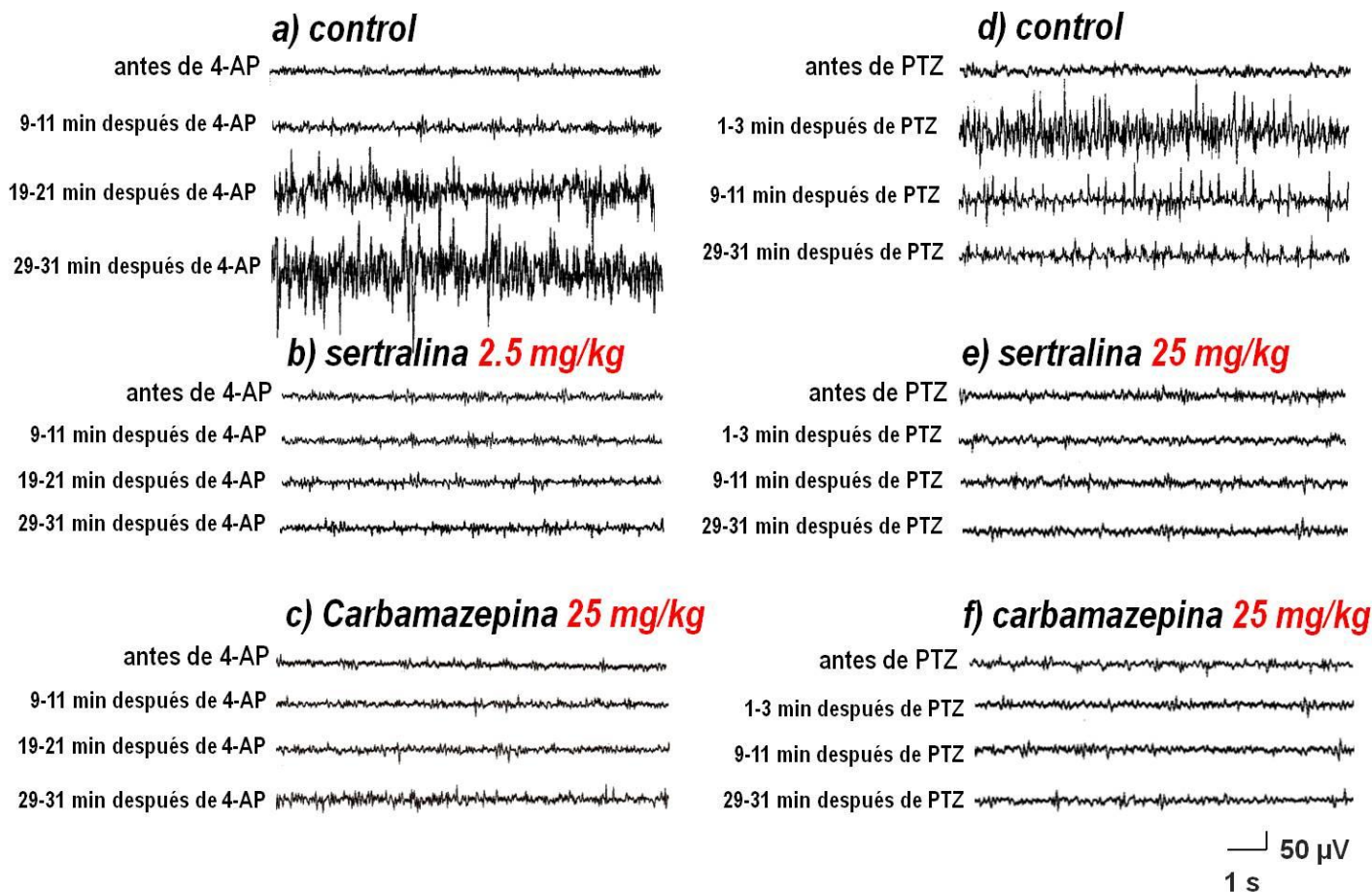


Figura 12. Registros representativos de los cambios en el EEG inducidos con 4-AP y PTZ en ausencia y en presencia de sertralina o carbamazepina a las dosis indicadas. Las gráficas a la izquierda representan registros de EEG tomados antes (*i.e.* actividad basal en el EEG) y a los intervalos de tiempo después de la administración de 4-AP en: **(a)** un animal inyectado con vehículo (control); **(b)** un animal pre-administrado con sertralina 2.5 mg/kg; y **(c)** un animal pre-administrado con carbamazepina 25 mg/kg. Las gráficas a la derecha son registros representativos tomados antes y a los intervalos de tiempo después de PTZ en: **(d)** un animal control; **(e)** un animal pre-administrado con sertralina 25 mg/kg o **(f)** con carbamazepina 25 mg/kg.

En un intento por calcular los cambios en el EEG, el valor de la amplitud del pico máximo (*hpav*, por las siglas en inglés de highest peak amplitude value) se midió antes y en varios intervalos de tiempo después de la administración de los agentes pro-convulsivos. El *hpav* del EEG de 65 animales en condiciones basales (*i.e.* antes de la inyección de los agentes pro-convulsivos) fue $39 \pm 2 \mu\text{V}$. Antes de la administración de 4-AP o de PTZ no se encontró una diferencia significativa entre el *hpav* basal de los diferentes grupos animales.

Consistentemente con la latencia a la primera convulsión tónico-clónica inducida por 4-AP, en el grupo de animales control, los primeros cambios en la actividad eléctrica cortical en el EEG se observaron alrededor de 20 minutos después de la administración de 4-AP. Estos cambios en el EEG se reflejaron en un aumento en el *hpav* del EEG basal ($39 \pm 2 \mu\text{V}$) hasta un valor de $167 \mu\text{V}$. Este aumento en el *hpav* volvió a aumentar en el último intervalo de 3 minutos registrado después de 4-AP (primera fila, Tabla 9). Estos aumentos de la amplitud del EEG después de 4-AP prácticamente fueron suprimidos por sertralina a una dosis de 2.5 mg/kg (segunda fila, Tabla 8), así como por la carbamazepina a una dosis de 25 mg/kg (tercera fila, Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los efectos de sertralina y carbamazepina sobre el aumento en el *hpav* del EEG inducido con 4-AP.

grupos animales	<i>hpav</i> ^ε del EEG			número de animales
	Intervalos de tiempo después de la 4-AP			
	min 9 a 11	min 19 a 21	min 29 a 31	
control	44 ± 1.0	167 ± 3.3	269 ± 5.4	(10)
sertralina 2.5 mg/kg	$37 \pm 0.3^*$	$43 \pm 1.2^*$	$52 \pm 2.1^*$	(4)
carbamazepina 25 mg/kg	$38 \pm 1.4^*$	$41 \pm 1.8^*$	$50 \pm 2.7^*$	(4)

^ε *hpav*, valor de amplitud del pico máximo (en μV). El *hpav* basal del EEG antes de 4-AP fue $39 \pm 2 \mu\text{V}$. Los resultados son el promedio \pm ESM del número indicado de animales en cada grupo.

*, $p < 0.002$ entre el control y el grupo animal indicado a los intervalos de tiempo específicos después de 4-AP.

Asimismo, de acuerdo con la latencia a las convulsiones tónico-clónicas inducidas por PTZ, los cambios drásticos en el EEG fueron observados en el intervalo de tiempo de 1 a 3 minutos después de la inyección de PTZ en los animales control (Tabla 10). Este cambio drástico en el EEG se vio reflejado en un aumento de casi cuatro veces ($160 \mu\text{V}$) en la amplitud basal del EEG ($39 \pm 2 \mu\text{V}$). Este rápido aumento de la *hpav* disminuyó progresivamente, siendo alrededor de dos veces mayor en el intervalo de 9 a 11 minutos después de PTZ y alrededor del 30% con respecto al valor inicial en el intervalo de 29 a 31 minutos después de PTZ (primera fila, Tabla 10).

La segunda fila en la Tabla 10 muestra que aunque el aumento en el *hpav* después de la administración de PTZ todavía estaba presente en el grupo de animales pre-administrado con sertralina a la dosis más baja probada (2.5 mg/kg), este aumento fue significativamente menor que en el grupo de animales control. La diferencia estadística en el *hpav* después de PTZ entre el grupo control y el grupo tratado con 2.5 mg/kg de sertralina fue de: $P = 0.01$ en el intervalo de tiempo de 1 a 3 minutos, $P = 6 \times 10^{-8}$ de 9 a 11 minutos y $P = 0.04$ en el intervalo de 29 a 31 minutos. En dos de los cuatro animales pre-administrados con 2.5 mg/kg de sertralina, el PTZ indujo un marcado cambio en el EEG, mientras que en los otros dos animales, el PTZ no modificó el patrón basal del EEG. En el grupo de animales pre-administrados con 5 mg/kg de sertralina, los cambios en el EEG inducidos con PTZ solo se observaron en uno de los cuatro animales del grupo. Consistentemente, en este grupo de animales el *hpav* obtenido después de la inyección de PTZ no solo fue superior al *hpav* basal de $39 \mu\text{V}$, sino también notablemente más bajo que el *hpav* producido por PTZ en el grupo de animales control. Los cambios inducidos por PTZ en la actividad cortical del EEG en los grupos de animales pre-administrados con sertralina a las dosis más altas probadas ($10, 15, 20$ y 25 mg/kg) se inhibieron totalmente.

Los cambios drásticos en el EEG inducidos por PTZ permanecieron prácticamente sin cambios en presencia de carbamazepina a una dosis de 15 mg/kg , pero fueron suprimidos por carbamazepina a una dosis mayor (25 mg/kg) a juzgar por el *hpav* (últimas dos filas en Tabla 10).

Tabla 10. Efecto dosis-dependiente de sertralina sobre los cambios en la amplitud del EEG (a juzgar por el *hpav*) inducidos con PTZ. Comparación con la carbamazepina

grupos animales	<i>hpav</i> ^ε del EEG			número de animales
	Intervalos de tiempo después de la PTZ			
	min 1 a 3	min 9 a 11	min 29 a 31	
control	160 ± 6	94 ± 2	62 ± 4	(14)
sertralina 2.5 mg/kg	108 ± 30*	52 ± 1*	47 ± 2*	(4)
sertralina 5.0 mg/kg	64 ± 17*	46 ± 4*	46 ± 5*	(4)
sertralina 10.0 mg/kg	39 ± 2*	40 ± 2*	39 ± 2*	(4)
sertralina 15.0 mg/kg	40 ± 3*	40 ± 2*	39 ± 3*	(4)
sertralina 20.0 mg/kg	38 ± 2*	39 ± 2*	40 ± 3*	(4)
sertralina 25.0 mg/kg	42 ± 3*	41 ± 1*	39 ± 1*	(4)
carbamazepina 15 mg/kg	127 ± 8*	93 ± 2	64 ± 3	(5)
carbamazepina 25 mg/kg	36 ± 2*	39 ± 2*	45 ± 4*	(4)

^ε *hpav*, valor de amplitud del pico máximo (en μV). El *hpav* basal del EEG antes de PTZ fue $39 \pm 2 \mu\text{V}$. Los resultados son el promedio \pm ESM del número indicado de animales en cada grupo.

*, $p < 0.04$ entre el control y el grupo animal indicado a los intervalos de tiempo específicos después de PTZ.

7.2.3 Comparación de los efectos de la administración aguda y repetida de sertralina sobre el aumento en la amplitud del EEG inducido por 4-AP

Dado que la actividad epileptiforme acompañada por el aumento de la amplitud del EEG que induce la 4-AP fue abolida por la sertralina a la dosis de 2.5 mg/kg (Fig. 12b y segunda línea en la Tabla 9, respectivamente), también investigamos una posible acción de la sertralina administrada repetidamente a una concentración menor. La Tabla 11 muestra que en el grupo de animales control pre-inyectados 1 vez con vehículo, el *hpav* basal ($35 \pm 0.3 \mu\text{V}$) aumentó 26, 373, y 663 % en los 3 intervalos de tiempo respectivamente, a saber de 9 a 11, de 19 a 21 y de 29 a 31 minutos después de la administración de 4-AP. Este aumento progresivo en la amplitud del EEG que indujo la 4-AP fue similar al aumento en el *hpav* obtenido en animales pre-inyectados 7 días con vehículo o con una sola inyección de sertralina 0.75 mg/kg. No obstante, la administración de una dosis diaria de 0.75 mg/kg de sertralina durante 7 días, inhibió eficazmente el aumento en la amplitud del EEG inducido por 4-AP.

Tabla 11. Cambios en el *hpav* del EEG inducidos con 4-AP en animales pre-inyectados con una o siete inyecciones de sertralina a una dosis baja

grupos animales	número de inyecciones (1/día)	<i>hpav</i> ^ε del EEG		
		Intervalos de tiempo después de la 4-AP		
		min 9 a 11	min 19 a 21	min 29 a 31
(a)vehículo	1	44 ± 1.0	167 ± 3.3	269 ± 5.4
(b)vehículo	7	44 ± 1.4	178 ± 16	279 ± 13
(c)sertralina 0.75 mg/kg	1	42 ± 1.5	179 ± 16	280 ± 13
(d)sertralina 0.75 mg/kg	7	36 ± 1.0 *	40 ± 2.5 *	50 ± 1.0 *
<i>p</i> entre (a) y (b)		0.77 (NS)	0.46 (NS)	0.42 (NS)
<i>p</i> entre (a) y (c)		0.17 (NS)	0.15 (NS)	0.33 (NS)
<i>p</i> entre (b) y (d)		0.003	0.0002	2.3 x 10 ⁻⁶

^ε *hpav*, valor de amplitud del pico máximo (en μV).

Los resultados son el promedio ± ESM de al menos 4 animales por grupo.

(NS) No diferencia significativa.

El promedio del *hpav* basal (antes de la 4-AP) ± ESM fue 35 ± 0.3 μV.

8. DISCUSIÓN

Como en cada uno de los estudios publicados que comprende el presente trabajo se incluye una discusión respectiva de los resultados, en esta discusión general se destacan los puntos principales de ambos trabajos y se desarrollan algunos puntos importantes que por cuestión de espacio no fueron discutidos en los artículos.

En el primer estudio se demuestra que la sertralina, un fármaco clasificado como inhibidor del transportador de serotonina (5-HT), en un rango micromolar bajo disminuye el aumento en la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de Na^+ en el hipocampo. Además, en condiciones de reposo la sertralina aumentó la liberación basal de 5-HT, sin modificar la liberación basal de glutamato (Glu), GABA o la concentración externa del principal metabolito de la 5-HT, el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA).

Un punto fundamental en nuestro estudio es el rango de concentración de sertralina. En las terminales nerviosas aisladas de hipocampo, la sertralina inhibió tanto el aumento en la permeabilidad al Na^+ , como la liberación de glutamato inducidos por despolarización con veratridina en un rango de concentración de 1.5 a 25 μM . Este rango es similar al rango de concentración de sertralina en el que inhibe la activación de los canales de sodio tipo hNav 1.3 en cultivos de células embrionarias de riñón humano (de 2 a 5 μM) o al rango (de 0.1 a 10 μM) en el que bloquea las corrientes persistentes de Na^+ mediadas por los canales tipo Nav 1.2, 1.3 y Nav1.6 en células GH3 de pituitaria (Huang y col. 2006; Wang y col. 2008). También, las concentraciones de sertralina usadas en el presente estudio están dentro de las concentraciones (de 2.4 a 7.2 μM) que se han encontrado en tejido cerebral de roedores después de inyectar dosis terapéuticamente relevantes (Doran y col. 2005). Es interesante que en nuestro estudio la sertralina inhibiera el aumento en la permeabilidad de los canales de Na^+ en un rango de concentración cerca de 60 veces menor que el rango en el que varios fármacos antiepilépticos tanto de la primera como de la segunda generación inhibieron la liberación de Glu inducida por apertura de canales de Na^+ en sinaptosomas de hipocampo (Sitges y col. 2007) lo que indica que la sertralina es más potente que varios de los fármacos antiepilépticos para inhibir el aumento en la permeabilidad de los canales de Na^+ inducido por despolarización.

Tomando en cuenta que el Na^+ es el catión principal que controla la excitabilidad cerebral, que los canales de Na^+ están particularmente concentrados en los botones pre-sinápticos (Engel y Jonas 2005), y que la función principal de las terminaciones nerviosas cerebrales es la liberación de neurotransmisores, incluyendo el aminoácido excitador, glutamato, elegimos las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) de hipocampo para explorar el efecto de la sertralina sobre los canales de Na^+ . El tamaño reducido de las terminales nerviosas aisladas ($<0.5 \mu\text{m}$ de diámetro) impide usar técnicas electrofisiológicas convencionales para despolarizarlas. Una de las estrategias más útiles para despolarizar a los sinaptosomas es por lo tanto, el uso de toxinas capaces de elevar la permeabilidad al Na^+ . Tal es el caso de la veratridina que se une al sensor de voltaje del canal de Na^+ (Sitio 2) impidiendo su inactivación. Usando como herramienta farmacológica a la veratridina, logramos desenmascarar un novedoso mecanismo de acción de la sertralina como bloqueador de canales pre-sinápticos de Na^+ en el hipocampo. Así, encontramos que el aumento en el Na^+ y en la liberación de Glu, GABA y 5-HT inducidos por veratridina en ausencia de Ca^{2+} externo fueron inhibidos por la sertralina (figuras 6 y 7; Tabla 4). El hallazgo de que la veratridina no haya aumentado la liberación basal de Glu en los sinaptosomas de hipocampo perfundidos en ausencia de Na^+ externo o en presencia de tetrodotoxina (figura 8) confirma la participación de los canales de Na^+ en las respuestas inducidas con veratridina que fueron sensibles a sertralina. En contraste, la independencia de Ca^{2+} externo de la liberación de Glu inducida con veratridina sugiere que el aumento en la concentración interna de Na^+ inducida por veratridina puede inducir la liberación de neurotransmisores por reversión de los transportadores dependientes de Na^+ . De acuerdo con la hipótesis de que el aumento de Na^+ inducido por veratridina está revirtiendo los transportadores con la concomitante liberación de neurotransmisores, en un estudio previo de nuestro laboratorio en terminales nerviosas aisladas de hipocampo, se encontró que la liberación de glutamato radioactivo (^3H Glu) inducida por veratridina en ausencia de Ca^{2+} externo era sensible al inhibidor del transportador de aminoácidos excitadores (EAAT), DL-treo-beta-benziloxiaspartato (TBOA) (Sitges y col. 2007). Sin embargo, la posibilidad de que la inhibición que ejerce la sertralina sobre la liberación de ^3H Glu inducida por veratridina pudiera involucrar una inhibición de este transportador en lugar

de inhibir el aumento en la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de Na^+ es poco probable. Debido a que la sertralina también inhibió la liberación inducida por veratridina de GABA y de 5-HT que no involucran reversión del EAAT.

Los hallazgos presentes también muestran que en presencia de Ca^{2+} externo, la liberación neta de 5-HT inducida con veratridina fue casi 4 veces mayor que en ausencia de Ca^{2+} externo (comparar las dos primeras filas de las Tablas 4 y 6). Esta mayor eficacia de la veratridina para liberar 5-HT en presencia de Ca^{2+} posiblemente se deba a que la 5-HT adicionalmente se libera de la posa vesicular por exocitosis ya que en presencia de Ca^{2+} externo, la despolarización con veratridina también aumenta al Ca^{2+} interno (a juzgar por los cambios en la fluorescencia del fura-2) en sinaptosomas de hipocampo (Sitges y Galindo 2005). No obstante, la inhibición que ejerce la sertralina sobre la liberación de 5-HT inducida por veratridina en presencia de Ca^{2+} externo probablemente también involucra una reducción en la permeabilidad de los canales de Na^+ pre-sinápticos ya que la sertralina inhibió completamente el aumento en la liberación de 5-HT inducida con veratridina tanto en ausencia como en presencia de Ca^{2+} externo independientemente de la 5-HT liberada. Más aún, en presencia de Ca^{2+} la síntesis de 5-HT posiblemente también aumenta ya que en condiciones de reposo e independientemente de la presencia de sertralina, la concentración total de 5-HT (liberada más retenida) en los sinaptosomas de hipocampo incubados en un medio con Ca^{2+} (tercera columna en Tabla 5) fue casi dos veces mayor que en un medio libre de Ca^{2+} (tercera columna en Tabla 3). Esta diferencia posiblemente se explica por que la Triptófano hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de 5-HT, requiere Ca^{2+} para su activación (Kuhn y col. 1978).

Además de la inhibición en la liberación de Glu, GABA y 5-HT que produce la sertralina en condiciones de despolarización con veratridina, que puede involucrar la reducción en la permeabilidad de los canales de Na^+ pre-sinápticos, la sertralina posiblemente también esta bloqueando al SERT. Este efecto esta indicado por el aumento que induce la sertralina sobre la concentración externa de 5-HT a expensas de su concentración interna bajo condiciones de reposo, tanto en ausencia (Tabla 3) como en presencia (Tabla 5) de Ca^{2+}

externo; y contrasta con la falla de la sertralina para aumentar las concentraciones externas basales de los otros neurotransmisores estudiados, a saber, Glu y GABA (Tabla 3).

Se ha descrito que la 5-HT activa receptores pre-sinápticos de tipo 5-HT_{1B} acoplados a la adenilato ciclasa en terminales nerviosas glutamatérgicas (Boeijinga y Boddeke 1996). La adenilato ciclasa es la enzima que cataliza la síntesis de AMPc. Uno de los principales blancos del AMPc es la proteína cinasa A (PKA), que a su vez ha sido demostrado que modula la permeabilidad de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje cerebrales (Gershon y col. 1992; Smith y Goldin 1996). Sin embargo, el aumento en la 5-HT externa inducido por el bloqueo del SERT con sertralina es poco probable que esté relacionado con la inhibición que produce la sertralina sobre el aumento en el Na⁺ inducido por despolarización, dado que la 5-HT en un amplio rango de concentraciones fue incapaz de reducir el aumento en el Na⁺ inducido por veratridina (figuras 9 y 10) en los sinaptosomas de hipocampo. Además, en los experimentos de superfusión, la sertralina también inhibió la liberación de [³H]Glu inducida por veratridina, y el sistema de superfusión elimina continuamente los neurotransmisores liberados al medio externo previniendo tanto la acumulación de 5-HT, como la activación de receptores 5-HT_{1B} en las terminales.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que en condiciones de despolarización inducida con veratridina, la sertralina disminuye la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de Na⁺ en el hipocampo. Tomando en cuenta que los cambios relacionados con la activación persistente de los canales de Na⁺ que induce la veratridina probablemente se asemejen a la excitabilidad sostenida que tiene lugar durante las convulsiones (Otoom y Sequeira; Fekete y col. 2009), y que varios de los fármacos antiepilépticos más efectivos también disminuyen el aumento en la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de Na⁺ que induce la veratridina (Sitges y col. 2007), decidimos explorar la posibilidad de que la sertralina tuviera una acción anticonvulsiva. Con este propósito, investigamos los efectos de la sertralina sobre los cambios conductuales y la actividad epileptiforme detectada en el EEG en dos modelos farmacológicos de convulsiones.

En este segundo estudio demostramos que la sertralina disminuye progresivamente los cambios conductuales y electroencefalográficos inducidos con los agentes proconvulsivos 4-AP y PTZ y que este efecto fue comparable con el efecto del fármaco antiepiléptico clásico carbamazepina. Los cambios conductuales característicos en respuesta a la 4-AP que se han descrito anteriormente a detalle en la rata (Mihaly, y col. 1990; Weiczner y col. 2008) también se observaron en el presente estudio. Además, las latencias a la primera convulsión mioclónica y a la primera convulsión tónico-clónica generalizada, así como la tasa de mortalidad en respuesta a PTZ fueron consistentes con estudios anteriores en los que se investigó el comportamiento convulsivo inducido por PTZ administrado i.p. a una dosis similar a la usada en nuestro trabajo (Akamatsu y col. 2001; Lopez-Meraz y col. 2005).

Por otro lado, la mayor potencia de la sertralina para inhibir las convulsiones tónico-clónicas inducidas por 4-AP que por PTZ (Tabla 7 y 8), puede explicarse por diferencias en los mecanismos de acción de la 4-AP y el PTZ. Así, con base en los resultados del estudio I, la sertralina es un inhibidor eficaz del aumento en la permeabilidad de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ , y los cambios inducidos por 4-AP sobre los canales iónicos pre-sinápticos, incluyen el aumento en la permeabilidad del canal de Na^+ (Galvan y Sitges 2004). En contraste, el mecanismo de acción de PTZ se ha relacionado con una disminución de la transmisión GABAérgica (Huang y col. 2001; Lopez-Meraz y col. 2005).

Los modelos animales han proporcionado una amplia evidencia de que la 5-HT participa en la modulación de la excitabilidad neuronal, la epileptogénesis, y en la propagación de las convulsiones (Bagdy y col. 2007; Bozzi y col. 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que al aumentar la 5-HT sináptica se pueden inhibir las convulsiones focales y generalizadas en varios modelos animales de epilepsia (Prendiville y Gale 1993; Yan y col. 1994; Clinckers y col 2004; Stean y col. 2005; Tripathi y col. 2008). Más aún, el 8-OH-DPAT y el indorenato, dos agonistas de los receptores 5HT_{1A} , disminuyeron la severidad de las convulsiones generalizadas en tres modelos experimentales en ratas (López-Meráz y col. 2005). Por el contrario, la disminución en los niveles de 5-HT cerebral mediante manipulaciones genéticas o farmacológicas puede reducir el umbral de las convulsiones audiogénicas, y de

las convulsiones evocadas química y eléctricamente (Statnick y col. 1996; Brennan et al. 1997; Bercovici y col. 2006). En nuestro estudio I demostramos que en condiciones de reposo la sertralina aumentó selectivamente la concentración extracelular de 5-HT, sin modificar las concentraciones externas de glutamato o GABA. Sin embargo, aunque con base en nuestros resultados no se descarta la participación de la 5-HT en la acción anticonvulsiva de la sertralina, es probable que el efecto anticonvulsivo de la sertralina se deba principalmente a la disminución en la permeabilidad de los canales de Na^+ sensibles a voltaje, debido a que la 5-HT por si misma es incapaz de inhibir a los canales de Na^+ y a que en condiciones de despolarización, la sertralina inhibió la liberación de los tres neurotransmisores estudiados incluida la 5-HT en las terminales nerviosas aisladas de hipocampo.

Al igual que en el Estudio I, las dosis de sertralina empleadas en el estudio II *in vivo* también son terapéuticamente relevantes. En pacientes con depresión, la dosis inicial de sertralina generalmente es de 50 mg/día (Sheehan y Kamijima 2009), lo que sería equivalente a 1 mg/kg tomada por una persona de 50 kg. La dosis diaria puede incrementarse como sea necesario hasta una dosis máxima tolerada de 200 mg/día (equivalente a 4 mg/kg). En nuestro estudio, una sola dosis de sertralina 2.5 mg/kg previno las convulsiones y los cambios epileptiformes del EEG inducidos por 4-AP, y aunque sólo previno las convulsiones inducidas por PTZ en 20% de los animales, la latencia a las convulsiones inducidas con PTZ aumentó en el 80% restante de los animales. Además, el PTZ no fue capaz de inducir los cambios epileptiformes en el EEG en la mitad de los animales previamente administrados con 2.5 mg/kg de sertralina, y a la dosis de 5 mg/kg, que se aproxima a la dosis máxima utilizada en los pacientes depresivos, la sertralina inhibió eficazmente la actividad epileptiforme inducida con PTZ en 75% de los animales. Más aún, a dosis superiores a 5 mg/kg, la sertralina previno completamente todos los cambios inducidos por PTZ. Por otro lado, evaluamos la acción de carbamazepina sobre los cambios inducidos por ambos agentes pro-convulsivos utilizando un paradigma idéntico y encontramos que también se requirió de una dosis más alta de carbamazepina para controlar las convulsiones y la actividad epileptiforme en la rata que para controlar las

convulsiones en pacientes con epilepsia. Por ejemplo, si se considera una dosis mínima de carbamazepina de 400 mg/día para pacientes con epilepsia, lo que correspondería a 8 mg/kg para una persona de 50 kg, y una dosis promedio de 1000 mg/día, lo que correspondería a 20 mg/kg de carbamazepina para una persona de 50 kg, la dosis de 15 mg/kg de carbamazepina que se administró a la rata correspondería a 750 mg/día para un paciente de 50 kg con epilepsia. Sin embargo, la dosis única de carbamazepina 15 mg/kg no controló la actividad epileptiforme inducida por PTZ en la rata.

Es importante destacar que la carbamazepina o la sertralina incluso a la dosis más alta estudiada, no modificaron la actividad eléctrica basal de la corteza (primer trazo en la figura 12b, c, e y f). Por otro lado, con el fin de obtener una medida objetiva de la eficacia anticonvulsiva de la sertralina y la carbamazepina a las diferentes dosis probadas, la actividad epileptiforme cortical del EEG inducida por 4-AP o PTZ en ausencia y presencia de estos fármacos se registró. Esto nos permitió medir la amplitud del EEG a intervalos específicos de tiempo, mismos que se utilizaron para construir las tablas 9 y 10. El valor de la amplitud del pico máximo (*hpav*) del EEG obtenido de registros tomados durante 2 minutos antes y a intervalos de tiempo específicos después de la administración de un agente pro-convulsivo se ha utilizado previamente en el cobayo (Nekrassov y Sitges 2003; Sitges y Nekrassov 2004). En el presente estudio se midió el *hpav* del EEG por primera vez en la rata debido a que el *hpav* es consistente y se puede usar para comparar la acción anticonvulsiva potencial de los fármacos usando exactamente los mismos parámetros.

Los fármacos antidepresivos y antiepilépticos necesitan ser administrados durante cierto tiempo antes de ser capaces de producir su acción terapéutica en los pacientes. Nuestro hallazgo de que la actividad epileptiforme del EEG en respuesta a la 4-AP fue insensible a una administración única de 0.75 mg/kg de sertralina, mientras que la administración repetida de sertralina a esta misma dosis durante 7 días previno completamente los cambios en el EEG inducidos por 4-AP, demuestra que la acción anticonvulsiva de la sertralina se puede lograr (al menos en el modelo *in vivo*) con la administración crónica a dosis incluso por debajo de la dosis mínima utilizada en pacientes. Es importante aclarar, sin embargo, que se debe tener precaución al trasladar las dosis

empleadas en roedores a los seres humano. Cabe mencionar que el uso de fármacos antidepressivos en pacientes con epilepsia ha sido un tema delicado, ya que existe evidencia que sugiere que algunos antidepressivos pueden disminuir el umbral convulsivo y aumentar la severidad de las convulsiones, particularmente cuando son administrados a altas dosis (Preskorn y Fast 1992; Pisani y col. 2002; Alper y col. 2007). No obstante, se ha sugerido que la sertralina aparentemente puede ser usado de manera segura para tratar la depresión en pacientes con epilepsia (Seethalakshmi y Krishnamoorthy 2007). Por lo anterior, con base en nuestros hallazgos resultaría interesante investigar los posibles efectos agudos y crónicos de la sertralina en combinación con otros fármacos antiepilépticos y poder así disminuir las elevadas dosis de los fármacos que con frecuencia son necesarias para controlar los síntomas y que suelen provocar efectos secundarios adversos.

En conclusión, nuestros resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, así como los hallazgos obtenidos en dos diferentes modelos de convulsiones *in vivo*, sugieren un potencial anticonvulsivo de la sertralina que abre la posibilidad de investigar a este antidepressivo como una alternativa en el control simultáneo de la depresión y las convulsiones en pacientes con epilepsia.

9. CONCLUSIONES GENERALES

- La sertralina en un rango micromolar bajo inhibe el aumento en el Na^+ y la liberación de neurotransmisores inducidos por apertura de los canales de Na^+ con veratridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo, lo que sugiere que la sertralina es un inhibidor efectivo de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ que controlan la liberación de neurotransmisores.
- En condiciones de reposo, la sertralina aumenta la concentración externa de 5-HT a expensas de la concentración interna, sin modificar las concentraciones de Glu, GABA o del 5-HIAA. Este efecto es congruente con el principal mecanismo estudiado de la sertralina que involucra el bloqueo del transportador de 5-HT.
- El aumento selectivo en la concentración de 5-HT que produce la sertralina no parece estar relacionado con su efecto inhibitorio sobre los canales de Na^+ ya que la 5-HT no inhibió el aumento en la permeabilidad de los canales de Na^+ inducido por veratridina.
- La sertralina a dosis terapéuticamente relevantes inhibe los cambios conductuales y en el EEG inducidos en dos modelos farmacológicos de convulsiones en la rata. Estos efectos son comparables a los efectos del fármaco antiepiléptico clásico carbamazepina.
- La sertralina es más efectiva para prevenir las convulsiones tónico-clónicas generalizadas que induce la 4-AP que las convulsiones que induce el PTZ posiblemente por los diferentes mecanismos de acción de estos agentes convulsivos. Aquí encontramos que la sertralina disminuye la permeabilidad de los canales cerebrales pre-sinápticos de Na^+ y entre los cambios que induce la 4-AP se encuentra el aumento en la permeabilidad de canales iónicos principalmente de los canales de Na^+ . En contraste, el mecanismo de acción del PTZ involucra una disminución en la transmisión GABAérgica.
- La administración crónica de sertralina a dosis por debajo de la dosis mínima utilizada en pacientes previene completamente la actividad epileptiforme del EEG en respuesta a una dosis convulsiva de 4-AP.
- Consideramos que los hallazgos presentes obtenidos tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo* sugieren que el antidepresivo sertralina tiene propiedades anti-convulsivas dignas de estudios adicionales en pacientes.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akamatsu N, Fueta Y, Endo Y y col. Decreased susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after low-frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett* 2001; **310**: 153-6.
- Alper K, Schwartz KA, Kolts RL y col. 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.
- Armand V, Hoffmann P, Vergnes M y col. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in entorhinal cortex hippocampal slices of rats with a genetically determined absence epilepsy (GAERS). *Brain Res* 1999; **841**: 62-9.
- Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem* 2007; **100**:857-73.
- Bell GS, Sander JW. Suicide and epilepsy. *Curr Opin Neurol* 2009; **22**: 174-8.
- Bercovici E, Cortez MA, Wang X, Snead OC 3rd. Serotonin depletion attenuates AY-9944-mediated atypical absence seizures. *Epilepsia* 2006; **47**:240-6.
- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**: 137-51.
- Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010; **9**: 68-82.
- Boeijinga PH, y Boddeke HW. Activation of 5-HT1B receptors suppresses low but not high frequency synaptic transmission in the rat subicular cortex in vitro. *Brain Res* 1996; **721**: 59-65.
- Bolden-Watson C, Richelson E. Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sci* 1993; **52**: 1023-9.
- Bozzi Y, Dunleavy M, Henshall DC. Cell signaling underlying epileptic behavior. *Front Behav Neurosci* 2011; **5**:45.
- Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol* 1995; **47**: 477-511.
- Brennan TJ, Seeley WW, Kilgard M y col. Sound-induced seizures in serotonin 5-HT2c receptor mutant mice. *Nat Genet* 1997; **16**:387-90.
- Burke MJ, Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants: cost implications and relevance to clinical practice. *Clin Pharmacokinet* 1999; **37**: 147-65.
- Catena-Dell'osso M, Rotella F, Dell'osso A y col. Inflammation, Serotonin and Major Depression. *Curr Drug Targets* 2013; **14**: 571-7.
- Clinckers R, Smolders I, Meurs A y col. Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D and 5-HT receptors. *J Neurochem* 2004; **89**:834-43.
- Danzer SC. Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 2011; **233**: 22-32.

- Dell'osso MC, Caserta A, Baroni S y col. The relationship between epilepsy and depression: An update. *Curr Med Chem* 2013. En prensa
- Doran A, Obach RS, Smith BJ y col. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 165-74.
- Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 2001; **11**: 240-9.
- Engel D, Jonas P. Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 2005; **45**: 405-17.
- Engel J, Jr. Concepts of epilepsy. *Epilepsia* 1995; **36 Suppl 1**: S23-9.
- Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001; **42**:796-803.
- Erecinska M, Nelson D, Silver IA. Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes). *Biochim Biophys Acta* 1996; **1277**: 13-34.
- Fekete A, Franklin L, Ikemoto T y col. Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca elevation: implication for epilepsy. *J Neurochem* 2009; **111**: 745-56.
- Ferguson JM. SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 2001; **3**: 22-7.
- French JA, Kanner AM, Bautista J y col. 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* 2004; **62**: 1261-73.
- Galindo CA, Sitges M. Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings: comparison with omega-agatoxin IVA. *Neurochem Res* 2004; **29**: 659-69.
- Galvan 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.
- Gershon E, Weigl L, Lotan I y col. Protein kinase A reduces voltage-dependent Na⁺ current in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1992; **12**: 3743-52.
- Gilliam F. Optimizing health outcomes in active epilepsy. *Neurology* 2002; **58**: S9-20.
- Graumlich JF, McLaughlin RG, Birkhahn D y col. Subcutaneous microdialysis in rats correlates with carbamazepine concentrations in plasma and brain. *Epilepsy Res* 2000; **40**: 25-32.
- Grohol JM. Top 25 Psychiatric Medication Prescriptions for 2011. *Psych Central* 2012; **01**: 09.

- Harty TP, Rogawski MA. Felbamate block of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res* 2000; **39**:47-55.
- Hesdorffer DC, Ishihara L, Mynepalli L y col. Epilepsy, suicidality, and psychiatric disorders: a bidirectional association. *Ann Neurol* 2012; **72**: 184-91.
- Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 2000; **61 Suppl 6**: 4-6.
- Huang CJ, Harootunian A, Maher MP y col. Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical stimulation and fluorescence detection of membrane potential. *Nat Biotechnol* 2006; **24**: 439-46.
- Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI y col. 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.
- Ives AE, Jefferys JG. Synchronization of epileptiform bursts induced by 4-aminopyridine in the in vitro hippocampal slice preparation. *Neurosci Lett* 1990; **112**: 239-45.
- Kaminski, R. M., Banerjee, M. y Rogawski, M. A. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 2004; **46**:1097-1104.
- Kanner AM. Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biol Psychiatry* 2003; **54**: 388-98.
- Kanner AM. Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. *Curr Opin Neurol* 2008; **21**: 190-4.
- Kanner AM, Trimble M, Schmitz B. Postictal affective episodes. *Epilepsy Behav* 2010; **19**: 156-8.
- Koe BK, Weissman A, Welch WM y col. Sertraline, 1S,4S-N-methyl-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine, a new uptake inhibitor with selectivity for serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; **226**: 686-700.
- Kondziella D, Alvestad S, Vaaler A y col. Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? *J Neurochem* 2007; **103**: 2136-52.
- Kuhn DM, Vogel RL, Lovenberg W. Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; **82**: 759-66.
- Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; **342**: 314-9.
- Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; **36**: 764-85.
- Lingamaneni R, Hemmings HC, Jr. Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors. *Br J Anaesth* 2003; **90**: 199-211.

- Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular model of anticonvulsant drug binding to the voltage-gated sodium channel inner pore. *Mol Pharmacol* 2010; **78**: 631-8.
- Lopez-Meraz ML, Gonzalez-Trujano ME, Neri-Bazan L y col. 5-HT_{1A} receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 2005; **49**: 367-75.
- Loscher, W. and Horstermann, D. Differential effects of vigabatrin, γ -acetylenic GABA, aminooxyacetic acid, and valproate on levels of various amino acids in rat brain regions and plasma. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1994; **349**:270-278.
- Loscher W, Honack D, Fassbender CP y col. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res* 1991; **8**: 171-89.
- Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002; **50**: 105-123.
- Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; **20**: 359-68.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265-75.
- Lukyanetz, EA, Shkryl, VM, Kostyuk, PG. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia* 2002; **43**: 9-18
- 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.
- Mandrioli R, Mercolini L, Saracino MA y col. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs): therapeutic drug monitoring and pharmacological interactions. *Curr Med Chem* 2012; **19**: 1846-63.
- Mantegazza M, Curia G, Biagini G y col. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010; **9**: 413-24.
- Mihaly A, Bencsik K, Solymosi T. Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; **79**: 59-67.
- Miret M, Ayuso-Mateos JL, Sanchez-Moreno J y col. Depressive disorders and suicide: Epidemiology, risk factors, and burden. *Neurosci Biobehav Rev* 2013. En prensa
- Mula M. Epilepsy: Bidirectional link between epilepsy and psychiatric disorders. *Nat Rev Neurol* 2012; **8**: 252-3.
- 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.

- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ y col. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002; **34**: 13-25.
- Noe KH, Locke DE, Sirven JI. Treatment of depression in patients with epilepsy. *Curr Treat Options Neurol* 2011; **13**: 371-9.
- Noebels JL. Targeting epilepsy genes. *Neuron* 1996; **16**: 241-4.
- Obach RS, Cox LM, Tremaine LM. Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 262-70.
- Otoom S, Sequeira RP. Veratridine induced absence like-seizure in the freely moving rats: a study correlating the behavioural findings with the electrophysiological activities. *Neuro Endocrinol Lett*; **32**: 487-90.
- Panayiotopoulos CP. The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. *Epilepsia* 2012; **53**: 399-404.
- Perreault P, Avoli M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1991; **65**: 771-85.
- Perucca P, Gilliam FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol* 2012; **11**:792-802.
- Pisani F, Oteri G, Costa C y col. Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. *Drug Saf* 2002; **25**: 91-110.
- Prendiville S, Gale K. Anticonvulsant effect of fluoxetine on focally evoked limbic motor seizures in rats. *Epilepsia* 1993; **34**:381-4.
- Preskorn SH, Fast GA. Tricyclic antidepressant-induced seizures and plasma drug concentration. *J Clin Psychiatry* 1992; **53**: 160-2.
- Psarropoulou C, Avoli M. Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; **94**: 52-9.
- Richelson E. Pharmacology of antidepressants--characteristics of the ideal drug. *Mayo Clin Proc* 1994; **69**: 1069-81.
- Rodriguez R, Sitges M. Nigercin-induced Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ exchange in synaptosomes: effect on [3H]GABA release. *Neurochem Res* 1996; **21**: 889-95.
- Rogawski MA, Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 2004; **5**: 553-64.
- Ronfeld RA, Tremaine LM, Wilner KD. Pharmacokinetics of sertraline and its N-demethyl metabolite in elderly and young male and female volunteers. *Clin Pharmacokinet* 1997; **32 Suppl 1**: 22-30.
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A y col. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int* 2012; **61**: 546-58.

- Rudolph, U, Crestani F, Benke D, y col. Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature* **1999**; 401:796-800.
- Seethalakshmi R, Krishnamoorthy ES. Depression in epilepsy: phenomenology, diagnosis and management. *Epileptic Disord* 2007; **9**: 1-10.
- Seino M. Classification criteria of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsy Res* 2006 ;**70** Suppl 1:S27-33.
- 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.
- Sirven JI, Noe K, Hoerth M, Drazkowski J. Antiepileptic drugs 2012: recent advances and trends. *Mayo Clin Proc* 2012; **87**:879-89.
- Sitges M. Antiepileptic Drugs Targeting Cerebral Presynaptic Ion Channels Reduce Cerebral Excitability Decreasing Glutamate Release, Novel Treatment of Epilepsy (pp111-132), 2011. Prof. Humberto Foyaca-Sibat (Ed.), ISBN: 978-953-307-667-6 InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/novel-treatment-of-epilepsy/antiepileptic-drugs-targeting-cerebral-presynaptic-ion-channels-reduce-cerebral-excitability-decreas>
- Sitges M, Aldana BI, Chiu LM y col. Characterization of phenytoin, carbamazepine, vinpocetine and clorgyline simultaneous effects on sodium channels and catecholamine metabolism in rat striatal nerve endings. *Neurochem Res* 2009; **34**: 470-9.
- Sitges M, Chiu LM, Guarneros A y col. 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.
- Sitges M, Chiu LM, Nekrassov V. 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* 2006; **49**: 55-61.
- Sitges M, Galindo CA. Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca²⁺ channel-mediated changes in internal Ca²⁺ and glutamate release in depolarised brain nerve terminals. *Neurochem Int* 2005; **46**: 53-60.
- Sitges M, Galvan E, Nekrassov V. Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Neurochem Int* 2005; **46**: 533-40.
- 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.
- Sitges M, Nekrassov V, Guarneros A. Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res* 2000; **854**: 48-56.
- Sitges M, Pena F, Chiu LM y col. Study on the possible involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels; comparison with calcium channels. *Neurochem Int* 1998; **32**: 177-90.

- Smith RD, Goldin AL. Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1996; **16**: 1965-74.
- Sprouse J, Clarke T, Reynolds L y col. Comparison of the effects of sertraline and its metabolite desmethylsertraline on blockade of central 5-HT reuptake in vivo. *Neuropsychopharmacology* 1996; **14**: 225-31.
- Statnick MA, Maring-Smith ML, Clough RW y col. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Life Sci* 1996; **59**:1763-71.
- Stean TO, Atkins AR, Heidbreder CA y col. Postsynaptic 5-HT_{1B} receptors modulate electroshock-induced generalised seizures in rats. *Br J Pharmacol* 2005; **144**:628-35.
- Stevanovic D, Jancic J, Lakic 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.
- Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD y col. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* 1997; **340**: 249-58.
- Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jette N y col. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 2007; **48**: 2336-44.
- 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.
- Tripathi PP, Di Giovannantonio LG, Viegi A y col. Serotonin hyperinnervation abolishes seizure susceptibility in Otx2 conditional mutant mice. *J Neurosci* 2008; **28**:9271-6.
- Van Dycke A, Raedt R, Dauwe I y col. Continuous local intrahippocampal delivery of adenosine reduces seizure frequency in rats with spontaneous seizures. *Epilepsia* 2010; **51**: 1721-8.
- Vohora D, Saraogi P, Yazdani MA, Bhowmik M, Khanam R, Pillai KK. Recent advances in adjunctive therapy for epilepsy: focus on sodium channel blockers as third-generation antiepileptic drugs. *Drugs Today (Barc)* 2010; **46**:265-77.
- Wang GK, Mitchell J, Wang SY. Block of persistent late Na⁺ currents by antidepressant sertraline and paroxetine. *J Membr Biol* 2008; **222**: 79-90.
- Weiczner R, Krisztin-Peva B, Mihaly 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.
- White HS. Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. *Epilepsia* 2003; **44 Suppl 7**: 2-8.
- White, HS, Brown, SD, Woodhead y col. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res* 1997; **28**, 167-179.

- White HS, Wolf HH, Woodhead JH y col. The National Institutes of Health Anticonvulsant Drug Development Program: screening for efficacy. *Adv Neurol* 1998; **76**: 29-39.
- Wickenden AD, Yu W, Zou A y col. Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol* 2000; **58**:591-600.
- Willow M, Catterall WA. Inhibition of binding of [3H]batrachotoxinin A 20-alpha-benzoate to sodium channels by the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin and carbamazepine. *Mol Pharmacol*. 1982; **22**:627-35.
- Yamaguchi S, Rogawski MA. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 1992; **11**: 9-16.
- Yan QS, Jobe PC, Cheong JH y col. Role of serotonin in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy-prone rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; **350**:149-52.
- Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK y col. Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT-SSRI structures. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 652-7.

ANEXOS

Los dos primeros artículos de esta sección corresponden al Estudio I y II presentados en este trabajo. El tercer artículo corresponde a otro de los proyectos del laboratorio de la Dra. María Sitges en el que también participé durante el doctorado.

ORIGINAL
ARTICLESertraline inhibits pre-synaptic Na⁺ channel-mediated responses in hippocampus-isolated nerve endings

Blanca I. Aldana and María Sitges

*Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F., México***Abstract**

In the present study, a possible sertraline action on cerebral pre-synaptic Na⁺ channels was investigated. For this purpose, the effect of sertraline on responses induced by the Na⁺ channel opener, veratridine, namely the increase in Na⁺ and in neurotransmitter release in hippocampus-isolated nerve endings was investigated. Results show that sertraline in the low μM range (1.5–25 μM) progressively inhibits the rise in Na⁺ and the release of pre-loaded [³H]Glu as well as the release of endogenous 5-HT, Glu and GABA (detected by HPLC) induced by veratridine depolarization either under external Ca²⁺-free conditions or in the presence of external Ca²⁺. In addition, under non-depolarized conditions, sertraline (25 μM) increased the external concentration of 5-HT at expense of its

internal concentration, and unchanged the external and internal concentrations of the amino acid neurotransmitters and of the 5-HT main metabolite, 5-HIAA. This result is consistent with the sertraline inhibitory action of the serotonin transporter. However, sertraline is unlikely to inhibit pre-synaptic Na⁺ channels permeability by increasing external 5-HT. Because 5-HT in a wide concentration range (1–1000 μM) did not change the veratridine-induced increase in Na⁺. In summary, present findings demonstrate that besides the inhibition of 5-HT reuptake, sertraline is an effective inhibitor of pre-synaptic Na⁺ channels controlling neurotransmitter release.

Keywords: 5-HT, GABA, Glu, neurotransmitter release, sodium channels, veratridine.

J. Neurochem. (2012) **121**, 197–205.

Sertraline is a selective serotonin reuptake inhibitor that binds to the serotonin transporter and is broadly prescribed for the treatment of depression (Koe *et al.* 1983; Bolden-Watson and Richelson 1993; Tatsumi *et al.* 1997; Sheehan and Kamijima 2009). Depression is a common co-morbidity in patients with epilepsy (Kanner 2008; Bell and Sander 2009; Kanner *et al.* 2010; Stevanovic *et al.* 2011). Although some antidepressants lower seizure threshold, sertraline apparently can be safely used to treat depression in epileptic individuals (Seethalakshmi and Krishnamoorthy 2007).

Several of the most effective antiepileptic drugs reduce cerebral excitability and stop the brain paroxysmal neuronal activity accompanying seizures by blocking Na⁺ channels. Interestingly, in cultured human embryonic kidney cells sertraline reduced hNav 1.3 channel activity evoked by electrical field stimulation (Huang *et al.* 2006). In rat pituitary GH₃ cells endogenously expressing neuronal Nav 1.1, 1.2, 1.3 and Nav 1.6 Na⁺ channel isoforms sertraline also inhibited the persistent Na⁺ currents (Wang *et al.* 2008).

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. In comparison with other parts of the neuron, Na⁺ channels in pre-synaptic boutons are particularly abundant (Engel and Jonas 2005). Pre-synaptic boutons or nerve endings isolated from mammalian brain (synaptosomes) preserve many physiological properties of intact cerebral nerve endings, including a tight coupling of neurotransmitter release to ion fluxes during depolarization. The small size of cerebral nerve endings

Received October 6, 2011; revised manuscript received January 19 2012; accepted January 19, 2012.

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: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; EAAT, excitatory amino acid transporter; KRH, Krebs Ringer HEPES; SBFI, sodium-binding benzofuran isophthalate; SERT, selective 5-HT transporter.

makes difficult to use conventional electrophysiological techniques to depolarize them. However, the rate of Na⁺ entry in cerebral isolated nerve endings can be increased using the naturally occurring toxin veratridine that binds to the voltage sensor (site 2) of the Na⁺ channel impeding its inactivation. However, with the aid of the Na⁺ selective indicator dye, sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) which changes its emission fluorescence in response to changes in Na⁺ in its vicinity, the change in the internal concentration of Na⁺ can be monitored in cerebral isolated nerve endings. As judged by the changes in SBFI fluorescence, the increase in Na⁺ channels permeability induced by veratridine in cerebral isolated nerve endings is: inhibited by the Na⁺ channel blocker tetrodotoxin, independent of external Ca²⁺ and insensitive to the blockade of P/Q type Ca²⁺ channels with the ω -agatoxins: IVA and TK (Sitges *et al.* 1998; Sitges and Galindo 2005). Likewise neurotransmitter release induced by veratridine in synaptosomes depends on the presence of external Na⁺, is sensitive to tetrodotoxin and is independent of external Ca²⁺ (Sitges 1989; Sitges and Chiu 1995; Galindo and Sitges 2004; Sitges and Galindo 2005). Therefore the sensitivity of a veratridine induced response to a drug (particularly in the absence of external Ca²⁺) is highly indicative of a reduction in Na⁺ channels permeability. In previous studies, we found that various antiepileptic drugs inhibited the rise in Na⁺ and the release of the excitatory amino acid neurotransmitter Glu induced by veratridine in hippocampus synaptosomes under external Ca²⁺ free conditions (Sitges *et al.* 2006, 2007). For the purpose of unmasking, a possible effect of sertraline on cerebral pre-synaptic Na⁺ channels permeability, in the present study the effect of sertraline on the rise in Na⁺ and on the release of several neurotransmitters, including the excitatory amino acid neurotransmitter Glu in hippocampus isolated nerve endings under resting and veratridine depolarized conditions was investigated.

Materials and methods

Source of materials

Sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester and pluronic acid F-127 were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). L-[3, 4-³H]-Glutamic acid (spec. act. 52 Ci mmol⁻¹) was obtained from Perkin Elmer, Life Sciences Inc. (Boston, MA, USA). Veratridine, gramicidin D, probenecid and 1-octanesulfonic acid were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Sertraline was kindly provided by Psicofarma S.A. de C.V. (México). Tetrodotoxin was obtained from Research Biochemicals International. The *o*-phthalaldehyde reagent solution was from Pierce (Rockford, IL, USA). All other reagents were of analytical grade.

Isolation of hippocampus nerve endings

The hippocampi from four male Wistar rats (250–300 g) were dissected, immediately placed in cold isotonic sucrose (1/10, wt/vol)

and homogenized (6 strokes at 2000 rpm, 0.15 mm pestle-vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at 1500 g for 10 min, and the supernatants obtained from this centrifugation centrifuged at 9000 g for another 20 min. The resulting pellets containing the P2 fraction of the hippocampus isolated nerve endings were suspended in standard Krebs Ringer HEPES (KRH). For the [³H]Glu release experiments, the P2 fraction of hippocampus synaptosomes was purified further following a method previously described in Rodríguez and Sitges (1996).

The Institutional Animal Use and Care Committee approved all experimental procedures.

Buffers composition

The composition of the standard KRH (in mM) was: 127 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 3.37 KCl, 1 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 20 HEPES-Na⁺ and 5.6 mM dextrose, pH 7.4, bubbled with a O₂/CO₂ mixture. For eliminating the contribution of calcium channels concomitant to veratridine depolarization, synaptosomes were suspended or superfused in a Ca-free-KRH in which CaCl₂ was omitted and EGTA (100 μM) was added. Where indicated, the Ca-free-KRH also contained: sertraline, 5-HT, or tetrodotoxin at the concentrations indicated in the figures. The nerve endings exposed to the above conditions were depolarized with the same medium but containing veratridine at a 10 μM final concentration. In some experiments, the effects of certain drugs also were tested in synaptosomes suspended in the standard KRH containing Ca²⁺.

Na⁺ experiments

The method used to load synaptosomes with SBFI and to monitor its fluorescence was previously reported (Sitges *et al.* 1998, 2006). Briefly, P2 hippocampus synaptosomes pre-loaded with SBFI-acetoxymethyl ester were suspended in 1.6 mL of Ca-free-KRH. The intra-terminal concentration of Na⁺ was estimated in aliquots (150 μL) of this suspension at 3- to 5-s intervals. In the experiments which results are shown in Figs 1 and 4 the 340/380 nm baseline ratio was monitored for a few minutes in the absence or presence of sertraline or 5-HT before depolarization. An aliquot of a concentrated solution of veratridine was added to the cuvette (10 μM final) to depolarize the preparation. In the experiments which results are shown in Figs 5 and 6 after monitoring the baseline ratio for several minutes, synaptosomes were exposed to 10 μM veratridine and then to the drug to be tested (i.e. tetrodotoxin, sertraline or 5-HT). After each addition data points were collected for several minutes. The intra-terminal Na⁺ concentration was estimated using the respective calibration curve obtained in parallel in each experiment as previously reported (Galindo and Sitges 2004; Sitges *et al.* 2006).

[³H]Glu release experiments

The method used to follow [³H]Glu release was described previously (Sitges and Galindo 2005; Sitges *et al.* 2007). For the experiments shown in Fig. 2, aliquots (1 mL) of the purified synaptosomes pre-loaded with [³H]Glu were superfused with Ca-free-KRH without (control) or containing sertraline at increasing concentrations and then with the same media containing 10 μM veratridine. The radioactivity released and that remaining in the nerve endings was counted in a LS 6500 Beckman Scintillation counter. Results were expressed as the percentage released per min

of total radioactivity (i.e. the radioactivity released for the minutes of perfusion plus that remaining inside the nerve endings).

Endogenous neurotransmitters experiments

Hippocampus synaptosomes suspended in Ca-free-KRH or KRH, as indicated in the Tables, were pre-incubated at 37 °C for 5 min. Then 500 µL aliquots of those suspensions (containing 926 ± 84 µg/mL) were incubated at 37 °C for 10 min under the experimental conditions to be studied. Namely, absence or presence of: 25 µM sertraline, 10 µM veratridine, or 25 µM sertraline plus 10 µM veratridine. Incubation was stopped by centrifugation. The supernatants containing the released neurotransmitters and the pellets containing the neurotransmitters inside nerve endings were treated as described previously (Sitges *et al.* 2009). The neurotransmitter concentrations in the samples injected to the HPLC system were standardized per mg of synaptosomal protein. Results are expressed as the concentration of: 5-HT (in pmol), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) (in pmol), Glu (in nmol) and GABA (in nmol) released or retained inside hippocampus synaptosomes per mg of synaptosomal protein.

Determination of the concentrations of 5-HT and 5-HIAA

Twenty microliters of sample suspended in 0.1 M perchloric acid/0.1 mM EDTA were injected directly into a Waters HPLC system for analysis. The HPLC system consists of a delivery pump (model 510), a Rheodyne injector, an analytical column (resolve, C18, 150 × 3.9 mm internal diameter, particle size 5 µm) controlled at 30 °C, and an electrochemical detector (model DECADE) with glassy carbon used at a voltage of +0.8 V versus a KCl (3 M) reference electrode (range 1 nA). A mobile phase composed of 50 mM ortho-phosphoric acid/50 mM citric acid buffer, pH 3.1 adjusted with KOH, containing 13% (v/v) methanol, 100 mg/l octanesulfonic acid and 20 mg/l EDTA, at a flow rate of 1 mL/min, was applied for indoleamine elution. 5-HT and 5-HIAA concentrations in the experimental samples were calculated with calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of the external standard mixture (containing 5-HT, 5-HIAA, Glu and GABA) into the HPLC system.

Determination of the concentrations of Glu and GABA

Twenty microliters of sample suspended in 0.1 M perchloric acid/0.1 mM EDTA were mixed with 40 µL of *o*-phthalaldehyde reagent. After 120 s (strict time), a 20 µL aliquot of that mixture was injected into the HPLC system. An analytical column (Novapak C-18, 75 × 3.9 mm internal diameter, particle size 10 µm) set at 25 °C and a fluorescence detector set at 360 nm excitation and 450 nm emission wavelengths were used. A lineal gradient elution program performed over 27 min was applied for amino acid elution: eluent A (30 mM sodium acetate buffer, pH 6.8) from 90% to 70%, and eluent B (methanol) from 10% to 30%, at a flow rate of 1 mL/min. The concentrations of Glu and GABA in the experimental samples were calculated with the calibration curves.

Statistics

The analysis of variance (ANOVA) was used for statistical evaluations. From $p < 0.05$, the differences between data were considered statistically significant. The statistical differences between the specified experimental conditions are indicated in each table or figure.

Results

Effect of sertraline on the rise in the internal concentration of Na⁺ induced by veratridine in hippocampus isolated nerve endings

To unmask a possible inhibitory action of sertraline on cerebral pre-synaptic Na⁺ channels, the changes in the internal concentration of Na⁺ in SBFI pre-loaded hippocampus isolated nerve endings exposed to sertraline concentrations in the low µM range before and after veratridine depolarization were measured under external Ca²⁺-free conditions.

The effect of sertraline on the increase in Na⁺ induced by 10 µM veratridine in the absence of external Ca²⁺ is shown in Fig. 1. A representative experiment of the progressive inhibition exerted by sertraline in the range from 1.5 to 15 µM on the Na⁺ response to veratridine is shown in Fig. 1a. Notice that under resting conditions (i.e. before exposure to veratridine) the internal concentration of Na⁺ was unchanged by sertraline.

To obtain the net change in the internal concentration of Na⁺ induced by veratridine in the absence and presence of the increasing concentrations of sertraline, the average of data points obtained 2 min after veratridine depolarization minus the average of the baseline data points was calculated. Figure 1b shows that sertraline in the low µM range tested inhibits dose dependently the increase in the internal concentration of Na⁺ induced by veratridine. In Fig. 1b results are expressed in percentage of control (i.e. rise in Na⁺ to veratridine in the absence of sertraline).

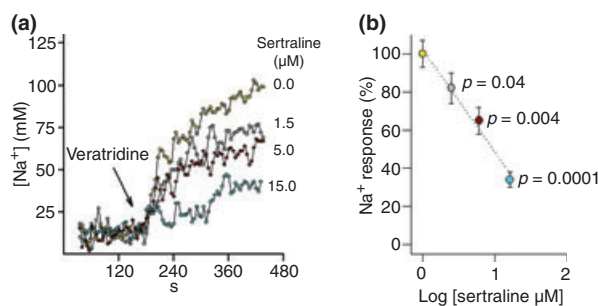


Fig. 1 Sertraline inhibits the rise in Na⁺ induced by veratridine in hippocampus isolated nerve endings in a dose-dependent manner. The cytoplasm Na⁺ concentration was estimated by the technique described in Materials and methods in the hippocampus isolated nerve endings pre-loaded with SBFI. Data points were taken at 5-s intervals. After measuring the baseline Na⁺ level in the absence (0 µM) or in the presence of sertraline at the indicated concentrations for about three minutes, the nerve endings were exposed to 10 µM veratridine and the cytoplasm Na⁺ concentration was monitored for another minutes. (a) Representative experiment showing the developed Na⁺ response to veratridine in the absence and presence of 1.5, 5 and 15 µM sertraline. (b) Dose-dependent inhibition of the veratridine-induced rise in Na⁺ exerted by sertraline at increasing concentrations (in percentage of control). Results are the mean ± SEM values of four experiments in independent preparations.

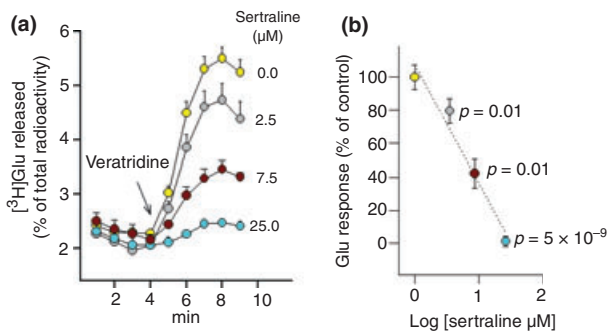


Fig. 2 Sertraline inhibits [^3H]Glu release induced by veratridine dose dependently. (a) Hippocampus isolated nerve endings pre-loaded with [^3H]Glu were superfused with Ca-free-KRH without (yellow circles) or containing sertraline at the indicated concentrations for several minutes. Where indicated (arrow) the above media also contained 10 μM veratridine. (b) Net [^3H]Glu release evoked by veratridine for 4 min (expressed in percentage of control) in the absence (zero) and in the presence of the indicated log sertraline concentration (in μM). The response to veratridine with zero sertraline was taken as 100%. The statistic significance between the veratridine-induced response in control and in sertraline-treated synaptosomes is indicated for each sertraline concentration. Results are the mean \pm SEM values of at least five experiments in independent preparations.

Effect of sertraline on [^3H]Glu release induced by veratridine in hippocampus isolated nerve endings

The effect of sertraline at increasing concentrations in the low μM range on the release of [^3H]Glu before and after veratridine depolarization also was tested. Figure 2a shows that before veratridine depolarization, namely under resting conditions, the presence of sertraline in the range from 2.5 to 25 μM did not modify the release of [^3H]Glu. In contrast, at those concentrations sertraline progressively inhibited the release of the pre-loaded radioactive neurotransmitter evoked by veratridine.

Results in Fig. 2b represent the inhibition (in percentage of control) exerted by sertraline at the increasing concentrations tested on the net response to veratridine. The net response to veratridine refers to the [^3H]Glu released for 4 min (minutes 6–9 in Fig 2a) minus the respective extrapolated baseline. This figure shows that at a concentration of 2.5 μM sertraline inhibited [^3H]Glu release to veratridine in $20 \pm 7\%$, at a concentration of 7.5 μM $58 \pm 8\%$ and at 25 μM , sertraline abolished [^3H]Glu release to veratridine (the inhibition reached $99 \pm 3\%$).

To eliminate any contribution of Ca^{2+} channels in [^3H]Glu release to veratridine these experimental series also were carried out in the absence of external Ca^{2+} .

Effect of the absence of a Na^+ gradient or the presence of tetrodotoxin on [^3H]Glu release induced by veratridine in hippocampus isolated nerve endings

Figure 3 shows that the increase in [^3H]Glu release induced by veratridine from hippocampus synaptosomes superfused

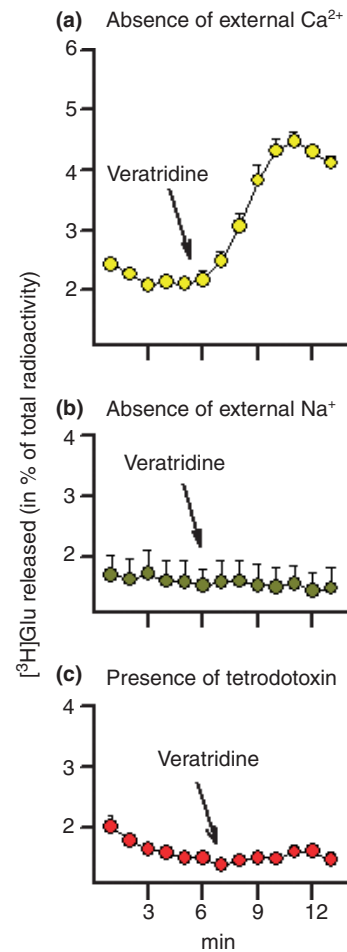


Fig. 3 The increase in [^3H]Glu release induced by veratridine in hippocampus synaptosomes depends on the entrance of Na^+ via tetrodotoxin sensitive Na^+ channels. [^3H]Glu-preloaded hippocampus synaptosomes superfused with: (a) Ca-free KRH, (b) Na-free KRH and (c) KRH containing 1 μM tetrodotoxin. Where indicated (arrow) those media also contained 10 μM veratridine. Results are the mean \pm SEM values of three experiments in independent preparations.

in the absence of external Ca^{2+} is completely abolished in the absence of a Na^+ gradient (Fig. 3b) or when Na^+ channels are blocked by tetrodotoxin (Fig. 3c), a toxin of natural origin that binds irreversibly to the external pore of the Na^+ channel and by this means blocks Na^+ entrance into the cytoplasm.

Simultaneous effect of sertraline on the external concentrations of 5-HT, Glu and GABA

As sertraline is known as a selective 5-HT re-uptake inhibitor its effect on the external concentration of 5-HT in hippocampus isolated nerve endings was investigated first under resting conditions. As the method used allows us to detect the changes produced in the concentration of several endogenous neurotransmitters in the same aliquot of hippo-

Table 1 Distribution of 5-HT and amino acid neurotransmitters under external Ca²⁺-free conditions in the absence and presence of sertraline

	5-HT released	5-HT inside	5-HT total
Control	15 ± 1.2	42 ± 2.7	57 ± 3.8
Sertraline 25 μM	23 ± 1.7*	34 ± 0.8*	56 ± 2.4
	Glu released	Glu inside	Glu total
Control	8 ± 0.8	63 ± 3.9	71 ± 3.9
Sertraline 25 μM	6 ± 0.9	58 ± 3.5	65 ± 3.8
	GABA released	GABA inside	GABA total
Control	1 ± 0.1	11 ± 0.8	12 ± 0.8
Sertraline 25 μM	1 ± 0.1	11 ± 0.7	12 ± 0.7

5-HT concentration is in pmol/mg of synaptosomal protein. Glu and GABA concentrations are in nmol/mg of synaptosomal protein. Results are the mean ± SEM values of five experiments in independent preparations.

**p* < 0.01 between control and sertraline-treated synaptosomes.

campus synaptosomes incubated for 10 min, the effect of sertraline on Glu and GABA was measured as well. The first column in Table 1 shows that in the hippocampus isolated nerve endings exposed to sertraline at a concentration of 25 μM in the absence of external Ca²⁺, the external concentration of 5-HT slightly increased whereas the external concentrations of the amino acid neurotransmitters were unchanged.

In these experiments, we also measured the concentration of those neurotransmitters remaining inside the nerve endings after 10 min.

The second column in Table 1 shows that in the sertraline-treated synaptosomes the internal concentration of 5-HT decreased in about the same extent as the increase in external 5-HT, and did not change the internal concentrations of Glu and GABA. The third column of Table 1 shows that under resting conditions the total neurotransmitters concentrations are unchanged by sertraline. The total neurotransmitter concentration is the summation of the external and the internal concentrations of a specific endogenous neurotransmitter after 10 min.

The concentration of 5-HIAA, the 5-HT metabolite, also was unchanged by sertraline. For instance, in the control synaptosomes incubated in the absence of external Ca²⁺ total 5-HIAA was 89 ± 3.8 pmol/mg of synaptosomal protein and in sertraline-treated synaptosomes 84 ± 3.1 pmol/mg.

Effect of sertraline on veratridine induced endogenous neurotransmitters release

To further explore a possible effect of sertraline on Na⁺ channels, its effect on the release of the three endogenous neurotransmitters induced by depolarization with the Na⁺ channel opener veratridine was tested. The first column in

Table 2 Net changes in neurotransmitter distribution induced by veratridine under Ca²⁺-free conditions in the absence and presence of sertraline

	5-HT released	5-HT inside	5-HT total
Veratridine	7.8 ± 1.2	-5.4 ± 1.4	2.4 ± 1.8
Sertraline + veratridine	-0.3 ± 0.4*	-0.1 ± 0.8*	-0.4 ± 1.1
	Glu released	Glu inside	Glu total
Veratridine	32 ± 3.7	-27 ± 3.7	5 ± 5.8
Sertraline + veratridine	3 ± 0.6*	2 ± 3.6*	5 ± 3.5
	GABA released	GABA inside	GABA total
Veratridine	10 ± 0.9	-5.1 ± 0.7	5 ± 0.9
Sertraline + veratridine	1 ± 0.2*	-0.3 ± 1.1*	1 ± 1.1*

5-HT concentration is in pmol/mg of synaptosomal protein. Glu and GABA concentrations are in nmol/mg of synaptosomal protein. Results are the mean ± SEM values of six experiments in independent preparations.

**p* < 0.01 between control and sertraline-treated synaptosomes.

Table 2 shows that sertraline (25 μM) practically abolished the veratridine-induced release of all the neurotransmitters tested, namely 5-HT, Glu and GABA in the hippocampus isolated nerve endings. The net release induced by veratridine refers to the release to veratridine minus the respective baseline release.

Effect of sertraline on 5-HT and 5-HIAA concentrations in the presence of external Ca²⁺

Previous experiments designed to test the effects of sertraline, namely those which results are shown in Figs 1 and 2 and in Tables 1 and 2, were done under external Ca²⁺-free conditions. However, taking into account that 5-HT synthesis depends on Ca²⁺ (Kuhn *et al.* 1978) and that the concentration of 5-HT in the synaptosomes incubated for 10 min under Ca²⁺-free conditions was small, we decided to also test the effect of sertraline on the external concentration of 5-HT and its metabolite in hippocampus synaptosomes incubated for the same time (10 min) in KRH containing Ca²⁺. Table 3 shows that as for the case of synaptosomes incubated under external Ca²⁺-free conditions, sertraline increased the external concentration of 5-HT and proportionally decreased its internal concentration. The concentration of 5-HIAA in synaptosomes incubated in the presence of external Ca²⁺ also was unchanged by sertraline. However, the total 5-HT concentration in the presence of external Ca²⁺ was two times higher than in the absence of external Ca²⁺ in both, the control and the sertraline-treated synaptosomes. Interestingly, in the presence of external Ca²⁺ the total 5-HIAA concentration decreased slightly.

Table 3 Effect of sertraline on 5-HT and 5HIAA distribution under resting conditions in the presence of external Ca^{2+}

	5-HT released	5-HT inside	5-HT total
Control	20 ± 2.3	83 ± 3.3	103 ± 3.3
Sertraline 25 μM	42 ± 4.5*	61 ± 8.1*	104 ± 4.5
	5-HIAA released	5-HIAA inside	5-HIAA total
Control	45 ± 6.4	27 ± 3.1	72 ± 4.5
Sertraline 25 μM	47 ± 5.8	28 ± 5.2	75 ± 4.2

Monoamines concentration is in pmol/mg of synaptosomal protein. Results are the mean ± SEM values of three experiments in independent preparations.

* $p < 0.01$ between control and sertraline-treated synaptosomes.

Effect of sertraline on veratridine induced 5-HT release in the presence of external Ca^{2+}

The effect of veratridine depolarization on the distribution of the monoamines 5-HT and 5-HIAA in control and sertraline treated synaptosomes incubated in the presence of external Ca^{2+} was also tested. The first row in Table 4 shows that veratridine releases 5-HT at expense of internal 5-HT without modifying the total neurotransmitter concentration. In the first column of Table 4 it is shown that the net increase in 5-HT release induced by veratridine (i.e. minus the respective baseline release) was again, as in the absence of external Ca^{2+} , practically abolished by sertraline (25 μM), whereas the external 5-HIAA concentration was unchanged by veratridine depolarization either in the control or the sertraline-treated synaptosomes. The concentration of 5-HIAA inside the preparation also was unchanged by veratridine with or without the presence of sertraline.

Table 4 Effect of sertraline on the net changes in monoamines distribution induced by veratridine in the presence of external Ca^{2+}

	5-HT released	5-HT inside	5-HT total
Veratridine	29.4 ± 3.4	-27.3 ± 0.7	2.2 ± 2.8
Sertraline + veratridine	2.8 ± 1.3*	-9.7 ± 3.1*	-7.0 ± 1.8
	5-HIAA released	5-HIAA inside	5-HIAA total
Veratridine	1.2 ± 2.8	-0.4 ± 2.1	0.8 ± 4.5
Sertraline + veratridine	-0.6 ± 0.5	-1.7 ± 0.6	-2.3 ± 2.7

Monoamines concentration is in pmol/mg of synaptosomal protein. Results are the mean ± SEM values of at least three experiments in independent preparations.

* $p < 0.005$ between veratridine responses in the absence and presence of sertraline.

5-HT failed in modifying the internal concentration of Na^+ in hippocampus isolated nerve endings under resting or veratridine-depolarized condition

For exploring a possible involvement of 5-HT in the inhibition exerted by sertraline on the increase in Na^+ induced by veratridine, the effect of 5-HT at concentrations in the low μM range on the rise in Na^+ to veratridine in hippocampus synaptosomes was also tested.

A representative experiment of the developed Na^+ response to veratridine in the absence or presence of 1 and 10 μM 5-HT is in Fig. 4a, which shows that 5-HT, at those concentrations was unable to change the internal concentration of Na^+ either under resting or under veratridine depolarized conditions. The net change in the internal concentration of Na^+ induced by veratridine in the absence and presence of the above 5-HT concentrations is in Fig. 4b.

To further explore a possible involvement of 5-HT in the inhibition exerted by sertraline on the increase in Na^+ induced by veratridine, the action of 5-HT in the same aliquot of hippocampus isolated nerve endings pre-depolarized with veratridine was tested. Using this approach, 5-HT at a concentration of 10 μM failed again to decrease the rise in Na^+ induced by veratridine (Fig. 5a). Also 5-HT at higher concentrations (100 and 1000 μM) failed to reduce the rise in pre-synaptic Na^+ induced by veratridine (Figs. 5b and c).

Comparison of sertraline and tetrodotoxin effects on the Na^+ response to veratridine

The effect of sertraline on the veratridine-induced increase in Na^+ was tested using the above experimental design too. Figure 6a shows that when synaptosomes were first depolarized with veratridine and then exposed to 25 μM

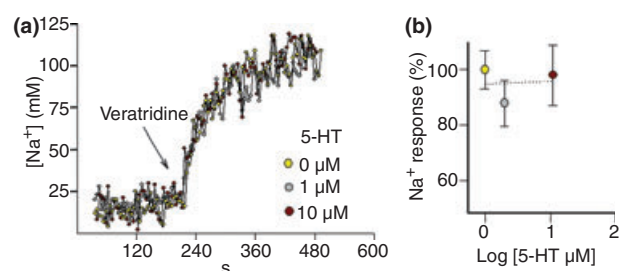


Fig. 4 The Na^+ response to veratridine is 5-HT insensitive. After measuring the baseline Na^+ level in SBFI pre-loaded hippocampus synaptosomes suspended in KRH without (0 μM) or containing 5-HT at the indicated concentrations for about 3 min, the nerve endings were exposed to 10 μM veratridine and the cytoplasm Na^+ concentration was monitored for another minutes. (a) Representative experiment showing the developed Na^+ response to veratridine in the absence or presence of 1 and 10 μM 5-HT. (b) Na^+ response to veratridine in the absence or presence of 1 and 10 μM 5-HT. Response to veratridine in the absence of 5-HT were taken as 100%. Results are the mean ± SEM values of four experiments in independent preparations.

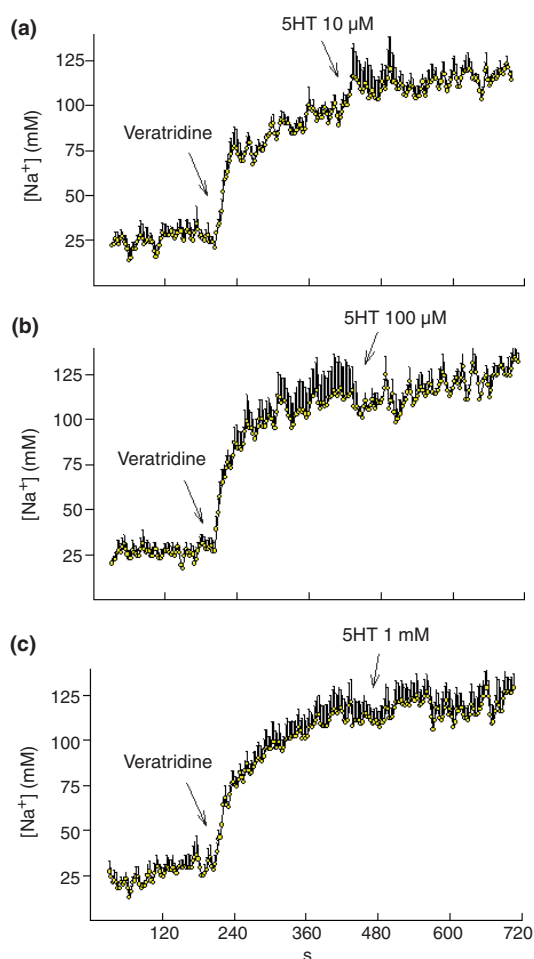


Fig. 5 Failure of 5-HT at higher concentrations to reduce the rise in Na⁺ induced by veratridine pre-depolarization. After measuring the baseline level of internal Na⁺ for about 200 s, the nerve endings were depolarized with veratridine 10 μM (first arrow) and the Na⁺ level monitored for another 4 min. The pre-depolarized nerve endings were then exposed (second arrow) to 5-HT: (a) 10, (b) 100 and (c) 1000 μM and Na⁺ monitored for another 4 min. Results are representative experiments of four experiments in independent preparations under each condition.

sertraline, the inhibition exerted by sertraline on the rise in Na⁺ to veratridine was again clearly observed. Figure 6b shows that the increase in Na⁺ pre-induced in the nerve endings pre-depolarized with veratridine also progressively approached to baseline values within the following seconds after exposure to 1 μM of the Na⁺ channel blocker, tetrodotoxin.

Discussion

The present study shows that sertraline, a drug known as a selective 5-HT transporter (SERT) inhibitor, inhibited the rise in Na⁺ and the increase in neurotransmitters release

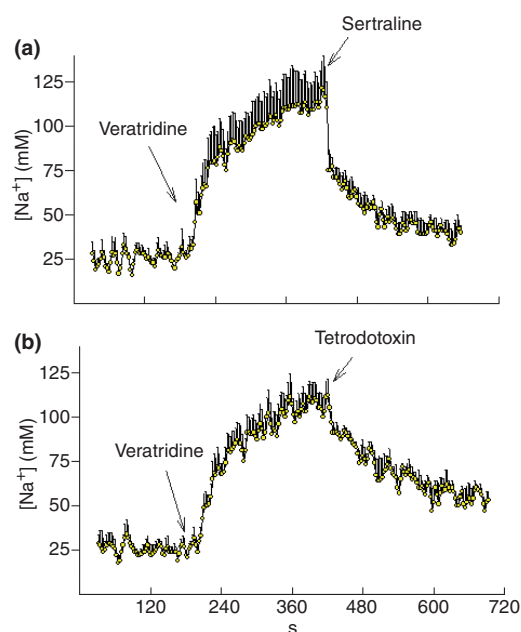


Fig. 6 The increase in Na⁺ induced by veratridine pre-depolarization is sensitive to sertraline and to tetrodotoxin. After measuring the baseline Na⁺ level, the hippocampus nerve endings were depolarized with 10 μM veratridine (first arrow), and the Na⁺ level monitored for about 4 min. The pre-depolarized nerve endings were then exposed (second arrow) to: (a) 25 μM sertraline and (b) 1 μM tetrodotoxin and the Na⁺ level monitored for another minutes. Results are representative experiments of four experiments in independent preparations under each condition.

induced by veratridine depolarization in hippocampus isolated nerve endings in the low μM range (from 1.5 to 25 μM). In addition, under non-depolarized conditions 25 μM sertraline increased the baseline release of 5-HT without modifying the baseline release of Glu and GABA, or the external concentration of 5-HIAA, which is the main 5-HT metabolite.

Depolarization evoked neurotransmitter release is composed of a Ca²⁺-dependent fraction released by exocytosis and a Na⁺-dependent fraction presumably released from the cytoplasm by reversal of the neurotransmitter transporters (Sitges *et al.* 1993, 1994). Under external Ca²⁺-free conditions, the participation of Ca²⁺ channels in the veratridine-induced responses, including neurotransmitter exocytosis is eliminated. Here, we found that the increase in Na⁺ and the release of Glu, GABA and 5-HT induced by veratridine in the absence of external Ca²⁺ was inhibited by sertraline (Figs 1 and 2 and Table 2). The complete failure of veratridine to increase the baseline release of [³H]Glu in the hippocampus synaptosomes superfused in the absence of external Na⁺ or in the presence of the Na⁺ channel blocker tetrodotoxin (Fig. 3) confirms the participation of Na⁺ channels in the sertraline sensitive veratridine induced

responses. In contrast, the independence of external Ca^{2+} of [^3H]Glu release to veratridine suggests that the increase in the internal concentration of Na^+ induced by veratridine may induce neurotransmitter release by reversal of the neurotransmitter-transporters. In line with the hypothesis that the increase in Na^+ induced by veratridine is reversing the neurotransmitter transporters with the concomitant neurotransmitter release, in a previous study in hippocampus isolated nerve endings we found that [^3H]Glu release induced by veratridine in the absence of external Ca^{2+} was sensitive to the excitatory amino acid transporter (EAAT)-inhibitor, DL-threo-beta-Benzyloxyaspartic acid (Sitges *et al.* 2007). However, the possibility that the inhibition of the veratridine-induced release of [^3H]Glu exerted by sertraline could involve inhibition of the EAAT rather than pre-synaptic Na^+ channels permeability is unlikely. Because sertraline also inhibited the veratridine-induced release of GABA and of 5-HT that do not involve reversal of the EAAT.

Nonetheless, present findings also show that in the presence of external Ca^{2+} the net release of 5-HT induced by veratridine was about fourfold higher than in its absence (compare the first two rows in Tables 2 and 4). This higher efficacy of veratridine to release 5-HT in media containing Ca^{2+} may be due to the additional 5-HT released from the vesicular pool by exocytosis. For the reason that in the presence of external Ca^{2+} veratridine depolarization also increases Ca^{2+} (as judged by the changes in fura-2 fluorescence) in hippocampus-isolated nerve endings (Sitges and Galindo 2005). Nevertheless, the inhibition exerted by sertraline on the release of 5-HT induced by veratridine in the presence of external Ca^{2+} is likely to also involve a reduced permeability of pre-synaptic Na^+ channels. Because sertraline completely inhibited the increase in 5-HT release induced by veratridine both, in the absence or presence of external Ca^{2+} , independently of the amount of 5-HT released. Moreover, in the presence of Ca^{2+} 5-HT synthesis may be also increased. Because, under resting conditions, and independently of the presence of sertraline, the total 5-HT concentration (released plus retained) is about twice in the hippocampus synaptosomes incubated in Ca^{2+} containing media (third line in Table 3) than in Ca^{2+} -free media (third line in Table 1). A possible explanation of this difference could be that tryptophan-hydroxylase, the enzyme that synthesizes 5-HT, requires Ca^{2+} for its activity (Kuhn *et al.* 1978).

In addition to the inhibition of the veratridine-induced release of: Glu, 5-HT and GABA exerted by sertraline, that is likely to involve a reduced permeability of pre-synaptic Na^+ channels, sertraline also may be blocking the SERT. This is indicated by the increase exerted by sertraline in the external concentration of 5-HT (at expense of the internal 5-HT concentration) under resting conditions, either in the absence (Table 1) or presence (Table 3) of external Ca^{2+} . This classic 5-HT reuptake blocking effect of sertraline indicated by the increase in the external 5-HT concentration under

non-depolarized conditions contrasts with the failure of sertraline to increase the external concentrations of the other neurotransmitters tested, namely Glu and GABA (Table 1). Although the possibility that sertraline is blocking all those neurotransmitters transporters cannot be completely discarded, as the action of the Na^+ -dependent transporters under non-depolarized and depolarize conditions could be different.

Pre-synaptic 5-HT-1B receptors coupled to adenylyl cyclase in glutamatergic nerve endings have been described (Boeijinga and Boddeke 1996). Adenylyl cyclase is the enzyme that catalyzes cAMP synthesis. One of the main targets of cAMP is PKA; which in turn was shown to modulate voltage sensitive Na^+ channels permeability (Gershon *et al.* 1992; Smith and Goldin 1992). However, the increase in external 5-HT caused by SERT inhibition by sertraline is unlikely to be linked with the inhibition of the veratridine-induced rise in Na^+ exerted by sertraline. Because exposure of hippocampus synaptosomes to 5-HT in a wide range of concentrations was unable to reduce the rise in Na^+ induced by veratridine (Figs 4 and 5). Besides, in the superfusion experiments sertraline also inhibited the release [^3H]Glu induced by veratridine, and the continuous superfusion system continuously removes neurotransmitters released to the external medium preventing both, 5-HT accumulation and 5HT-1B receptors activation.

Taken all together present data suggest that sertraline inhibits the veratridine depolarization-induced release of pre-loaded [^3H]Glu, as well as endogenous 5-HT, Glu and GABA by decreasing pre-synaptic Na^+ channels permeability. The rise in Na^+ induced by veratridine (independently of the absence or presence of external Ca^{2+}) is likely to reverse several neurotransmitter transporters (as they are dependent on the Na^+ gradient). As the changes linked to the persistent activation of sodium channels exerted by veratridine are likely to more closely resemble the sustained excitability that takes place during seizures (Fekete *et al.* 2009; Ootom and Sequeira 2011), and several of the most common antiepileptic drugs also inhibited the Na^+ channel-mediated veratridine-induced responses in hippocampus synaptosomes (Sitges *et al.* 2007), the possibility of an anticonvulsant action of this antidepressant cannot be discarded. Nonetheless, it is worthy to mention that the peak plasma concentrations of sertraline at therapeutic doses are in the sub-micromolar range (Doran *et al.* 2005), and in the cerebrospinal fluid probably even lower, whereas in the hippocampal isolated nerve endings the effective concentrations were much higher.

Acknowledgements

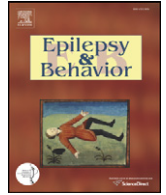
The authors thank Araceli Guarneros and Luz María Chiu for their excellent technical assistance. This work was financially supported by project IN207912 from PAPIIT and by Psicofarma S.A. de C.V.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Bell G. S. and Sander J. W. (2009) Suicide and epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* **22**, 174–178.
- Boeijinga P. H. and Boddeke H. W. (1996) Activation of 5-HT_{1B} receptors suppresses low but not high frequency synaptic transmission in the rat subicular cortex in vitro. *Brain Res.* **721**, 59–65.
- Bolden-Watson C. and Richelson E. (1993) Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sci.* **52**, 1023–1029.
- Doran A., Obach R. S., Smith B. J. *et al.* (2005) The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 165–174.
- Engel D. and Jonas P. (2005) Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **45**, 405–417.
- Fekete A., Franklin L., Ikemoto T., Rózsa B., Lendvai B., Vizi E. S. and Zelles T. (2009) Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca elevation: implication for epilepsy. *J. Neurochem.* **111**, 745–756.
- Galindo C. and Sitges M. (2004) Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings. Comparison with -agatoxin IVA. *Neurochem. Res.* **29**, 659–669.
- Gershon E., Weigi L., Lotan I., Schreiber W. and Dascal N. (1992) Protein kinase A reduces voltage-dependent Na⁺ current in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **12**, 3743–3752.
- Huang C. J., Harootunian A., Maher M. P., Quan C., Raj C. D., McCormack K., Numann R., Negulescu P. A. and González J. E. (2006) Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical stimulation and fluorescence detection of membrane potential. *Nat. Biotechnol.* **24**, 439–446.
- Kanner A. M. (2008) Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. *Curr. Opin. Neurol.* **21**, 190–194.
- Kanner A. M., Trimble M. and Schmitz B. (2010) Postictal affective episodes. *Epilepsy Behav.* **19**, 156–158.
- Koe B. K., Weissman A., Welch W. M. and Browne R. G. (1983) Sertraline, 1S,4S-N-methyl-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine, a new uptake inhibitor with selectivity for serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 686–700.
- Kuhn D. M., Vogel R. L. and Lovenberg W. (1978) Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 759–766.
- Otoom S. and Sequeira R. P. (2011) Veratridine induced absence like-seizure in the freely moving rats: a study correlating the behavioral findings with the electrophysiological activities. *Neuro Endocrinol. Lett.* **32**, 487–490.
- Rodríguez R. and Sitges M. (1996) Nigericin-induced Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ exchange in synaptosomes: effect on [³H]GABA release. *Neurochem. Res.* **21**, 889–895.
- Seethalakshmi R. and Krishnamoorthy E. S. (2007) Depression in epilepsy: phenomenology, diagnosis and management. *Epileptic Disord.* **9**, 1–10.
- Sheehan D. V. and Kamijima K. (2009) An evidence-based review of the clinical use of sertraline in mood and anxiety disorders. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **24**, 43–60.
- Sitges M. (1989) Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on σ -amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J. Neurochem.* **53**, 436–441.
- Sitges M. and Chiu L. M. (1995) w-Aga IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of [³H]GABA from synaptosomes. *Neurochem. Res.* **20**, 1065–1071.
- Sitges M. and Galindo C. A. (2005) Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca²⁺ channel-mediated changes in internal Ca²⁺ and glutamate release in depolarised brain nerve terminals. *Neurochem. Int.* **46**, 53–60.
- Sitges M., Chiu L. M. and Gonzalez L. (1993) Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [3H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem. Res.* **18**, 1081–1087.
- Sitges M., Reyes A. and Chiu L. M. (1994) Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J. Neurosci. Res.* **39**, 11–22.
- Sitges M., Peña F., Chiu L. M. and Guarneros A. (1998) Study on the possible involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels; comparison with calcium channels. *Neurochem. Int.* **32**, 177–190.
- Sitges M., Chiu L. M. and Nekrassov V. (2006) 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.* **49**, 55–61.
- Sitges M., Chiu L. M. and Nekrassov V. (2007) 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., Aldana B. I., Chiu L. M. and Nekrassov V. (2009) Characterization of phenytoin, carbamazepine, vinpocetine and cloglyline simultaneous effects on sodium channels and catecholamine metabolism in rat striatal nerve endings. *Neurochem. Res.* **34**, 470–479.
- Smith R. D. and Goldin A. L. (1992) Protein kinase A phosphorylation enhances sodium channel currents in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* **263**, C660–C666.
- Stevanovic D., Jancic J. and Lacic A. (2011) The impact of depression and anxiety disorder symptoms on the health-related quality of life of children and adolescents with epilepsy. *Epilepsia* **52**, e75–e78.
- Tatsumi M., Groshan K., Blakely R. D. and Richelson E. (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **340**, 249–258.
- Wang G. K., Mitchell J. and Wang S. Y. (2008) Block of persistent late Na⁺ currents by antidepressant sertraline and paroxetine. *J. Membr. Biol.* **222**, 79–90.



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 xxxx

Keywords:

4-aminopyridine
Carbamazepine
Depression in epilepsy
Pentylentetrazole

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 pentylentetrazole (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 pentylentetrazole (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 ± 2 μV. 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 μV. 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 μV) in the baseline EEG amplitude (39 μV). 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 × 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

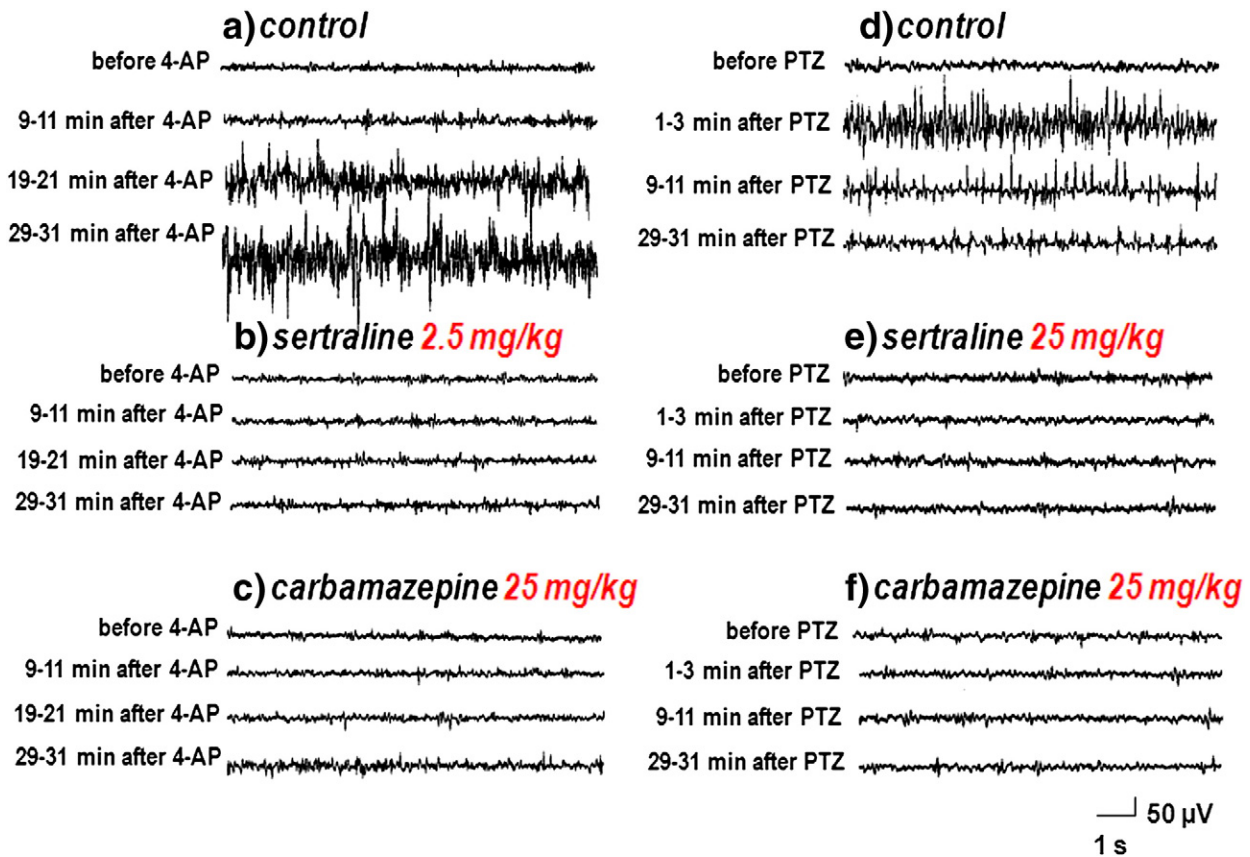


Fig. 1. Representative recordings of 4-AP and PTZ-induced EEG changes in the absence and presence of sertraline and carbamazepine at the indicated doses. Left graphs are representative EEG recordings taken before (*i.e.*, baseline EEG activity) and at the indicated time intervals following 4-AP in a 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 μV 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 μV).

* $P < 0.002$ 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 μV).

* $P < 0.04$ 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⁺, Ca²⁺ 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.



ELSEVIER

journal homepage: www.elsevier.com/locate/epilepsyres



Vinpocetine inhibits glutamate release induced by the convulsive agent 4-aminopyridine more potently than several antiepileptic drugs

M. Sitges*, B.M. Sanchez-Tafolla, L.M. Chiu, B.I. Aldana, A. Guarneros

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.70228, Ciudad Universitaria, 04510 México City, Mexico

Received 16 December 2010; received in revised form 8 June 2011; accepted 11 June 2011

Available online 7 July 2011

KEYWORDS

Carbamazepine;
Lamotrigine;
Oxcarbazepine;
Phenytoin;
Tetrodotoxin;
Topiramate

Summary 4-Aminopyridine (4-AP) is a convulsing agent that *in vivo* preferentially releases Glu, the most important excitatory amino acid neurotransmitter in the brain. Here the ionic dependence of 4-AP-induced Glu release and the effects of several of the most common antiepileptic drugs (AEDs) and of the new potential AED, vinpocetine on 4-AP-induced Glu release were characterized in hippocampus isolated nerve endings pre-loaded with labelled Glu ($[^3\text{H}]\text{Glu}$). 4-AP-induced $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release was composed by a tetrodotoxin (TTX) sensitive and external Ca^{2+} dependent fraction and a TTX insensitive fraction that was sensitive to the excitatory amino acid transporter inhibitor, TBOA. The AEDs: carbamazepine, phenytoin, lamotrigine and oxcarbazepine at the highest dose tested only reduced $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP between 50–60%, and topiramate was ineffective. Vinpocetine at a much lower concentration than the above AEDs, abolished $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP. We conclude that the decrease in $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release linked to the direct blockade of presynaptic Na^+ channels, may importantly contribute to the anticonvulsant actions of all the drugs tested here (except topiramate); and that the significantly greater vinpocetine effect in magnitude and potency on $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release when excitability is exacerbated like during seizures, may involve the increase additionally exerted by vinpocetine in some K^+ channels permeability.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The epileptiform activity induced by 4-aminopyridine (4-AP) is amply documented in hippocampus slices *in vitro*

as in animal models of epilepsy *in vivo* (Ives and Jefferys, 1990; Perreault and Avoli, 1991; Yamaguchi and Rogawski, 1992; Psarropoulou and Avoli, 1996; Armand et al., 1999; Nekrassov and Sitges, 2003). The action of 4-AP at the brain pre-synaptic level also is amply documented. In cerebral isolated nerve endings (synaptosomes) 4-AP increases neurotransmitters release, including Glu (Tapia and Sitges, 1982; Tibbs et al., 1989), the most important excitatory amino acid neurotransmitter in the brain, that is by far the most

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56228960;
fax: +52 55 56229198.

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

concentrated neurotransmitter in cerebral isolated nerve endings (Sitges et al., 2000). In addition, 4-AP was shown to increase the internal concentration of Ca^{2+} , as judged by changes in fura-2 fluorescence (Tibbs et al., 1989; Heemskerk et al., 1991; Galván and Sitges, 2004; Sitges et al., 2005); to increase the internal concentration of Na^+ , as judged by SBFI fluorescence, and to decrease the internal concentration of K^+ , as judged by PBFI fluorescence in synaptosomes (Galván and Sitges, 2004).

There is an uncovered medical need for the treatment of epilepsies. Vinpocetine is a new potential AED that in the guinea pig *in vivo* prevented seizures and the epileptiform activity induced by pentylentetrazole and 4-AP at lower doses than the classical antiepileptic drugs (AEDs): carbamazepine, phenytoin and valproate (Nekrassov and Sitges, 2006, 2008). The involvement of brain pre-synaptic Na^+ channels in the mechanism of action of vinpocetine and carbamazepine is supported by the sensitivity of the increase in the internal concentration of Na^+ induced by 4-AP and veratridine depolarization to those anticonvulsants in cerebral isolated nerve endings (Sitges et al., 2005; Ambrosio et al., 2001).

Taking into account that experimental epilepsy can be induced by increasing cerebral excitatory neurotransmission, that Glu is the most important excitatory neurotransmitter in the brain, and the particular seizure susceptibility of the hippocampus (Zilberter, 2007), in the present study the efficacy and potency of several AEDs of the first and second generations and of vinpocetine on $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by 4-AP were compared in nerve endings isolated from the hippocampus.

Materials and methods

Source of materials

Drugs used in the experiments were acquired from the following companies: vinpocetine (eburnamenine-14-carboxylic acid ethyl ester) was obtained either from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) or from Psicofarma S.A. de C.V. (México). Topiramate, lamotrigine, TTX and 4-AP were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Carbamazepine was obtained either from ICN Biomedicals Inc. (Ohio) or from Psicofarma S.A. de C.V. (México). Oxcarbazepine and phenytoin (5,5-diphenylhydantoin sodium salt) were from Psicofarma S.A. de C.V. (México). L- $[3,4\text{-}^3\text{H}]\text{-glutamic acid}$ (spec. act. 51 Ci mmol^{-1}) was from Perkin Elmer, Life Sciences Inc. (Boston, MA) and DL-threo- β -benzyloxyaspartic acid (TBOA) from TOCRIS bioscience (Bristol, UK). The o-phthalaldehyde reagent solution was from Pierce (Rockford, ILL). All other reagents were of analytical grade.

Isolation of hippocampus nerve endings and buffers composition

The hippocampi from four male Wistar rats (230–280 g) were dissected, immediately placed in cold isotonic sucrose (1:10, w/v) and homogenized (6 strokes at 2000 rpm, 0.15 mm pestle-vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at $1100 \times g$ for 10 min, and the supernatants obtained from this centrifugation centrifuged for another 20 min at $8300 \times g$. The resulting pellets containing hippocampus nerve endings (P2 fraction) were further purified following a method previously described (Rodríguez and Sitges, 1996).

The composition of the oxygenated standard Krebs Ringer HEPES (KRH) was: (in mM) 127 NaCl, 1.2 KH_2PO_4 , 3.37 KCl, 1 CaCl_2 , 1.18 MgSO_4 , 20 HEPES- Na^+ and 5.6 dextrose, pH 7.4. In some experiments a Ca^{2+} -free-KRH, in which CaCl_2 was omitted and EGTA ($100 \mu\text{M}$) was added, and a Na^+ -free-KRH, in which n-methyl-glucamine chloride substituted NaCl were used. Where indicated the KRH or the Ca^{2+} -free-KRH also contained tetrodotoxin (TTX), carbamazepine, phenytoin, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate, vinpocetine or TBOA at the concentrations indicated in the figures. Hippocampus nerve endings under the above conditions were depolarized with 4-AP.

$[^3\text{H}]\text{Glu}$ release experiments

The method used to load the hippocampus nerve endings with a labelled neurotransmitter and to study its subsequent release was described previously (Sitges and Reyes, 1995; Sitges and Galindo, 2005). Briefly, about 1.6 mg of purified nerve endings suspended in KRH ($200 \mu\text{g/ml}$) were incubated with $[^3\text{H}]\text{Glu}$ ($1 \mu\text{Ci/mg protein}$) at 37°C for 25 min. Aliquots (1 ml) of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ preloaded nerve endings were then transferred to Millipore filters lying on multi-perforated chambers. After washing the radioactivity not incorporated into the preparation by a rapid superfusion with KRH, the flow rate was adjusted to 0.5 ml/min and perfusion fractions were collected at 1 min intervals for several minutes before and after 4-AP under each experimental condition. The radioactivity released in each collected fraction and that remaining in the filters (holding the nerve endings) at the end of the perfusion experiment was counted in a LS 6500 Beckman Scintillation counter. Results are expressed as the percentage released per min of total radioactivity. Total radioactivity equals the radioactivity released during the minutes of perfusion (after the washout period) plus that remaining in the filter at the end of the experiment.

Endogenous Glu and GABA release experiments

In some experiments aliquots of hippocampus synaptosomes ($600 \pm 32 \mu\text{g}$) suspended in $500 \mu\text{l}$ of KRH were pre-incubated at 37°C for 5 min before exposure to the experimental conditions to be studied. Namely, KRH without (control) or containing $25 \mu\text{M}$ vinpocetine or 1 mM TBOA (final concentrations), and then incubated at 37°C for 10 min. Incubation was stopped by centrifugation. The supernatants resulting from this centrifugation containing the released amino acid neurotransmitters (Glu and GABA) were transferred to clean vials and treated with an aliquot of a 0.1 M perchloric acid (PCA)/0.1 mM EDTA solution, and stored at -40°C for later analysis. In order to standardize neurotransmitter release per mg of synaptosomal protein, the resulting pellets were suspended in 2 ml of a NaOH 5 mM solution and used for protein determination. The samples containing the neurotransmitters released were injected into the HPLC system. Results are expressed as the concentration (in nmol) of Glu or GABA per mg of synaptosomal protein.

Determination of the external concentrations of endogenous Glu and GABA

The method used to detect endogenous neurotransmitters concentrations was previously described (Sitges et al., 2000, 2009). Briefly, $10 \mu\text{l}$ of sample suspended in 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA was mixed with $20 \mu\text{l}$ of o-phthalaldehyde reagent. After 120 s (strict time), a $10 \mu\text{l}$ aliquot of that mixture was injected into the HPLC system. An analytical column (Nova-pak C-18, 75 mm \times 3.9 mm internal diameter, particle size $10 \mu\text{m}$) set at 25°C and a fluorescence detector set at 360 nm excitation wavelength and 450 nm emission wave length were used. A lineal gradient elution program performed over 30 min was applied for amino acid elution: eluent A (30 mM sodium acetate buffer, pH 6.8) from 100% to 50%, and eluent B (methanol) from

0% to 50%, at a flow rate of 1 ml/min. The concentrations of Glu and Asp in the experimental samples were calculated with calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of the external standard mixture after o-phthalaldehyde reagent derivatization into the HPLC system.

Statistics

Analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's test were used for statistical evaluations. From $P < 0.05$ the differences between data were considered statistically significant. The statistical differences between [^3H]Glu release to 4-AP under control and under a specific experimental condition are indicated in each figure.

Results

4-AP-induced [^3H]Glu release depends on the presence of external Ca^{2+}

Fig. 1A shows that when aliquots of the nerve endings purified from the rat hippocampus were superfused with the KRH containing 1 mM Ca^{2+} , 4-AP at increasing concentrations (range from 30 to 1000 μM) progressively increased [^3H]Glu baseline release. When aliquots of the isolated nerve endings were superfused with Ca^{2+} -free-KRH the release of [^3H]Glu induced by 4-AP was markedly reduced (Fig. 1B). The bottom graphs of Fig. 1 compare the net responses to 4-AP in the absence and presence of external Ca^{2+} . The net responses obtained with the increasing concentrations of 4-AP in the absence and presence of Ca^{2+} are shown in Fig. 1C. The same net responses in a semi-log representation are plotted in Fig. 1D.

The ion dependencies and drug effects on 4-AP-induced [^3H]Glu release were characterized using 4-AP at a 500 μM concentration.

Effect of 500 μM 4-AP on [^3H]Glu release in the absence of external Na^+ and in the absence of external Ca^{2+}

When the hippocampus synaptosomes were superfused with either, the Na^+ -free-KRH or the Ca^{2+} -free-KRH the increase in [^3H]Glu release induced by 500 μM 4-AP was markedly reduced. Representative experiments showing the increase in [^3H]Glu release induced by 4-AP in the absence and presence of external Na^+ and in the absence and presence of external Ca^{2+} are plotted in the left graphs of Fig. 2. Dotted lines are the average of the baselines obtained without 4-AP depolarization. Bars in the right side of Fig. 2 show the net responses to 4-AP in the absence and presence of external Na^+ or Ca^{2+} . To calculate the net responses the respective baselines were subtracted from the respective 4-AP-induced responses.

Sensitivity of 4-AP-induced [^3H]Glu release to TTX in the absence and presence of external Ca^{2+}

In synaptosomes superfused with KRH (that contains Ca^{2+}) the presence of the Na^+ channel blocker TTX, at a concentration of 1 μM , markedly reduced ($59 \pm 4\%$) the release of [^3H]Glu induced by 500 μM 4-AP. A representative experi-

ment of the effect of TTX under those conditions is shown in Fig. 3A. Fig. 3B shows that the net response to 4-AP for 3 min in the control synaptosomes ($3.6 \pm 0.3\%$ of the total radioactivity) was reduced to $1.44 \pm 0.04\%$ in the presence of TTX. Interestingly, in synaptosomes superfused with Ca^{2+} -free KRH, the presence of the Na^+ channel blocker TTX failed in modifying the release of [^3H]Glu induced by 500 μM 4-AP. Fig. 3C shows a representative experiment of the release of [^3H]Glu induced by 4-AP in nerve endings superfused with Ca^{2+} -free KRH in the absence and presence of TTX. Fig. 3D shows that the net response to 4-AP for 3 min under external Ca^{2+} free conditions is similar in the control synaptosomes and in the synaptosomes exposed to TTX.

Effect of some second generation AEDs on [^3H]Glu release induced by 4-AP

Lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate belong to the group of AEDs of the second generation. The effect of these AEDs on [^3H]Glu release induced by 500 μM 4-AP was first tested at a concentration of 250 μM . A representative experiment of the inhibition caused by 250 μM lamotrigine on [^3H]Glu release to 4-AP is shown in Fig. 4A. The bars in Fig. 4B show that the net release of [^3H]Glu induced by 4-AP for 3 min ($3.35 \pm 0.36\%$ of total radioactivity) was reduced by lamotrigine in $40 \pm 5\%$. A similar inhibition of the increase in [^3H]Glu release to 500 μM 4-AP was observed in the presence of 250 μM oxcarbazepine. A representative experiment of the inhibition caused by this AED is in Fig. 4C. Bars in Fig. 4D show that the net release of [^3H]Glu induced by 4-AP ($3.62 \pm 0.29\%$ of total radioactivity) was reduced in $38 \pm 3\%$ by oxcarbazepine. Fig. 4E and F shows that at the concentration of 250 μM , the antiepileptic topiramate was unable to reduce the release of [^3H]Glu evoked by 500 μM 4-AP.

[^3H]Glu release induced by 4-AP is highly sensitive to vinpocetine

At a concentration ten times lower than the above AEDs, vinpocetine abolished the release of the excitatory amino acid neurotransmitter induced by 500 μM 4-AP. A representative experiment showing the effect of 25 μM vinpocetine on [^3H]Glu release to 4-AP is shown in Fig. 5A. Bars in Fig. 5B show that the net release of [^3H]Glu induced by 4-AP for 3 min ($3.21 \pm 0.56\%$ of total radioactivity) was completely lost in the presence of 25 μM vinpocetine.

In contrast to TTX that in the absence of external Ca^{2+} was incapable to inhibit the fraction of Glu release induced by 4-AP, vinpocetine totally inhibited Glu release to 4-AP in the absence of external Ca^{2+} . A representative experiment of the effect of 25 μM vinpocetine on [^3H]Glu release to 4-AP in the absence of external Ca^{2+} is shown in Fig. 5C, and the net Glu responses to 4-AP in the absence of external Ca^{2+} in the absence and presence of vinpocetine are plotted in the bars in Fig. 5D.

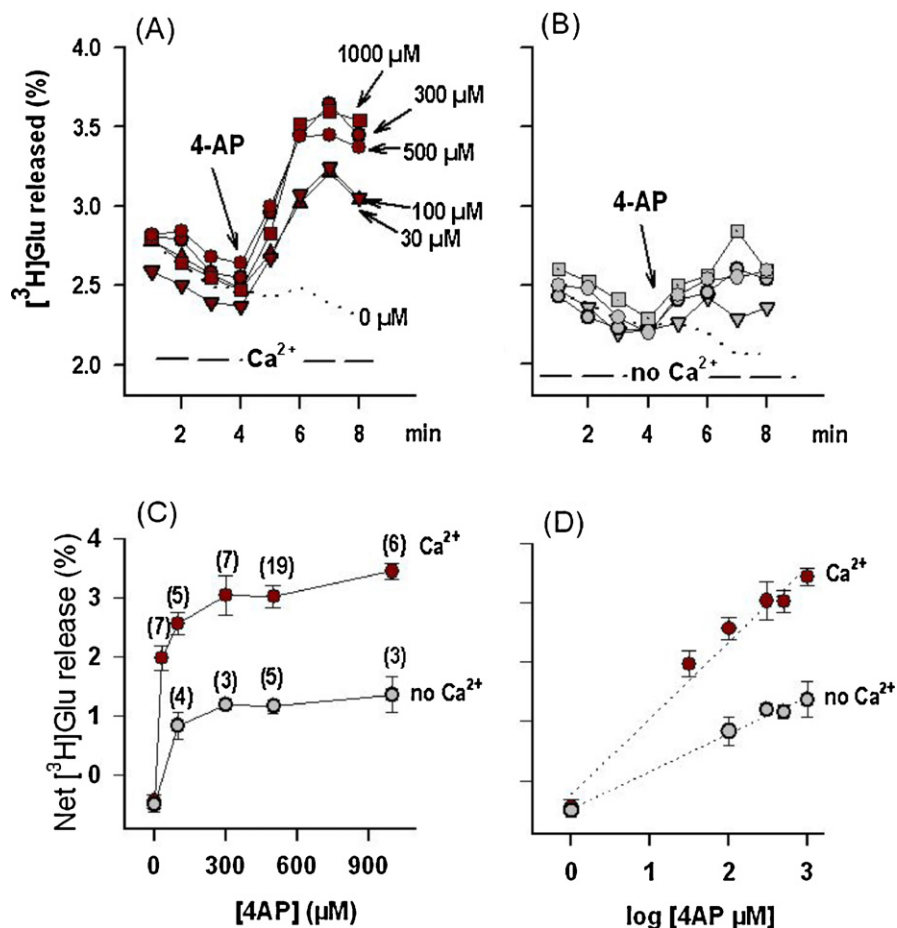


Figure 1 Effect of 4-AP at increasing concentrations on $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in hippocampus isolated nerve endings in the presence and absence of external Ca^{2+} . Purified hippocampus nerve endings pre-loaded with $[^3\text{H}]\text{Glu}$ were superfused with KRH (A) or Ca^{2+} -free-KRH (B). Where indicated (arrow) the above mentioned perfusion media also contained 4-AP at the indicated concentrations. The dotted line in figures (A) and (B) shows the kinetics of baseline release in the absence of 4-AP. (C) Net response to 4-AP in the absence (gray circles) and in the presence (red circles) of Ca^{2+} in the perfusion buffer. Net response refers to the $[^3\text{H}]\text{Glu}$ released by 4-AP for 3 min (min 6–8 in the upper graphs) minus the respective baseline release, estimated from the extrapolation of the respective baseline points before 4-AP on the basis of the respective control baseline kinetics (dotted line). (D) Semi-log representation of the net responses to 4-AP. Results in C and D are the mean \pm SEM of the number of experiments in independent preparations shown in parenthesis above each data point. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Dose response effects of vinpocetine and some first and second generation AEDs on 4-AP-induced $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in rat hippocampus nerve endings

The effect of vinpocetine on the increase in $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by $500\ \mu\text{M}$ of the convulsing agent 4-AP also was tested at two lower concentrations, namely 2.5 and $7.5\ \mu\text{M}$. Also the effects of the AEDs: lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate at a lower ($75\ \mu\text{M}$) and at two higher concentrations (750 and $1500\ \mu\text{M}$) than the concentration first tested ($250\ \mu\text{M}$) were investigated. Since carbamazepine and phenytoin are two of the most conventional AEDs of the “first generation”, their effects on $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to $500\ \mu\text{M}$ 4-AP at increasing concentrations were investigated too. The effect of carbamazepine was tested in the range from 75 to $1500\ \mu\text{M}$, and the effect of phenytoin from 75 to $750\ \mu\text{M}$. We did not test the effect of $1500\ \mu\text{M}$ phenytoin because at that high concentration the drug starts to

precipitate in the perfusion buffer and data are not reliable.

The bars in Fig. 6 show the Glu response to 4-AP in the presence of the above drugs at the various concentrations tested expressed in percentage of control (*i.e.* taking the respective Glu response to $500\ \mu\text{M}$ 4-AP in the absence of drug as the 100%). Fig. 6A, B, D and E shows the decrease in Glu release to 4-AP exerted by the AEDs, lamotrigine, oxcarbazepine, carbamazepine and phenytoin, respectively. In Fig. 6, the failure of topiramate to decrease the Glu response to 4-AP in a statistically significant manner in the range from 75 to $1500\ \mu\text{M}$ is noticeable (Fig. 6C), as is the higher potency and efficacy of vinpocetine in comparison with the other AEDs. For instance, while $25\ \mu\text{M}$ vinpocetine abolished $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP (Fig. 6F), lamotrigine, oxcarbazepine, carbamazepine and phenytoin, even at the highest concentration tested only inhibited Glu release induced by 4-AP between 50 and 60%.

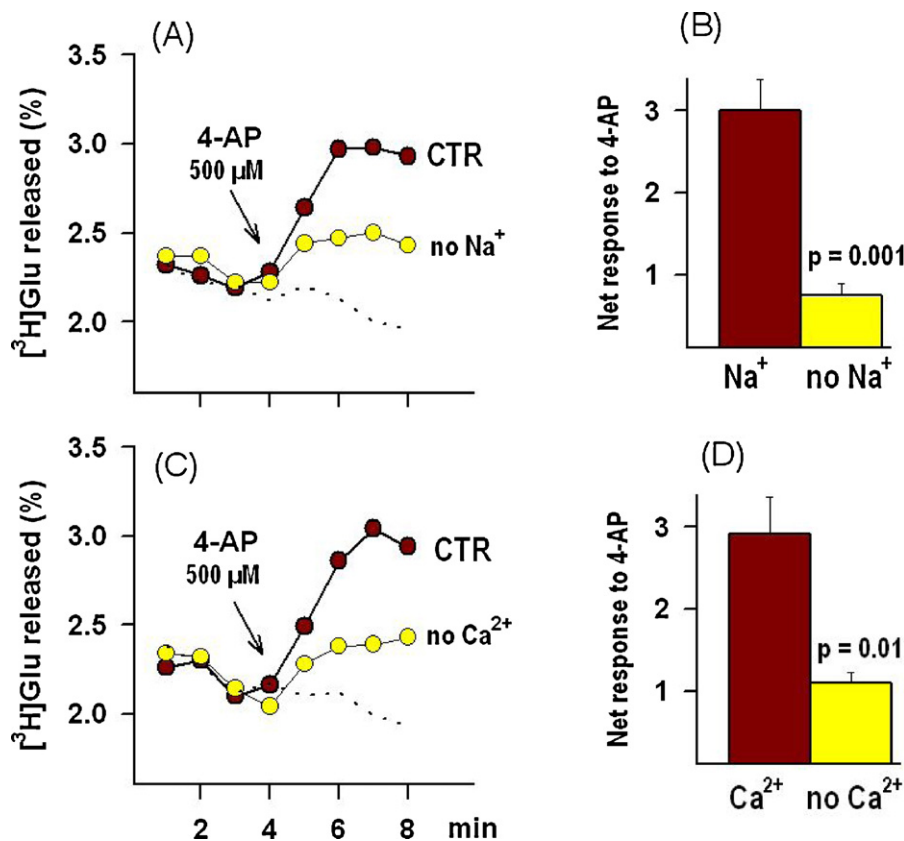


Figure 2 [³H]Glu release to 4-AP in the absence of external Na⁺ or Ca²⁺. [³H]Glu pre-loaded hippocampus isolated nerve endings were superfused with: KRH (red circles in A and C), Na⁺-free-KRH (yellow circles in A) or Ca²⁺-free-KRH (yellow circles in C). Where indicated (arrow) the above mentioned perfusion media also contained 4-AP (500 μM final). The dotted lines in this and the following figures indicate the baseline release in the absence of 4-AP. Bars: net responses to 4-AP in synaptosomes superfused with: KRH (red bars in B and D), Na⁺-free-KRH (yellow bar in B) or Ca²⁺-free-KRH (yellow bar in D). The statistical difference between [³H]Glu release to 4-AP in the absence and presence of Na⁺ or Ca²⁺ is indicated above each yellow bar. Results are the mean ± SEM values of 5 (B) or 4 (D) experiments in independent preparations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

The TTX insensitive fraction of 4-AP-induced [³H]Glu release is inhibited by TBOA.

The TTX insensitive fraction of [³H]Glu release induced by 500 μM 4-AP selectively released in the absence of external Ca²⁺ was markedly inhibited by the non transportable blocker of the excitatory amino acid transporters (EAATs), TBOA. A representative experiment of the release of [³H]Glu induced by 4-AP in nerve endings superfused with Ca²⁺-free KRH in the absence and presence of 1 mM of TBOA is shown in Fig. 7A, and the net response to 4-AP in the control and TBOA treated synaptosomes in Fig. 7B.

Effects of TBOA and vinpocetine on the external accumulation of Glu and GABA in hippocampus synaptosomes under non depolarized conditions

The continuous superfusion technique used in the present study to follow the preloaded radioactive Glu is very sensitive and allows the study of drug effects on neurotransmitter release under conditions in which neurotransmitter uptake is eliminated. However, for unmasking changes in the external concentration of Glu related with the blockade of the

Glu transporter, the concentration of endogenous Glu in the external medium of hippocampus synaptosomes suspended in KRH was measured. The concentration of the inhibitory amino acid neurotransmitter GABA was measured too.

The concentration of endogenous Glu in the external medium of control synaptosomes, where Glu reuptake is not prevented, was 3.3 ± 0.5 nmol/mg of synaptosomal protein. This concentration dramatically increased to 14 ± 0.3 nmol/mg of synaptosomal protein in the synaptosomes suspended in parallel for the same time period in the presence of TBOA ($p=0.000001$ between control and TBOA treated synaptosomes). In the synaptosomes exposed in parallel to vinpocetine the concentration of Glu (3.2 ± 0.5 nmol/mg of synaptosomal protein), was very similar to control synaptosomes ($p=0.88$ between control and vinpocetine treated synaptosomes). The external concentration of GABA in control synaptosomes (0.5 ± 0.03 nmol/mg of synaptosomal protein) was unchanged either by the presence of TBOA ($p=0.21$) or vinpocetine ($p=0.54$) in the incubation medium. Results of the above experiments are the mean ± SEM values of four experiments in independent preparations.

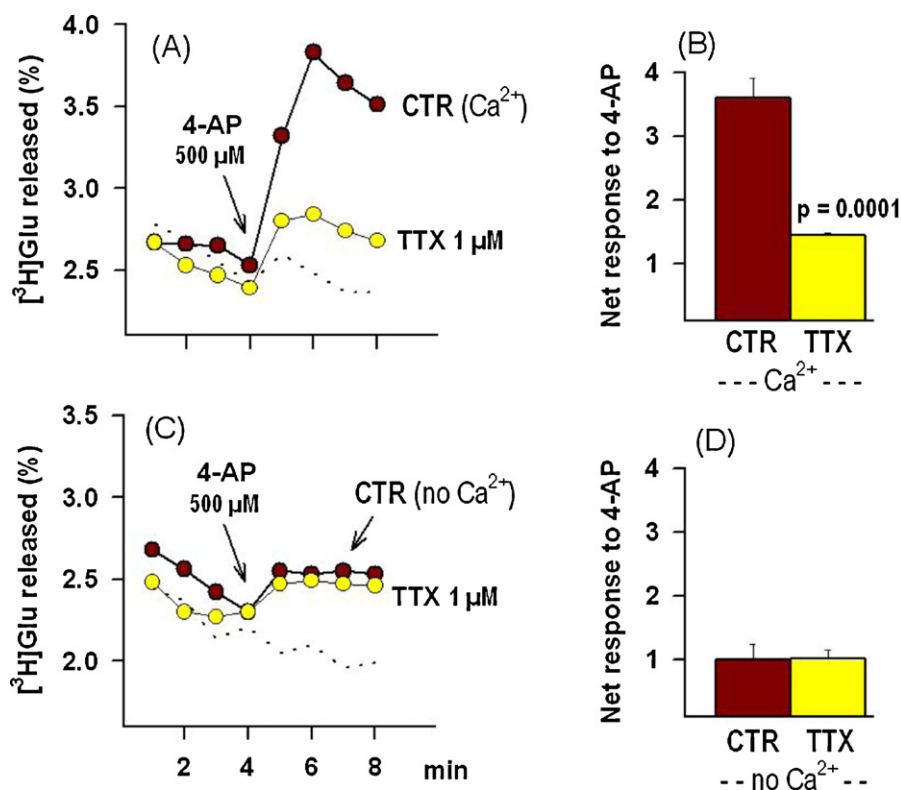


Figure 3 Effect of TTX on [^3H]Glu release induced by 4-AP in the absence and presence of external Ca^{2+} . Representative experiments of [^3H]Glu release in hippocampus synaptosomes superfused with: KRH (A) or Ca^{2+} -free KRH (C) in the absence (red circles) or in the presence of $1\ \mu\text{M}$ TTX (yellow circles). From the arrow in A and C those perfusion media also contained $500\ \mu\text{M}$ 4-AP. Bars are the net responses to 4-AP in synaptosomes superfused with KRH (B) or Ca^{2+} -free KRH (D) without (red bar) or containing $1\ \mu\text{M}$ TTX (yellow bar). The statistical difference between 4-AP-induced [^3H]Glu release in the absence and presence of TTX is indicated above the yellow bar in (B). Results are the mean \pm SEM values of 5 (B) or 3 (D) experiments in independent preparations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Discussion

Cerebral ion channels, and particularly pre-synaptic channels controlling neurotransmitter release, are among the most important targets of various AEDs. Therefore, for discriminating the effects of AEDs on cerebral pre-synaptic Na^+ and Ca^{2+} channels, for the last years we used depolarizing strategies, such as veratridine, that triggers the entrance of Na^+ by activation of cerebral pre-synaptic Na^+ channels even in the absence of external Ca^{2+} , or such as a high K^+ , that increases the internal concentration of Ca^{2+} by activation of cerebral pre-synaptic Ca^{2+} channels in the absence of external Na^+ (Sitges and Galindo, 2005; Sitges et al., 2007a,b). 4-AP depolarization of cerebral pre-synaptic terminals, however, is likely to more closely resemble the excitation of cerebral nerve endings that may occur during seizures. Because besides increasing Na^+ and Ca^{2+} channels permeability, 4-AP also blocks K^+ channels permeability (Galván and Sitges, 2004). Thus, the ionic dependences and the effects of several AEDs on Glu release induced by this convulsing agent in hippocampal nerve endings preloaded with the labelled transmitter were investigated here.

In line with our previous study in fura-2 and SBFI preloaded cerebral isolated nerve endings, showing that 4-AP depolarization simultaneously increases the concentration

of Ca^{2+} and Na^+ (Galván and Sitges, 2004), [^3H]Glu release induced by 4-AP depended on the presence of both ions in the external medium (Figs. 1 and 2). This double ionic dependence of [^3H]Glu release to 4-AP in the small sized ($<0.3\ \mu\text{m}$) cerebral isolated nerve endings, in which electrophysiological approaches are difficult, also contrasts with [^3H]Glu release induced by veratridine or high K^+ , which are independent of external Ca^{2+} or of external Na^+ , respectively (Sitges and Galindo, 2005; Sitges et al., 2007a,b). Moreover, as besides involving an increase in Na^+ and Ca^{2+} channels permeability [^3H]Glu release to 4-AP is also accompanied by a decrease in K^+ channels permeability, 4-AP indirectly stops the Na^+/K^+ ATPase (Galván and Sitges, 2004) and makes limitation of neuronal excitability more difficult. Thus Glu release in response to 4-AP may more closely mimic Glu release in the epileptic tissue.

The dependence on the entrance of Na^+ via TTX sensitive Na^+ channels of the rise in the internal concentration of Ca^{2+} induced by 4-AP has been largely demonstrated (Tibbs et al., 1989; Heemskerk et al., 1991; Galván and Sitges, 2004; Sitges et al., 2005). In line, the Ca^{2+} dependent fraction of [^3H]Glu release induced by $500\ \mu\text{M}$ 4-AP (Fig. 2B), also was markedly reduced in the absence of external Na^+ (Fig. 2A) and in the presence of TTX (Fig. 3A). The Ca^{2+} dependence of this TTX-sensitive fraction of Glu release induced by 4-

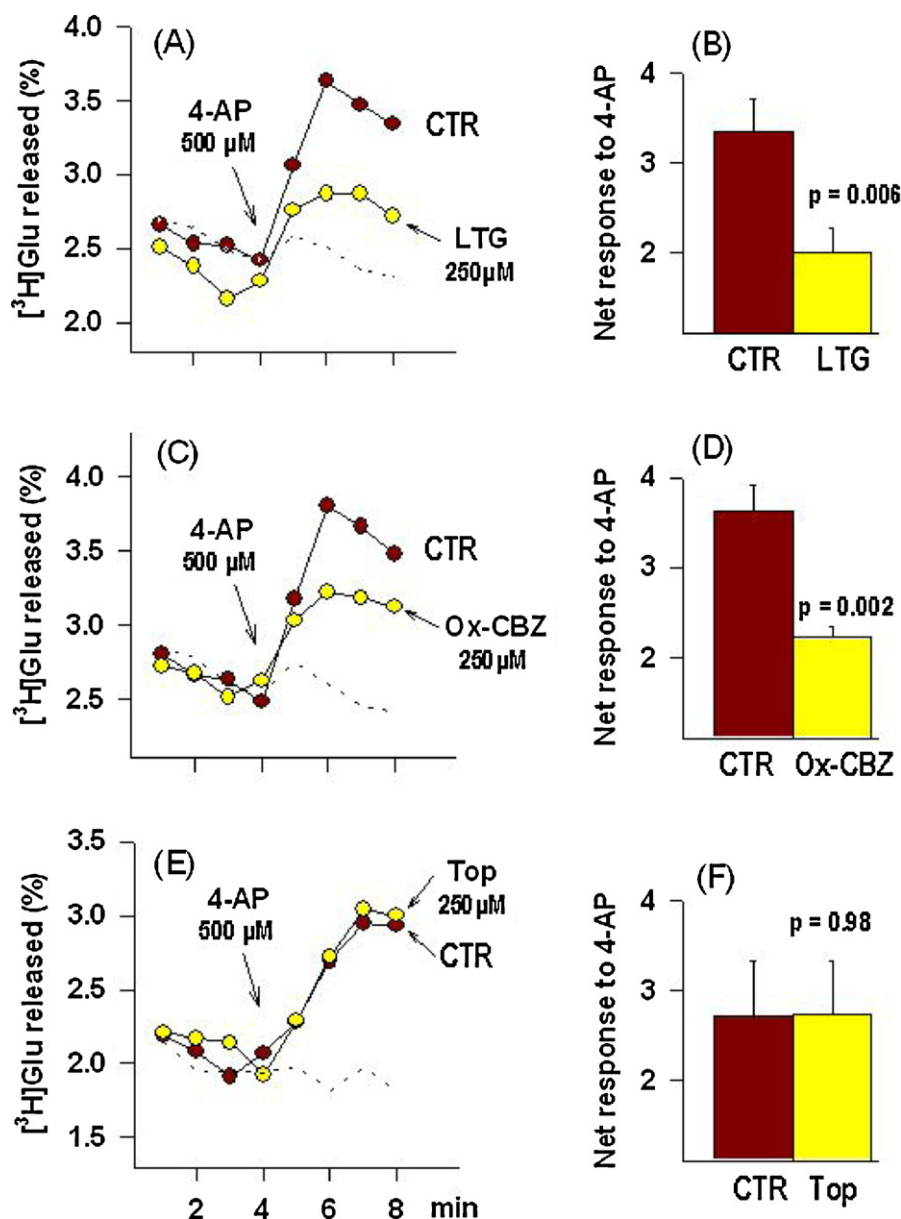


Figure 4 Effect of some second generation AEDs on [³H]Glu release evoked by 4-AP. Left graphs: hippocampus isolated nerve endings were superfused with KRH in the absence (red circles) or in the presence of 250 μM (yellow circles) of the indicated anticonvulsant; namely lamotrigine (LTG), oxcarbazepine (Ox-CBZ), or topiramate (Top). Where indicated (arrow) those perfusion media also contained 500 μM 4-AP. Right graphs: net responses to 4-AP in the absence (red bars) and in the presence of the indicated anticonvulsant at a 250 μM concentration (yellow bars). The statistical differences between 4-AP-induced [³H]Glu release in the absence and presence of the indicated anticonvulsant is above the yellow bar. Results are the mean ± SEM values of: 6 (for lamotrigine), 5 (for oxcarbazepine) or 3 (for topiramate) experiments in independent preparations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

AP suggests that this fraction is released from the vesicular pool by exocytosis. It is worthy to note that this release of Glu induced by 4-AP, that is markedly reduced in the absence of external Ca²⁺ or when Na⁺ channels are blocked by TTX, contrasts with veratridine and high K⁺ depolarization induced Glu release. Because veratridine increases Na⁺ and Glu release in a TTX sensitive manner via reversal of the neurotransmitter transporter independently of presynaptic Ca²⁺ channels, and high K⁺ increases Ca²⁺ and Glu exocytosis from the vesicular pool in a TTX insensitive manner inde-

pendently of presynaptic Na⁺ channels (Sitges and Galindo, 2005).

In a previous study we showed that in addition to the fraction of the increase in Na⁺ produced by 4-AP that was TTX-sensitive, 4-AP also induced a TTX-insensitive accumulation of Na⁺ that was accompanied by a decrease in the internal concentration of K⁺, presumably as a result of the inhibition of the Na/K-ATPase that restores internal K⁺ (Galván and Sitges, 2004). This TTX insensitive accumulation of Na⁺, that was independent of presynaptic Na⁺ or Ca²⁺

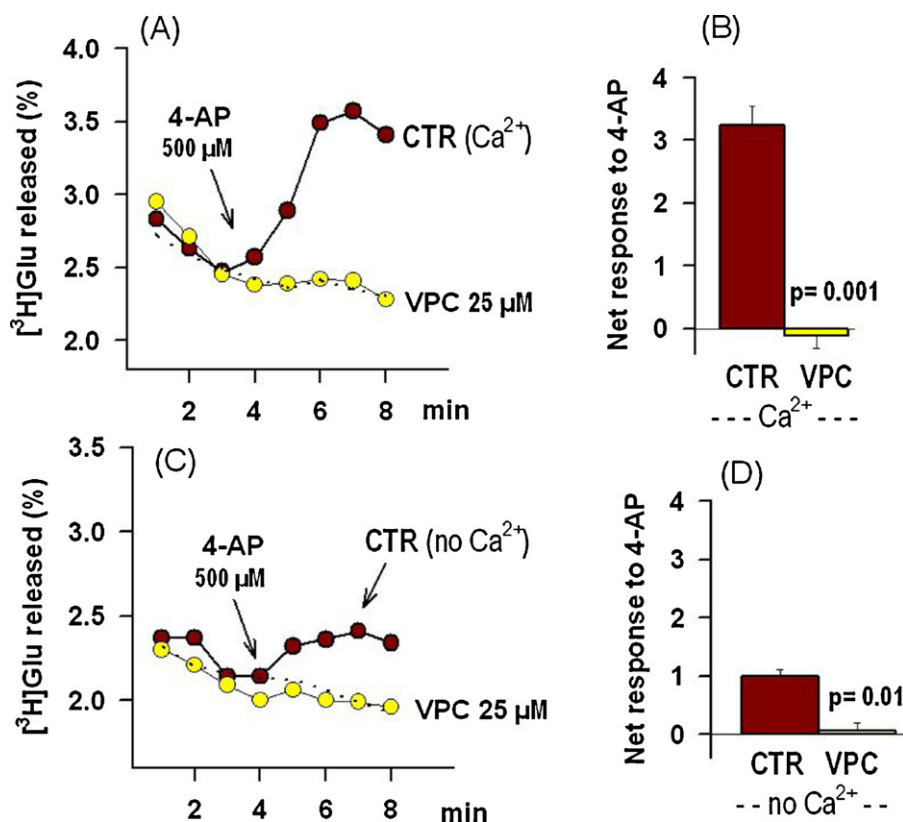


Figure 5 Effect of vinpocetine on the increase in $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by 4-AP in the absence and presence of external Ca^{2+} . Representative experiments of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in synaptosomes superfused with: KRH (A) or Ca^{2+} -free KRH (C) in the absence (red circles) or in the presence of 25 μM vinpocetine (yellow circles). From the arrow in A and C those perfusion media also contained 500 μM 4-AP. Bars are the net responses to 4-AP in synaptosomes superfused with KRH (B) or Ca^{2+} -free KRH (D) without (red bar) or containing 25 μM vinpocetine (yellow bar). The statistical difference between 4-AP-induced $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in the absence and presence of vinpocetine is indicated above the yellow bars in (B) and (D). Results are the mean \pm SEM values of four experiments in independent preparations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

channels activation, is likely to be underlying the release of the Glu fraction that is Ca^{2+} independent and TTX insensitive, that is likely to be released from the cytoplasm by reversal of the Glu transporter, as it is inhibited by the EAAT inhibitor TBOA.

Our findings that, similarly to 1 μM TTX, lamotrigine, oxcarbazepine, carbamazepine and phenytoin only inhibited $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 500 μM 4-AP between 50 and 60% at the highest dose tested indicates that the decrease in $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP exerted by the above AEDs is linked to the blockade of presynaptic Na^+ channels. In line, TTX and the above AEDs at those concentrations exerted a complete inhibition of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by the Na^+ channel opener veratridine in hippocampus synaptosomes (Sitges et al., 2007a). The failure of topiramate to inhibit 4-AP induced Glu release, contrasts with the partial inhibition exerted by the above AEDs, and does not indicate that a reduction in cerebral presynaptic Na^+ channels permeability is involved in its mechanism of action. The complete inhibition of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP exerted by vinpocetine, that also contrasts with the partial inhibition exerted by lamotrigine, oxcarbazepine, carbamazepine and phenytoin, indicates that vinpocetine, besides being able to inhibit the TTX sensitive an Ca^{2+} dependent fraction of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release

like the above AEDs, also inhibits the TTX insensitive and Ca^{2+} independent fraction of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release to 4-AP. In molluscan neurons 30 μM vinpocetine, and not other AEDs, was shown to increase the fast inactivating 4-AP-sensitive K^+ current (IA) (Bukanova et al., 2002). Therefore, one possible explanation of the higher efficacy of vinpocetine to inhibit $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by 4-AP in the hippocampus nerve endings is that in addition to its action on Na^+ and Ca^{2+} channels, vinpocetine overcome the blockade of the IA current produced by 4-AP. Taking into consideration that vinpocetine is a phosphodiesterase type 1 selective inhibitor, it can be speculated that by this means vinpocetine could be simultaneously modulating various pre-synaptic ionic channels. Likewise since an increase in cyclic nucleotides could be expected from a phosphodiesterase inhibitor like vinpocetine, also we cannot discard the possibility that the complete inhibition of Glu release to 4-AP could involve a certain effect of vinpocetine on the pump.

A possible inhibitory action of vinpocetine on the Glu transporter is discarded on the basis of the vinpocetine failure to change the concentration of endogenous Glu in the external medium of the suspended hippocampal synaptosomes, which was dramatically increased by the inhibition of the EAAT with TBOA.

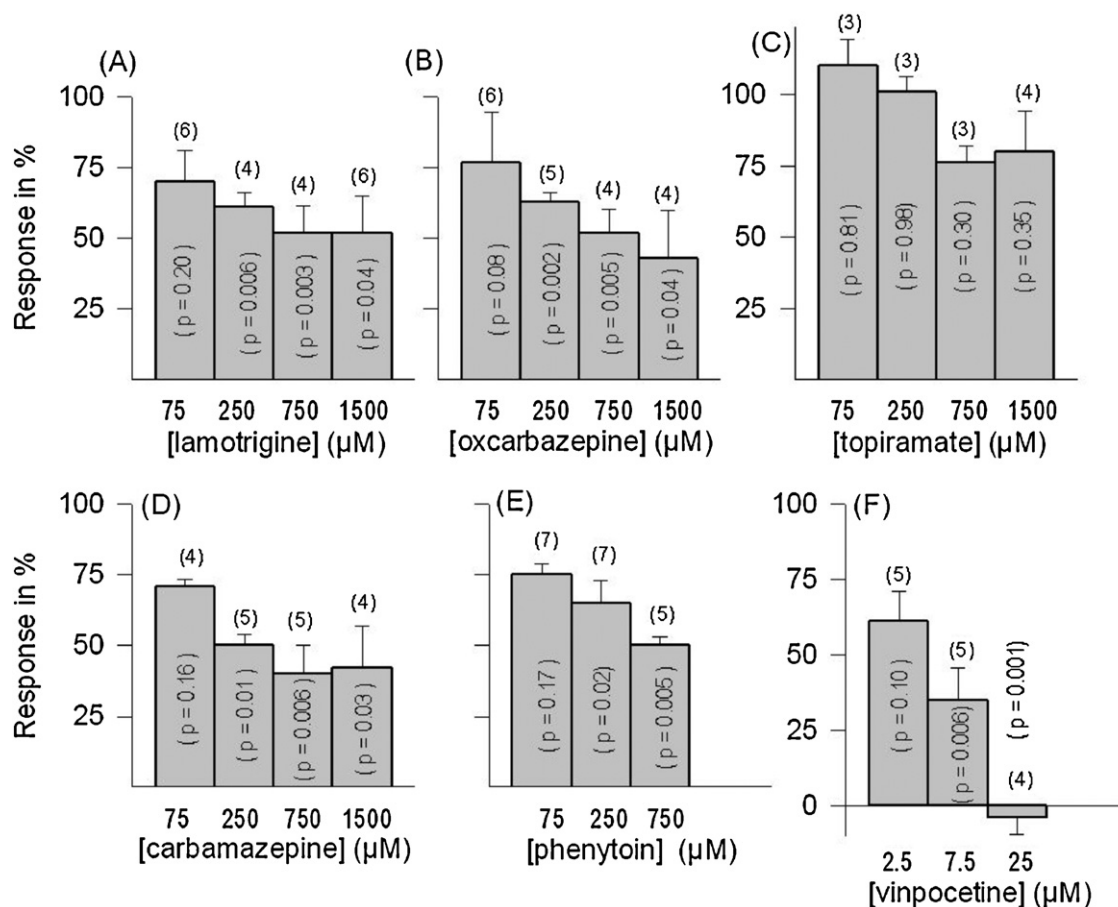


Figure 6 Effect of several anticonvulsants at increasing concentrations on $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by 4-AP in hippocampus synaptosomes superfused with KRH. "Response in %" refers to the net response in the presence of the indicated anticonvulsant at a specific concentration, expressed in percentage of control (*i.e.* taking the respective control net response to 4-AP obtained in parallel as the 100%). Net response refers to $[^3\text{H}]\text{Glu}$ released by 500 μM 4-AP for 3 min minus the respective baseline. Results are the mean \pm SEM values of the number of experiments in independent preparations indicated in parenthesis above each bar. The statistical significance for each drug concentration is inside each bar.

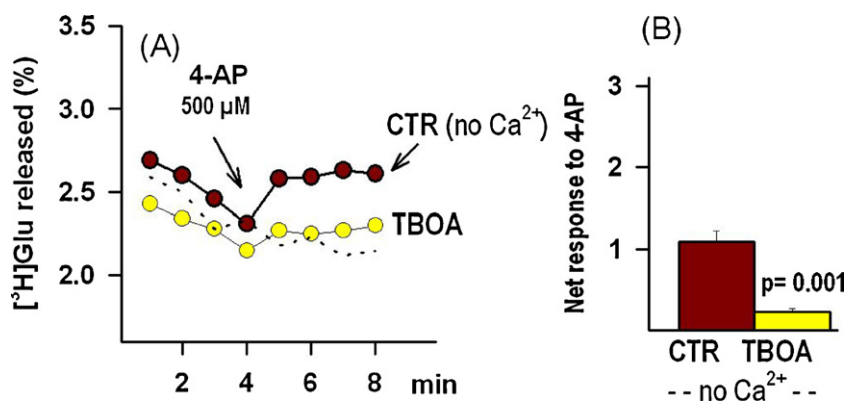


Figure 7 The EAAT inhibitor TBOA inhibits $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release induced by 4-AP in the absence of external Ca^{2+} . (A) Representative experiment of $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in hippocampus synaptosomes superfused with Ca^{2+} -free KRH in the absence (red circles) or in the presence of 1 mM TBOA (yellow circles). From the arrow the perfusion media also contained 500 μM 4-AP. (B) Net responses to 4-AP in the absence (red bar) and in the presence of TBOA (yellow bar). The statistical difference between 4-AP-induced $[^3\text{H}]\text{Glu}$ release in the absence and presence of TBOA is indicated above the yellow bar. Bar results are the mean \pm SEM values of three experiments in independent preparations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Vinpocetine inhibited [^3H]Glu release to 4-AP at a lower concentration than the other AEDs tested. Taking into account that the high doses of the AEDs required to control seizures are frequently accompanied by adverse secondary effects, and vinpocetine is well tolerated and without contraindications in humans (Hindmarch et al., 1991), the higher potency and efficacy of vinpocetine to inhibit Glu release under conditions in which all neurons are firing such as during epileptic seizures, may be advantageous.

Finally, since 4-AP particularly increases brain Glu release *in vivo* (Morales-Villagran and Tapia, 1996) and Glu is by far the most concentrated neurotransmitter in cerebral isolated nerve endings (Sitges et al., 2000), the reduced release of this excitatory neurotransmitter exerted by the anticonvulsants tested here may importantly contribute to their anticonvulsive actions. Particularly under conditions in which the permeability of the main channels involved in Glu release is compromised.

Acknowledgments

This work was financially supported by Psicofarma S.A. de C.V. and by project P-48695 from SEP-CONACYT. Berardo M. Sanchez-Tafolla scholarship was supported by grant 225708 from PAPIIT.

References

- Ambrosio, A.F., Silva, A.P., Araujo, I., Malva, J.O., Soares-da-Silva, P., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., 2001. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 191–201.
- Armand, V., Hoffmann, P., Vergnes, M., Heinemann, U., 1999. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in entorhinal cortex hippocampal slices of rats with a genetically determined absence epilepsy (GAERS). *Brain Res.* 841, 62–69.
- Bukanova, J., Solntseva, E., Skrebitsky, V., 2002. Selective suppression of the slow-inactivating potassium currents by nootropics in molluscan neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 5, 229–237.
- Galván, E., 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.
- Heemskerk, F.M., Schrama, L.H., Ghijsen, W.E., De Graan, P.N., Lopes da Silva, F.H., Gispen, W.H., 1991. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J. Neurochem.* 56, 1827–1835.
- Hindmarch, I., Fuchs, H.H., Erzigkeit, H., 1991. Efficacy and tolerance of vinpocetine in ambulant patients suffering from mild to moderate organic psychosyndromes. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 6, 31–43.
- Ives, A.E., Jefferys, J.G., 1990. Synchronization of epileptiform bursts induced by 4-aminopyridine in the *in vitro* hippocampal slice preparation. *Neurosci. Lett.* 112, 239–245.
- Morales-Villagran, A., Tapia, R., 1996. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem. Int.* 28, 35–40.
- Nekrassov, V., Sitges, M., 2003. 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.* 53, 245–254.
- Nekrassov, V., Sitges, M., 2006. Additive effects of antiepileptic drugs and pentylentetrazole on hearing. *Neurosci. Lett.* 406, 276–280.
- Nekrassov, V., 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.
- Perreault, P., Avoli, M., 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65, 771–785.
- Psarropoulou, C., Avoli, M., 1996. Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis. *Brain Res. Dev.* 94, 52–59.
- Rodríguez, R., Sitges, M., 1996. Nigericin-induced Na^+/H^+ and K^+/H^+ exchange in synaptosomes: Effect on [^3H]GABA release. *Neurochem. Res.* 21, 889–895.
- Sitges, M., Galindo, C., 2005. Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca^{2+} channel-mediated changes in internal Ca^{2+} and glutamate release in depolarised brain nerve terminals. *Neurochem. Int.* 46, 53–60.
- Sitges, M., Reyes, A., 1995. Effects of verapamil on the release of different neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.* 40, 613–621.
- Sitges, M., Nekrassov, V., Guarneros, A., 2000. Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 854, 48–56.
- Sitges, M., Galván, E., 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., 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., Nekrassov, V., 2007b. Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca^{2+} channel-mediated release of [^3H]glutamate with the Na^+ channel-mediated release. *Neuropharmacology* 53, 854–862.
- 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.
- Tapia, R., Sitges, M., 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291–299.
- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van Mieghem, F.J.E., McMahon, H.T., Nicholls, D.G., 1989. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release. *J. Neurochem.* 53, 1693–1699.
- Yamaguchi, S., Rogawski, M.A., 1992. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11, 9–16.
- Zilberter, Y.I., 2007. One reason for increased seizure susceptibility of hippocampus compared with neocortex. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* 1, 96–98.