



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
Laboratorio de Trastornos Audiomotores

Validación del Hámster GASH-Sal como Modelo de Epilepsia: Estudio Farmacológico y
Neuroetológico

Memoria presentada por Biviana Barrera Bailón para optar
al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directoras:

Dra. M^a Dolores E. López García

Dra. Consuelo Sancho Sánchez

Salamanca, 2013

Las abajo firmantes, Dras. Doña Dolores E. López García y Doña M^a Consuelo Sancho, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León/INCYL

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Validación del hámster GASH-Sal como modelo de epilepsia: estudio farmacológico y neuroetológico”, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Biviana Barrera Bailón, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 30 de Abril de 2013

Fdo:

Dra. M^a Dolores E. López García

Fdo:

Dra. Consuelo Sancho Sánchez

Para la planificación, realización y redacción de este trabajo de investigación hemos obtenido financiación de la Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyecto #SA023A12-2) y del Programa para la Promoción de la investigación bilateral USP/USAL (Proyecto#20 11-6; #2011.1.23386.1.3), sin cuya ayuda no hubiera sido posible.

Agradecimientos

En un inicio quiero agradecer a mis directoras, la Dra. M^a Dolores López y la Dra. Consuelo Sancho, por hacer posible la realización de esta tesis. Por su apoyo y confianza, y por permitirme ser parte de un grupo tan grande y diverso.

Hace seis años y medio llegué a Salamanca para emprender un camino muy largo impulsado por un deseo de conocer multitud de cosas y conocerme un poco más a mí misma. Este deseo fue impulsado en gran parte por mi familia, principalmente mis padres Jairo y Concepción, que me han apoyado desde el inicio y, si no fuera por ellos, todo lo que he conseguido no hubiera sido posible. Muchas gracias. La otra gran parte se la debo a la persona que me incentivo en el estudio en las neurociencias, el Dr. Hernán Hurtado Giraldo, mi primer gran tutor.

Mi paso por el INCyl ha sido largo y “ajetreado”. Donde he estado bajo la dirección inicial del Dr. Juan Lara Pradas, una de las personas que me recuerda que, aunque la investigación sea laboriosa, la ciencia y su estudio pueden llegar a ser muy divertidos y gratificantes. Le agradezco el recibirme desde un inicio en el laboratorio de Biología Celular, aunque al final no se pudiera concluir el proyecto que estaba realizando con él. Gracias a pertenecer a este laboratorio conocí a personas maravillosas con las que compartí y de las que aprendí, entre ellos están Elena, Azucena, Conchi, Jimeno, Gloria, Carmela, Miguelón y muchos otros, que me perdonarán que no los mencione. Posteriormente, pasé a ser parte del grupo de trastornos audiomotores (TAM), donde reitero el agradecimiento a mis directoras, y donde también conocí a Lymarie, Sonia, David, Nicole, Marisán, Richard, Luis y Orlando, entre otros compañeros. Tengo que mencionar también a las personas que me han acompañado por mi paso por el INCyL, como Carmen Rodríguez, Carmen, Begoña (con sus sabios consejos), y Yan (con sus grandes ocurrencias). Como siempre, mucha gente queda fuera, pero no en el olvido.

También quiero agradecer al Dr. Norberto García Cairasco por recibirme en su laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología experimental en Ribeirão Preto (BR), a José Antonio por toda su paciencia y todas las horas que dedico a enseñarme.

Quisiera agradecer a Dolores del Olmo y María Picazo que me recibieron por un periodo breve de tiempo en el Complejo Hospitalario de Albacete, donde aprendí a realizar las la extracciones de sangre. Sin su ayuda una gran parte de este trabajo hubiera sido imposible.

También deseo agradecer a Cesar Raposo, director de Servicio de Espectrofotometría de Masas, y a su equipo por siempre ser tan amables responder a todas las preguntas e inquietudes surgidas a partir de mi reciente relación (en muchos casos frustrante) con los fármacos y su química.

Quiero agradecer a la gente que me ha apoyado y me han dado energía para continuar como son Melissa, Aline, Cheryl, de nuevo a Lyma y a Azu. A Pablo, quien ha aprendido lo que es la paciencia al acompañarme estos tres últimos años, aguantado mis todas “neuras”, días de cansancio, tristezas y alegrías.

Y, finalmente, quiero agradecer a las decenas de animales que hicieron posible la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Abreviaturas	1
Listado de Figuras	5
Justificación	7
Introducción	11
<u>La Epilepsia</u>	13
<u>Modelos Animales de epilepsia</u>	15
<u>Tratamiento de la Epilepsia</u>	19
❖ Mecanismo de actuación de los Fármacos Antiepilépticos	19
❖ Fármacos antiepilépticos empleados en el estudio	22
➤ Fenobarbital	23
➤ Ácido Valproico	23
➤ Levetiracetam	24
➤ Lamotrigina	25
➤ Retigabina	25
<u>Estudios del Comportamiento Epiléptico</u>	26
❖ Semiología epiléptica	26
❖ Neuroetología	26
Hipótesis y objetivos	29
<u>Hipótesis</u>	31
<u>Objetivos</u>	31
❖ Principal	
❖ Secundarios	
Diseño experimental	33
Materiales y Métodos	39
<u>Animales de experimentación</u>	41
<u>Fármacos Antiepilépticos</u>	41
<u>Estímulo Acústico</u>	42
<u>Técnicas para el Estudio Farmacológico</u>	42
❖ Extracción y procesamiento de las muestras de sangre sanguíneas	42
❖ Extracción y procesamiento de tejido cerebral	43
❖ Niveles sanguíneos de FAE	44

❖ Determinación de la vida media de los FAE	45
❖ Determinación de la eficacia anticonvulsiva (DE ₅₀)	45
❖ Tratamiento crónico: estimación del efecto antiepiléptico	46
➤ Primera fase de administración crónica	46
➤ Segunda fase de administración crónica	46
<u>Estudio Neuroetológico</u>	47
❖ Adquisición de imágenes	47
❖ Evaluación de los Cambios comportamentales	47
❖ Caracterización neuroetológica de las crisis convulsivas en el hámster GASH:Sal	48
Resultados	49
<u>Estudio Farmacocinético en el hámster GASH:Sal con Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina.</u>	51
❖ Curva de absorción cinética de FAEs en el GASH:Sal	51
❖ Niveles sanguíneos y cerebrales de los FAEs en tratamiento crónico del GASH:Sal	52
<u>Caracterización neuroetológica de las crisis en el hámster GASH:Sal en estado basal</u>	52
<u>Modificación de la semiología de la crisis por administración aguda intraperitoneal con Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina en el hámster GASH:Sal.</u>	54
❖ Determinación de la ED ₅₀	54
<u>Modificación de la semiología de la crisis tras administración crónica por vía oral de Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina en el hámster GASH:Sal.</u>	65
Discusión	75
Conclusiones	87
Bibliografía	91

Anexos

<u>Anexo 1: Diagramas de la ILAE</u>	109
<u>Anexo 2: Índices de severidad, ataxia y sedación</u>	113
<u>Anexo 3: Diccionario comportamental</u>	117
<u>Anexo 4: Artículo 1</u>	121
❖ Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal) Enviado a Epilepsy and Behavior (aceptado con cambios menores)	
<u>Anexo 5: Artículo 2</u>	155
❖ Chronic administration of antiepileptic drugs into the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal): a pharmacological and neuroethological study (en preparación)	
<u>Anexo 6: Artículo 3</u>	181
❖ Effects of lamotrigine and retigabine on the audiogenic crises of the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal) (en preparación)	

Abreviaturas

	ESPAÑOL	INGLÉS
AED	Droga antiepiléptica	Antiepileptic Drug
AF	Caída Atônica	Atonic Fall
AI	Índice de Ataxia	Ataxia Index
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- -isoxazol-propiónico	
AS	Convulsiones audiógenas	Audiogenic seizure
ATF	Caída atáxica	Ataxic Fall
BE	Guiñar	Blinking Eyes
BRL	Giro sobre el eje izquierda	Barrel Rolling, Left
BRR	Giro sobre el eje derecha	Barrel Rolling, Right
CCA	Crisis convulsivas audiogénicas	
CCV1	Convulsiones clónicas miembros superiores	Forelegs Clonic Convulsions
CCV2	Convulsiones clónicas miembros posteriores	Hindlegs Clonic Convulsions
CCVg	Convulsiones clónicas generales	Generalized Clonic Convulsions
cSI	Categorize Severity Index	Índice de Severidad Categorizado
CVL1	Convulsiones clónicas miembro superior derecho	Right foreleg clonic convulsions
CVL2	Convulsiones clónicas miembro superior izquierdo	Left foreleg clonic convulsions
DBA	Ratón marrón claro y no agutí	Dilute Brown Non-Aguti mice
DMCM	Metil-6,7-dimetoxi-4-etil- β -carbolino- -3-carboxilato	
DYS	Disnea	Dyspnea
ED ₅₀	Dosis efectiva media	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE	Estado epiléptico	

	ESPAÑOL	INGLES
EEG	Electroencefalograma	
ER	Postura erecta	Erect Posture
EXC	Excreción de orina y heces	Excretion of Feces and Urine
FAE	Fármacos antiepilépticos	
FR	Postura de congelamiento	Freezing Posture
GABA	Ácido γ -amino butírico	
GABA _A R	Receptor GABA _A	
GASH:Sal	Hámster con convulsiones audiógenas de origen genético	Genetic Audiogenic Seizure Hamster
GEPR	Rata genéticamente propensa a epilepsia	Genetically epilepsy-prone rat
GL	Girar izquierda	Gyrating to Left
GN	Roer	Gnawing
GR	Girar derecha	Gyrating to Right
GRB	Limpieza	Grooming
GRH	Limpieza cabeza	Grooming of Head
GRHL	Limpieza cabeza izquierda	Grooming of Head, Left
GRN	Limpieza cuello	Grooming of Neck
GRR	Limpieza de cuerpo derecha	Grooming of Body, Right
HFL	Flexión ventral de la cabeza	Head Ventral Flexions
HP1	Flexión de los miembros posteriores	Forelimb Extensions
HP2	Flexión de los miembros posteriores	Hindlimb extensions
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	High Performance Liquid Chromatography
HVA	Canales con alto umbral de activación	High Voltage Activation Channels
ILAE	Liga internacional contra la epilepsia	International League Against Epilepsy
IM	Inmovilidad/Parada	Immobility
INaF	Corriente rápida de sodio	

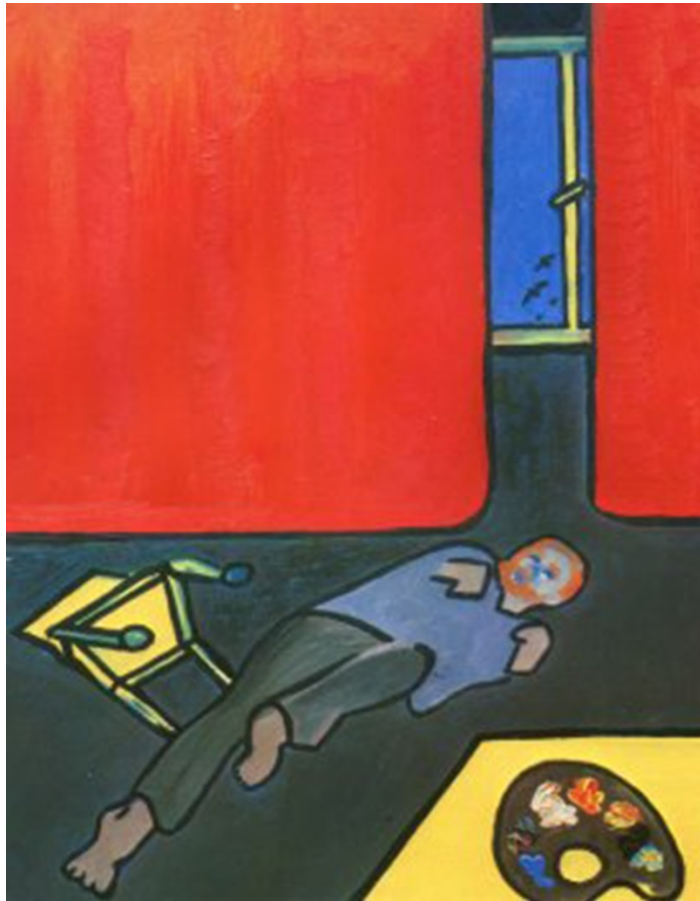
	ESPAÑOL	INGLES
INaP	Corriente persistente de sodio	
IS	Estándar interno	Internal Standart
JP	Saltar	Jumping
KA	Ácido Kaínico	
KCNQ	Canal de Potasio dependiente de voltaje	
LEV	Levetiracetam	
LI	Lamer	Licking
LIC	Lamer garras	Licking of Claws
LTG	Lamotrigina	
MS	Espectrometría de Masas	Mass spectrometry
MES	Choque eléctrico máximo	Maximal electroshock seizure
MET		Pentylentetrazol model
MT	Movimientos masticatorios	Masticatory Movements
NE	No efectivo	
NMDA	N-metil-D-aspartato	
NOD	Cabecear	Nodding
PB	Fenobarbital	
PBS	Tampón de fosfato salino	Phosphate buffer saline
PIM	Inmovilidad post- ictal	Postictal Immobility
PTZ	Pentilentetrazol	
RGB	Retigabina	
RU	Correr	Running
SEA	Servicio de Experimentación Animal	
S.E.M	Error estándar de la media	Standard error mean
SdI	Índice de sedación	Sedation Index
SI	Índice de severidad	Severity Index

	ESPAÑOL	INGLES
SN	Oler	Sniffing
STA	Sobresalto	Startle
STR	Enderezamiento	Straighten
SV2A	Vesicula sináptica 2A	
TCP	Taquipnea	Tachypnea
TCV	Convulsiones Tónico Clónicas	Tonic Clonic Convulsions
VPA	Ácido Valproico	
WA	Caminar	Walking
WAR	Rata Wistar Audiogénica	Wistar Audiogenic Rat
WDS	Agitarse como un perro mojado	Wet Dog Shaking

Listado de figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Esquema general de modelos de epilepsia y de crisis epilépticas utilizados.	15
Figura 2. Esquema general de los modelos para tipos específicos de epilepsia y crisis epilépticas según el tipo de crisis	16
Figura 3. Estructura del Fenobarbital	23
Figura 4. Estructura del Ácido Valproico	23
Figura 5. Estructura del Levetiracetam	24
Figura 6. Estructura de la Lamotrigina	25
Figura 7. Estructura de la Retigabina	25
Figura 8. Esquema del diseño experimental empleado	36
Figura 9. Flujo que ilustra los aspectos gráficos y estadísticos de los comportamientos observados.	48
Figura 10. Concentraciones plasmáticas de PB, VPA, LEV, LTG Y RGB.	51
Figura 11. Diagrama de flujo de las crisis audiógenas del GASH:Sal.	53
Figura 12. Duración de las diferentes fases de la crisis en los GASH:Sal sin tratamiento.	53
Figura 13. Porcentajes de animales que exhiben Carrera Salvaje y convulsiones tónico clónicas. Porcentaje de animales a los que se les anula la crisis.	55
Figura 14. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de PB	56
Figura 15. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de VPA.	57
Figura 16. Índices de severidad y de ataxia de hámsteres GASH:SAL tratados con Fenobarbital	58
Figura 17. Índices de severidad ataxia y sedación de hámsteres GASH:SAL tratados con Ác. Valproico y Levetiracetam	59
Figura 18. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Levetiracetam	61
Figura 19. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Lamotrigina	62

Figura 20.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Retigabina	63
Figura 21.	Índices de severidad ataxia y sedación de hámsteres GASH:SAL tratados con Lamotrigina y Retigabina	64
Figura 22.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal control	65
Figura 23.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con PB	66
Figura 24.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con LTG.	68
Figura 25.	Índices de severidad, ataxia y sedación de hámsteres GASH:SAL tratados con PB, VPA Y LEV.	69
Figura 26.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con VPA y LEV.	71
Figura 27.	Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con RGB.	72
Figura 28.	Índices de severidad, ataxia y sedación de hámsteres GASH tratados con LTG y RGB	73
Figura 29.	Curvas ponderales de los animales control y tratados con fármacos antiepilépticos.	74



(Anónimo, 1965)

Justificación

La epilepsia es una alteración del cerebro que generalmente se manifiesta en forma de convulsiones reiteradas, y que afecta, aproximadamente, al uno por ciento de la población mundial, por lo que representa un importante problema de salud pública. Desde la clasificación inicial del tipo de epilepsias por la ILAE (International League Against Epilepsy) en 1989, se ha generado un cambio de terminología y clasificación, ya que a través de los años se ha percibido que puede ser clasificada de manera flexible y multifuncional, dependiendo del enfoque al que se esté enfrentando (clínico, básico, epidemiológico, etc), y, atendiendo a la edad de inicio, etiología, tipo de crisis, anomalías en los electroencefalogramas, entre otros. Actualmente, no hay una clasificación biológica de las epilepsias, y los avances en el conocimiento sobre la epilepsia están enfocados a conocer los mecanismos biológicos, por lo que, a medida que se van comprendiendo, se ve la necesidad de generar una clasificación en base a ellos.

El estudio de las epilepsias ha sido dependiente del estudio de diversos modelos experimentales. Las consideraciones éticas no permiten a los neurocientíficos hacer uso de las modernas herramientas que la ciencia dispone hoy en día sobre cerebros humanos intactos. Por ello, mucho de lo que hoy se conoce sobre la epilepsia se debe a los estudios realizados en modelos animales sobre esta enfermedad.

El hámster GASH:Sal (Genetic Audiogenic Seizure Hamster), es un modelo epiléptico en proceso de validación, que desarrolla crisis tónico-clónicas generalizadas de origen genético en respuesta a un estímulo sonoro con una clínica similar a la de tipo Gran Mal en el humano. En nuestro modelo, al emplear un estímulo auditivo como desencadenante de las crisis, podemos reproducir los episodios ictales de forma muy estable e independiente de factores fisiológicos secundarios, como sucede, por ejemplo, en el modelo de epilepsias farmacológicas, lo que permitiría probar de forma más fiable la eficacia de diferentes drogas antiepilépticas. Al no haber modificado genéticamente al GASH:Sal, sino que su susceptibilidad ha surgido espontáneamente, por el desenmascaramiento de genes recesivos en los cruces endogámicos, nuestro

modelo es más fácilmente equiparable a los fenómenos epilépticos que surgen de novo en el humano.

Como parte de la validación del GASH:Sal, hemos realizado un estudio farmacológico y comportamental con fármacos antiepilépticos (FAE) de uso clínico, clásicos (ácido valproico y fenobarbital) y de nueva generación (levetiracetam, lamotrigina y retigabina).

El fin último es avanzar en la caracterización del hámster GASH:Sal y validarlo como modelo experimental de epilepsia. Con ello, se pondría a disposición de la comunidad científica un nuevo modelo de epilepsia que serviría para ensayar nuevos tratamientos farmacológicos, para diseños de terapia génica y para contribuir al estudio de los mecanismos biológicos de la epilepsia, que a pesar de toda la investigación generada en los últimos años siguen siendo bastante desconocidos.



(Pintura Precolombina)

Introducción

La Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad que afecta entre el 1 y el 3 % de la población mundial (Kaneko y cols., 2002; Pitkanen y Lukasiuk, 2009). Está definida por la Liga Internacional en Contra de la Epilepsia (siglas en inglés: ILAE) como un desorden del cerebro caracterizado por una predisposición continua a presentar crisis epilépticas, siendo éstas definidas como la ocurrencia de signos o síntomas transitorios debidos a una actividad neuronal anormal en el cerebro (Berg y cols., 2010a; Fisher y cols., 2005). Las crisis, cuyas características dependen de la región cerebral afectada, son la manifestación clínica de una descarga neuronal excesiva e hipersincrónica, que altera de forma súbita y transitoria el funcionamiento cerebral (Shorvon, 2009).

Los estudios realizados en este campo indican que, uno de los mecanismos implicados en el proceso epiléptico es un desbalance a nivel cerebral de neurotransmisores, principalmente entre GABA y glutamato (Fuentes-Santamaria y cols., 2007; Sgado y cols., 2011), Así tanto la disminución en la transmisión GABAérgica como el aumento en la transmisión glutamatérgica pueden desencadenar actividad epiléptica (Bradford, 1995; Obrenovitch y Urenjak, 1997). El funcionamiento anómalo de canales iónicos, de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ también puede participar en la génesis de convulsiones. Todo ello, posiblemente relacionado con modificaciones en la transcripción de genes y expresión de proteínas asociados a los mecanismos intrínsecos de la acción de los neurotransmisores (Kaneko y cols., 2002; Steinlein 2002; Gjerstad y Tauboll, 2003; Guerrini y cols., 2003; Gurnett y Hedera, 2007). El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los distintos tipos de epilepsias es limitado, y es de gran importancia identificar estos mecanismos, especialmente para localizar nuevas dianas que permitan desarrollar fármacos antiepilépticos más efectivos, ya que a pesar del relativo éxito de los nuevos tratamientos, todas las terapias de las que disponemos hoy en día son sintomáticas y no curan la enfermedad.

Actualmente sabemos que, aunque sólo en un pequeño porcentaje de las epilepsias humanas se ha identificado el componente genético, se considera que la

susceptibilidad genética estaría implicada en gran parte de las epilepsias, con un mayor riesgo en el caso de las epilepsias generalizadas que en las parciales (Ottman, 2005). Se considera que al menos once síndromes de epilepsia humana pueden ser causados por herencia monogénica (Berkovic y Scheffer, 1997; Nicita y cols., 2012).

La epilepsia es un desorden heterogéneo tanto en los aspectos clínicos como en los genéticos, ya que hay variaciones en los tipos de síndromes y manifestaciones, habiendo también diferencias etiológicas, tanto genéticas como metabólicas o estructurales, llegando en algunos casos a desconocerse la causa de la epileptogénesis (Anexo 1). (Le Van Quyen y cols., 2003; Berg y cols., 2010b; Schauwecker, 2011; Winden y cols., 2011).

Clínicamente, la epilepsia puede manifestarse de múltiples formas, dependiendo en parte del área cerebral afectada, lo que da lugar a una clasificación que atiende al compromiso focal (frontal, temporal, parietal, occipital) o generalizado. Alrededor de un 60% de las epilepsias son parciales o de origen focal y un 40% son generalizadas, mientras que otro alto porcentaje de casos (del 8 al 30%) pueden considerarse inclasificables (Cockerell y cols. 1995). Otras clasificaciones atienden a criterios como la edad, etiología, tipo de crisis, anormalidades en los electroencefalogramas, entre otros (Berg y cols., 2010b; Berg y Scheffer, 2011) (Anexo 1).

Existe un grupo de epilepsias, con aproximadamente un 4-7% de prevalencia entre los humanos (Panayiotopoulos 2005), denominadas epilepsias reflejas (ILAE, 2001), en las que las crisis son generadas por un estímulo inesperado, generalmente un ruido repentino, aunque también puede ser un estímulo somatosensorial o visual (Salas-Puig y cols., 2000; Fernández y cols., 2011; Striano y cols., 2012). En la mayoría de los casos, este tipo de epilepsia se presenta después de una lesión en uno de los hemisferios, aunque también puede ser observada en otros trastornos epilépticos (ej. Lennox-Gastaut, síndrome de Down, y en displasias corticales focales) (Chevrie y Aicardi, 1977; ILAE, 1989; Goldsmith y cols., 2000), y en otros casos con etiología desconocida, existiendo poca información acerca de las estructuras cerebrales relacionadas con este tipo de epilepsia (Fernández y cols., 2011; Striano y cols., 2012).

En este estudio, nos centramos en las crisis reflejas generadas por un estímulo sonoro, definidas como crisis convulsivas audiogénicas agudas (CCA), poco frecuentes en la especie humana, en las que la naturaleza del estímulo sonoro epileptógeno es variable (Salas-Puig y cols., 2000).

Modelos animales de Epilepsia

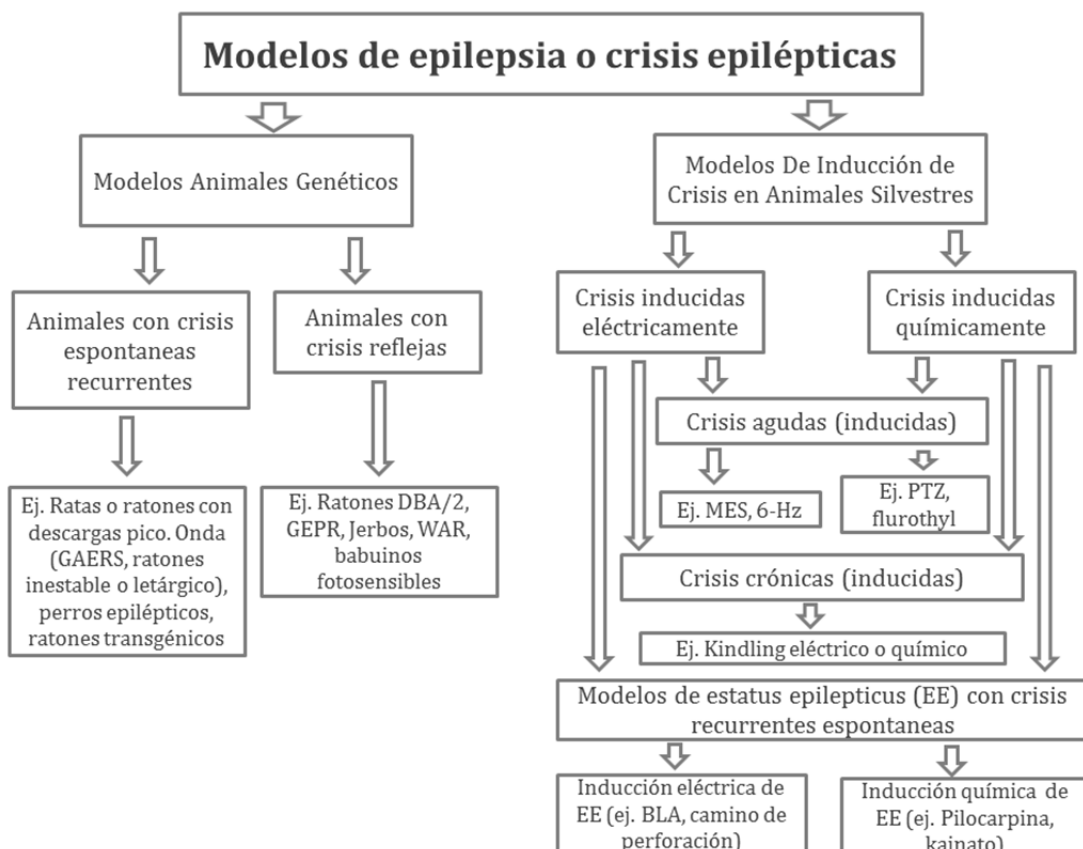


Figura 1. Esquema general de modelos de epilepsia y de crisis epilépticas utilizados según origen de la generación las crisis. Hay que señalar que hay numerosos modelos que se excluyeron de la figura. Modificado y traducido de Löscher (2011).

El uso de modelos animales de convulsiones y de epilepsia es esencial para entender los mecanismos básicos por los cuales se presenta la ictogénesis y la epiletogénesis (Fisher y cols., 2005). Estos modelos experimentales nos permiten reproducir manifestaciones clínicas de la epilepsia, ya sean de origen genético o metabólico/estructural, especialmente el fenómeno convulsivo, el cual es reflejo de una hiperexcitabilidad cortical. En la figura 1 se pueden apreciar los tipos de modelos

utilizados según como se desarrollen sus crisis, desarrolladas por una tendencia genética o inducida por factores externos.

Actualmente, hay diferentes modelos animales de crisis convulsivas y de epilepsia (figura 2), la mayoría en roedores, pero también encontramos moscas, peces y lombrices (Fuentes-Santamaría, y cols., 2005; Baraban 2007; Schauwecker 2011) y, gracias a ello, en la última década ha habido un crecimiento exponencial en el conocimiento asociado a la manifestación y susceptibilidad a la epilepsia, aunque los genes y modificaciones específicas relacionadas con la epileptogénesis son todavía desconocidos (Gjerstad y Tauboll 2003; Guerrini y cols., 2003; Le Van Quyen y cols., 2003; Mulley y cols., 2005; Klassen y cols., 2011).

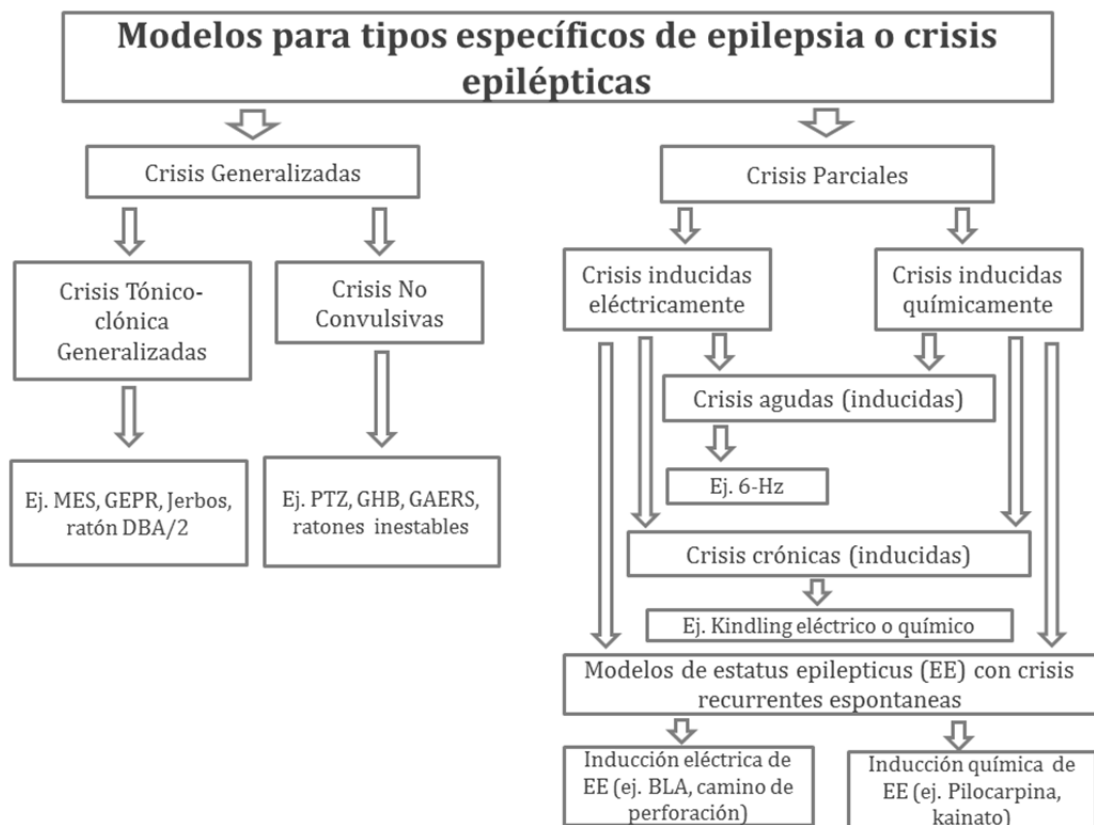


Figura 2. Esquema general de los modelos para tipos específicos de epilepsia y crisis epilépticas según el tipo de crisis. De la figura se excluyeron numerosos modelos. Tomado y traducido de Löscher (2011).

Casi todos los animales usados en la investigación sobre la epilepsia son modelos de convulsiones más que de epilepsia, ya que para poder hablar de modelos de epilepsia tenemos que asegurar que las crisis sean recurrentes.

Además, del estudio de los mecanismos etiopatogénicos involucrados en la epilepsia, los modelos animales son esenciales para el diseño y estudio de fármacos antiepilépticos (Löscher, 2011). Dos modelos animales clásicos, el de convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ) (modelo de crisis de ausencia), y el del choque eléctrico máximo (MES por sus siglas en inglés; modelo de crisis generalizadas tónico-clónicas), han permitido la investigación y el desarrollo de gran parte de los FAE existentes (Meldrum, 2002; Sarkisian, 2001; White, 2003).

Antes de que un animal pueda ser considerado modelo de una condición humana particular de la epilepsia, se deben satisfacer la mayor parte de los seis criterios generales siguientes (Rubio, 2012):

- ❖ El modelo debe exhibir patrones electrofisiológicos similares a los observados en humanos, ya que el patrón de la actividad de EEG constituye un sello de crisis y de epilepsia.
- ❖ Las etiologías deberían ser similares. Por tanto, las condiciones humanas que derivan de una predisposición genética subyacente, de una lesión, de un desorden neuronal en la migración, etc., deben estar incluidas en el modelo.
- ❖ Si la condición humana está caracterizada por una edad de inicio, el modelo animal propuesto debe escalararse o reflejar una edad similar al presentar las crisis
- ❖ Si la condición humana está caracterizada por cambios patológicos específicos, el modelo animal debe exhibir cambios comparables.
- ❖ Mientras que no existan tratamientos farmacológicos válidos desarrollados para cada condición humana, la condición que se modela deberá responder a los fármacos antiepilépticos utilizados en la clínica.
- ❖ Las manifestaciones del comportamiento inducidas por las crisis así como las alteraciones del comportamiento a largo plazo exhibidas por el animal, deberían reflejar las mismas que las observadas en seres humanos.

No todos los modelos reflejan fielmente estos criterios, aun así cada modelo aporta una información parcial, que en conjunto permite el avance en el conocimiento de esta enfermedad.

El modelo experimental de crisis generalizada tónico-clónica puede ser inducido por administración sistémica de convulsivantes químicos (Klitgaard y cols., 2002; Löscher y Stephens, 1988), por aplicación de electrochoques (Klitgaard y cols., 1998; Löscher y cols., 1984; Löscher y Vetter, 1985; Löscher y Hönack, 1993), provocando alteraciones metabólicas (Shearer y Riviello, 2011), por estímulos sonoros (Ross y Coleman, 2000) o puede obtenerse en animales capaces de desarrollar crisis de forma espontánea (Anlezark y cols., 1976; Dailey y cols., 1995; Frankel y cols., 1995; Dodge y cols., 2000; Donato Di Paola y cols., 2007; Frankel, 2009).

Las crisis audiógenas constituyen uno de los modelos experimentales para el estudio e identificación de los mecanismos que subyacen en la epilepsia (Striano y cols., 2012). Las CCA se definen como crisis generalizadas que requieren una activación de la vía auditiva en el tronco cerebral. El inicio de la crisis se ubica principalmente en el colículo inferior, y aun así en modelos de epilepsia por reclutamiento (kindling) se observa la asociación de estructuras subcorticales y del prosencéfalo (Ross y Coleman 2000; Galvis-Alonso y cols., 2004).

El modelo animal para este estudio es una línea desarrollada en Salamanca a partir de una línea originaria de la Universidad de Valladolid. Esta línea, denominada GPG/Vall, sufría una epilepsia de origen troncoencefálico (Aparicio 1982; Soria y cols., 1987; Gil-Verona y cols., 1991) de transmisión hereditaria, cuyas CCA generalizadas tónico-clónicas eran desencadenadas por estímulos acústicos de 1-20 kHz de frecuencia y 60-80 dB de intensidad (Soria y cols., 1987). A partir de esta línea original, en el bioterio de la Universidad de Salamanca, se ha desarrollado una línea de hámsteres que presentan una epilepsia audiógena de origen genético, hámsteres GASH: Sal (Genetic audiogenic seizure hámster), similar a la de tipo Gran Mal que aparece en la especie humana y que presenta un patrón de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena (Muñoz de la Pascua y López, 2005). Al igual que en otros modelos animales de CCA (Ross y Coleman, 2000), las

convulsiones se producen como consecuencia de un estímulo auditivo intenso, a partir de los 18 días de edad, momento en el que se completa la maduración del sistema auditivo. La susceptibilidad alcanza su grado máximo entre el primer y cuarto mes, para posteriormente desaparecer gradualmente.

Durante los últimos años, hemos caracterizado la semiología de las crisis, el patrón de transmisión (Muñoz de la Pascua y López 2005), las características neuroquímicas y neuroanatómicas de estos animales (Fuentes-Santamaría y cols., 2005; Fuentes-Santamaría y cols., 2007, 2008; Prieto-Martin y cols., 2012) y hemos confirmado por electroencefalografía que la naturaleza de las crisis convulsivas es típicamente epileptiforme (Carballosa- González, 2008; Carballosa- González y cols., 2013).

Tratamiento de la Epilepsia

La epilepsia es conocida como enfermedad desde épocas remotas, pero hasta el siglo XIX, las convulsiones se trataban con pócimas y otros remedios basados en falsas creencias e ideas sobre su origen. En el siglo XIX, se empieza a tratar la epilepsia con fármacos sedantes como el bromuro de potasio, que resultaban eficaces pero con graves efectos secundarios (Gross 1992; Sidiropoulou y cols., 2010). A principios del siglo XX, en el tratado “Epilepsy and its treatment”, se mencionan fármacos para el tratamiento, como opio, codeína, nitroglicerina, sales de zinc o cloroformo (Medina Malo, 2004; Sidiropoulou y cols., 2010). En 1912, Hauptmann, sintetizó el fenobarbital, que constituyó el primer barbitúrico utilizado para el tratamiento de la epilepsia, dando paso a la primera generación de fármacos antiepilépticos (FAE) propiamente dichos.

❖ Mecanismo de actuación de los Fármacos Antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos procuran reducir la frecuencia de las crisis epilépticas, y si es posible anularlas totalmente (Wilby, 2005), y pertenecen a grupos químicos heterogéneos, con muy diversos mecanismos de acción y espectros terapéuticos. Se pueden agrupar como FAE clásicos, que incluyen benzodiazepinas, carbamacepina, fenitoína, fenobarbital y ácido valproico (Gross, 1992; Medina Malo, 2004), y FAE de nueva generación, aparecidos a partir de la década de los 90 y agrupados como

FAE de segunda y tercera generación. Los fármacos de “nueva generación” (felbamato, gabapentina lamotrigina, levetiracetam, oxcarbacepina, retigabina, topiramato, vigabatrina o zonisamida) utilizados por el 16 % de los pacientes, son prescritos generalmente en combinación con otros FAE y son ampliamente utilizados en epilepsias refractarias (Fisher y cols., 2000)

Los últimos FAE aparecidos ofrecen algunas ventajas, como ser mejor tolerados, una menor interacción farmacológica y un mayor espectro terapéutico, pero todavía no hay evidencias de una mayor eficacia (LaRoche y Helmers, 2011; Schmidt, 2011). Y, a pesar del nuevo arsenal farmacológico, alrededor de un 15-20% de los pacientes presentan epilepsia refractaria (Szupera, 2011), un 68% se queja de muchos efectos adversos relacionados con el tratamiento, y un 28% tiene que recurrir a la politerapia, lo que muestra la importancia de continuar en la búsqueda de mejores FAE (LaRoche y Helmers, 2011).

Los FAE reducen la excitabilidad neuronal, actuando en una o más dianas farmacológicas (Tabla 1), dando lugar a diferentes acciones (Rogawski y Löscher 2004; Löscher y Schmidt 2006; Kammerer y cols., 2011) que conllevan la reducción de la sincronización neuronal en zonas localizadas del cerebro, e inhiben la difusión anormal de la transmisión de impulsos a otras zonas cerebrales (Rogawski y Löscher 2004; Arzy y cols., 2010).

Los canales iónicos (canales dependientes de voltaje de Na⁺, Ca²⁺ o K⁺), constituyen una de las dianas más frecuentes de los FAE, sobre los que ejercen una reducción de la despolarización, que da lugar a una inhibición secundaria de la liberación sináptica, particularmente de glutamato. También actúan sobre los receptores de neurotransmisores, potenciando el efecto inhibitorio del GABA, bien actuando como agonistas de receptores GABA_A o inhibiendo la recaptación de GABA (Rogawski y Löscher, 2004). Para reducir la hiperexcitabilidad neuronal, algunos FAE actúan como antagonistas de los receptores de glutamato, lo que provoca una disminución de la transmisión excitatoria (Wamil y McLean, 1993). Las dianas moleculares de los principales FAE están reflejadas en la tabla 1, (modificada de Rogawski y Löscher,

2004; Errington y cols., 2008; łuszczki, 2009; Rogawski y Bazil 2008; Löscher 2011).

	Diana molecular					
	Fármaco	Canal de Sodio	Canal de Calcio	Sistema GABA	Recetor de Glutamato	Otra
Actividad predominante en canales de Na ⁺ (y Ca ²⁺)	Fenitoina	I _{NaF} , I _{NaP}				
	Carbamazepina	I _{NaF}				
	Oxcarbazepina	I _{NaF}				
	Lamotrigina	I _{NaF}	HVA			
	Zonizamida	I _{NaF}	Tipo-T			
Actividad predominante en canales de Ca ²⁺	Etosuximida	I _{NaP} ?	Tipo-T			
Actividad en Sistema GABA	Benzodiazepinas			GABA _A R		
	Vigabatrina			GABA-T		
	Tiagabina			Transportador-GABA		
Acción mezclada	Acido valproico	I _{NaF} ?, I _{NaP} ?	Tipo-T?	↑ renovación de GABA		
	Felbamato	I _{NaF}	HVA	GABA _A R	NMDA	
	Topiramato	I _{NaF} , I _{NaP}	HVA	GABA _A R	KA/AMPA	
	Fenobarbital		HVA	GABA _A R	AMPA	
Acción en dianas moleculares nuevas	Gabapentina		HVA (α2δ)	↑ renovación de GABA		
	Pregabalina		HVA (α2δ)			
	Levetiracetam		HVA	Revierde DMCM		Vesícula glicoproteica sináptica 2A (SV2A)
	Lacosamida	I _{NaP}				
	Retigabina			GABA _A R (β2 y β3)		Canal de K ⁺ Kv7/KCNQ/M

Tabla 1. Dianas moleculares de los principales fármacos antiepilépticos. Ver la lista adjunta de las abreviaturas (página 3)

Una de las principales funciones de los modelos de epilepsia es el estudio de los FAE (Löscher, 2011) a través del descubrimiento de nuevas moléculas, de la caracterización de su espectro anticonvulsivo, o de la evaluación de su eficacia antiepiléptica en el tratamiento crónico. Incluso son útiles para generar modelos específicos de crisis farmacoresistentes o refractarias.

	Fármaco	Eficacia clínica		
		Crisis parciales	Crisis generalizadas convulsivas	Crisis generalizadas no convulsivas
Actividad predominante en canales de Na ⁺ (y Ca ²⁺)	Fenitoina	+	+	NE
	Carbamazepina	+	+	NE
	Oxcarbazepina	+	+	NE
	Lamotrigina	+	+	+
	Zonizamida	+	+	+
Actividad predominante en canales de Ca ²⁺	Etosuximida	NE	NE	+
Actividad en Sistema GABA	Benzodiazepinas	+	+	+
	Vigabatrina	+	+	NE
	Tiagabina	+	+	NE
Acción mezclada	Ácido valproico	+	+	+
	Felbamato	+	+	+
	Topiramato	+	+	+
	Fenobarbital	+	+	+/-
Acción en dianas moleculares nuevas	Gabapentina	+	+	NE
	Pregabalina	+	+	NE
	Levetiracetam	+	+	+/-
	Lacosamida	+		
	Retigabina	+		

Tabla 2. Eficacia clínica de principales fármacos antiepilépticos. Abreviatura: NE=no efectivo. Tomado y traducido de Löscher (2011).

❖ Fármacos antiepilépticos empleados en el estudio

Para el inicio de la caracterización farmacológica del hámster GASH:Sal, hemos utilizado en primer lugar los FAE abajo reseñados; Fenobarbital y Valproico, como FAE clásicos y ampliamente utilizados, y Levetiracetam, Retigabina y Lamotrigina

como FAE de nueva generación. En el caso de los dos últimos, la elección se hizo a partir de un convenio de cooperación con los laboratorios Glaxosmithkline.

➤ Fenobarbital

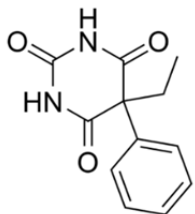


Figura 3. Estructura del Fenobarbital.

El fenobarbital (PB) es el FAE de uso general más antiguo (1912), y continúa siendo utilizado en la clínica para el tratamiento de crisis generalizadas tónico-clónicas y crisis parciales simples y en el estatus epiléptico. Tiene la ventaja de su eficacia en estos cuadros, y que puede ser tomado una vez al día, además de estar disponible en formulaciones parenterales y ser muy económico. Sin embargo, la elevada incidencia de efectos adversos, especialmente psicológicos, impiden que sea un fármaco de primera elección. Es un barbitúrico, que como tal, actúa prologando y potenciando la acción de GABA en el receptor $GABA_A$, aunque no está definido cómo se realiza la interacción con éste, y, en altas concentraciones, lo activa directamente. Adicionalmente, también bloquea los receptores AMPA, e inhibe la liberación de glutamato al ejercer efecto sobre los canales de calcio activados por voltaje tipo P/Q (Löscher y Rogawski, 2012; Rho y cols., 1996).

➤ Ácido valproico

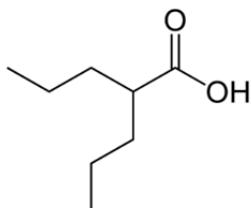


Figura 4. Estructura del Ácido Valproico

El ácido valproico (VPA) se prescribe tanto para convulsiones parciales como generalizadas en niños y adultos, siendo el fármaco de primera elección en muchas formas de epilepsia (Gilbert y cols., 2002). Aunque es un fármaco de los más seguros,

no está exento de efectos adversos, siendo especialmente destacables la hepatotoxicidad y la teratogenicidad. En este fármaco de amplio espectro anticonvulsivo, su efecto se explica por la combinación de distintos mecanismos de acción, como el aumento de los niveles cerebrales de GABA al inhibir la GABA transaminasa, disminución de los aminoácidos excitadores (antagonismo NMDA) y reducción de los potenciales de acción de las descargas repetitivas de alta frecuencia en neuronas centrales, modificando la conductancia del sodio y potasio (Chapman y cols., 1982; Rosenberg, 2007). Todos estos efectos pueden participar en su posible capacidad antiepiléptica (Shinnar y Berg, 1996).

➤ Levetiracetam

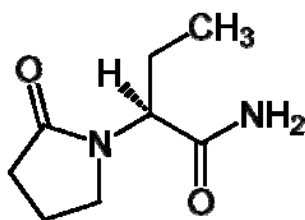
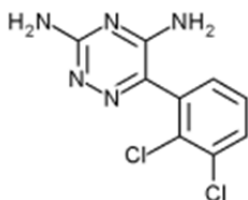


Figura 5. Estructura del Levetiracetam

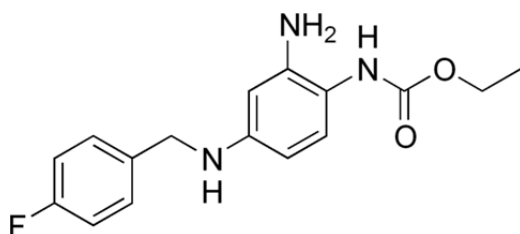
El levetiracetam (LEV) es un FAE muy utilizado por su fácil posología. Se une específicamente a la proteína SV2A de las vesículas sinápticas, modulando la función de exocitosis de esta vesícula, posiblemente aumentando la liberación de neurotransmisores inhibitorios (Lynch y cols., 2004). También, reduce significativamente las corrientes de calcio activadas por alto voltaje tipo N, y parcialmente las P/Q (Pisani y cols., 2004; Rogawski y Löscher, 2004; Stefan y Feuerstein, 2007). Es el único FAE no activo en los modelos MES y PTZ, debido posiblemente a su especial mecanismo de acción, aunque se muestra eficaz en los modelos genéticos o de encendido amigdalario (White, 2003). LEV se utiliza en politerapia para crisis parciales, y para epilepsia generalizadas como monoterapia (Stefan y Feuerstein, 2007).

➤ Lamotrigina

**Figura 6.** Estructura de la Lamotrigina

La lamotrigina (LTG) es un FAE de amplio espectro y de buena tolerabilidad. Es eficaz en convulsiones parciales y generalizadas, aunque puede provocar graves efectos adversos (Stefan y Feuerstein, 2007). Bloquea canales de sodio voltaje dependientes, estabilizando las membranas neuronales y modulando la liberación de neurotransmisores excitatorios, aunque parece que éste no es el único mecanismo de acción. Actúa tanto presinápticamente, inhibiendo la liberación de neurotransmisores (principalmente excitatorios), como postsinápticamente al disminuir la excitabilidad neuronal (Bialer, 2002; Rogawski y Löscher, 2004; Stefan y Feuerstein, 2007). Además, puede reducir las corrientes de calcio activadas por alto voltaje (Stefani y cols., 1998).

➤ Retigabina

**Figura76.** Estructura de la Retigabina

Retigabina (RGB; RTG; d-23129; Ezogabina) es un FAE distinto estructuralmente a los encontrados en clínica (Bialer M., 2002). RGB activa las corrientes de potasio reduciendo la excitabilidad neuronal, específicamente modificando la activación de la corriente M, la cual es generada por la acción de los canales KCNQ (Kv7) (Jensen, 2005). Al unirse con las subunidades KCNQ2-5 (Kv7.2-5) cambia la activación de la corriente M generando una hiperpolarización de los potenciales de membrana. Actúa también en el sistema GABAérgico, al incrementar la respuesta de GABA activado por la corriente de cloro, modulando positivamente los receptores GABA_A que

contienen las subunidades 2 ó 3, y estimulando la producción de GABA. También, bloque débilmente lo canales de sodio y calcio (Tatulian y cols., 2001; Otto y cols., 2002; Yeung y cols., 2008; Łuszczki, 2009).

Estudios del comportamiento epiléptico

❖ Semiología epiléptica

Existen numerosas clasificaciones de las crisis epilépticas, pero de todas las existentes, la más completa y utilizada es la realizada por la “Commission of Classification y Terminology” de la ILAE (International League Against Epilepsy) (ILAE, 1989), revisada recientemente (Berg y cols., 2010b), que define dos tipos fundamentales de crisis epilépticas: generalizadas o parciales (Anexo 1).

Las crisis generalizadas representan un 40% de las crisis epilépticas, y se caracterizan por ser generalizadas desde el comienzo. Aunque no presentan signos o síntomas de focalidad, no puede descartarse la existencia de un foco primario, difundiendo bilateralmente por redes neuronales que incluyen estructuras corticales y subcorticales. Pueden ser convulsivas (tónicas, tónico-clónicas y mioclónicas) y no convulsivas (ausencias). Una crisis generalizada tónico clónica, similar a las que vemos en nuestro modelo, el hámster GASH:Sal, progresa en distintas fases, inicialmente tónicas, seguidas de una fase clónica con convulsiones y termina con una fase de depresión sensorial generada por un agotamiento neuronal (Martino y Martino, 2007).

Las crisis focales o parciales se originan en una red neuronal particular y están limitadas a un solo hemisferio, pudiéndose dividir en simples, de tipo motor, sensitivas o autonómicas, y complejas. Pueden originarse en estructuras subcorticales (Berg y Scheffer, 2011).

❖ Neuroetología

La neuroetología es la combinación de la etología, el estudio comparativo del comportamiento y la neurofisiología o neurobiología (Berti y cols., 2010). Los estudios neuroetológicos están basados sobre el principio que señala que la evaluación

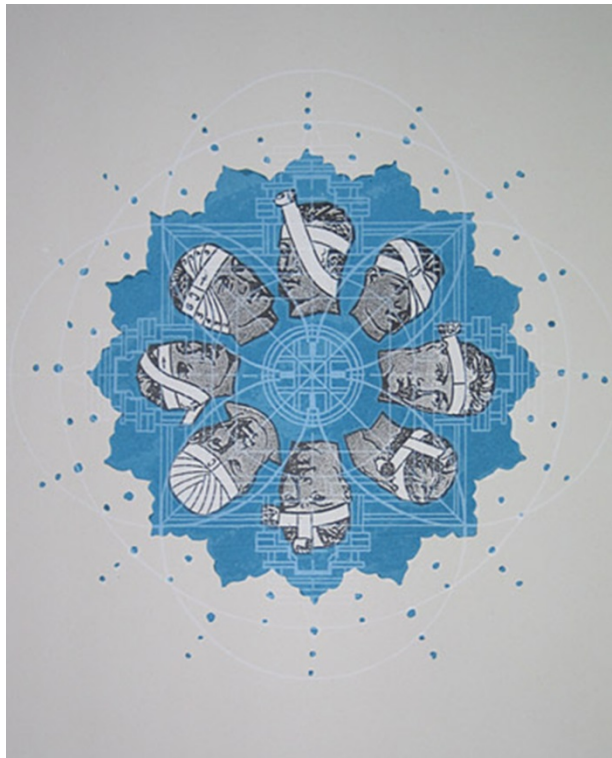
de secuencias comportamentales es más consistente que el estudio de comportamientos aislados. Es una técnica de gran valía para el estudio de la epilepsia, porque se observan no sólo los comportamientos relacionados con la crisis, sino también todos los componentes relacionados con el comienzo de los comportamientos ictales (García-Cairasco y cols., 1996; García-Cairasco y cols., 2004). Generalmente, las crisis epilépticas van unidas a determinados estereotipos, lo cual ha llevado a una corriente de investigación dentro de los epileptólogos, que consiste en estudiar las manifestaciones comportamentales en las crisis para inferir el substrato neuronal responsable de la epilepsia.

La evaluación comportamental de las convulsiones inducidas experimentalmente, se ha hecho generalmente mediante puntuación con índices de severidad de las crisis (escala límbica de Racine, índice audiogénico de Jobe), que miden, aunque de forma incompleta, el comportamiento epiléptico. Estos comportamientos pueden representarse mediante clústeres temporo-comportamentales basados en análisis estadísticos (Kotagal y cols., 1995), agrupando la secuencia de manifestaciones en representaciones gráficas de los eventos ictales denominados fluxogramas (García-Cairasco y cols., 1992), los cuales permiten una mejor aproximación al estudio de la etiopatogenia de la epilepsia. El análisis neuroetológico se realiza a partir de diagramas de flujos construidos en base a la frecuencia, duración e interacción de comportamientos (Berti y cols., 2010).

El núcleo central de este tipo de abordaje sostiene que manifestaciones aparentemente distantes (comportamentales, electroencefalográficas, moleculares...) de un proceso, pueden ser debidamente correlacionadas si se establecen interfaces metodológicas específicas. En el campo de la epilepsia, la neuroetología puede permitir la detección de circuitos neurales cuya activación sea responsable de secuencias comportamentales, y que expresan aspectos crónicos de las epilepsias (García-Cairasco y cols., 1996)

Estos estudios se han realizado diseños crónicos y agudos en modelos de ratas de epilepsia audiogénica, ratas de epilepsia inducida por pilocarpina, en ratones knockout de sinapsina, y en humanos con epilepsia del lóbulo temporal (Furtado y cols., 2002;

Dal-Cól y cols., 2006; Etholm y Heggelund 2009; Bertti y cols., 2010; Castro y cols., 2011; Tejada y cols., 2013).



(“Mandala”, J. Merrell 2007)

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La administración de drogas antiepilépticas, tanto de forma aguda como crónica, generará un cambio en el comportamiento relacionado con la crisis convulsiva del hámster GASH: Sal. Asimismo, el comportamiento en estado basal del animal se verá afectado por los efectos que el fármaco pueda ejercer.

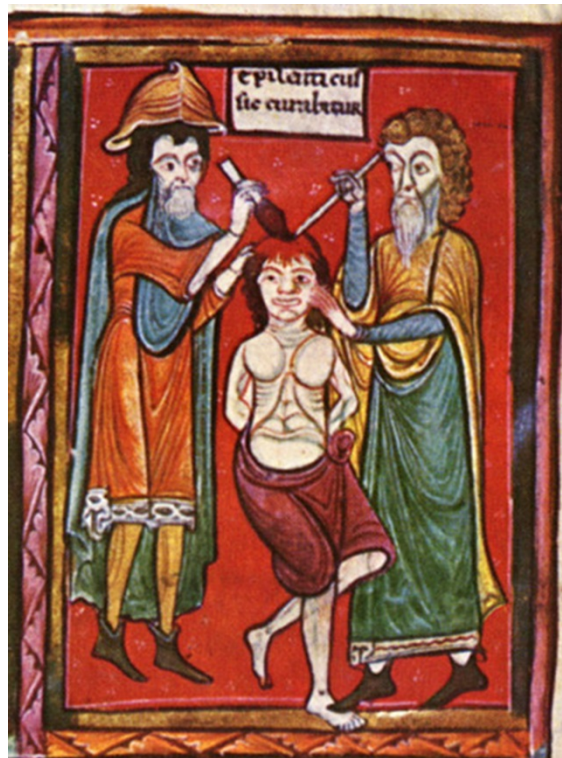
Objetivos

❖ Principal:

Caracterización farmacológica y neuroetológica del hámster GASH:Sal como modelo animal de epilepsia,

❖ Secundarios:

- Caracterizar farmacológicamente, con drogas antiepilépticas clásicas y de nueva generación, en tratamiento agudo y crónico, las crisis audiogénicas en el hámster GASH:Sal.
- Determinar el efecto anticonvulsivo y antiepiléptico de las drogas usadas
- Determinar la potencia anticonvulsiva de los fármacos usados
- Caracterizar la respuesta comportamental a los fármacos antiepilépticos usados mediante análisis neuroetológico.
- Determinar el efecto de los fármacos estudiados sobre las características de las crisis y sobre el comportamiento intercrisis.



(Epilepticus sic curabitur de "Manuscrito Sloane. Epilepticus sic curabitur.")

Diseño experimental

De acuerdo con el objetivo general de este estudio, procederemos a comparar la eficacia de diferentes fármacos antiepilépticos en la línea GASH:Sal, del S.E.A. de la Universidad de Salamanca. Para ello, se coloca al animal a estudiar dentro de un cilindro, donde se le dejará explorar el campo durante un minuto y posteriormente se provocarán las crisis convulsivas mediante la estimulación, con un ruido semialeatorio de 0-18 kHz de intensidad de 115 a 120 dB SPL, hasta que empiece la fase de convulsión tónico-clónica (marcada por la ocurrencia opistótono), o hasta un máximo de 1 minuto. Tras las crisis, se deja el animal en su jaula para que repose.

Para validar el hámster GASH:Sal como modelo animal de epilepsia, estudiaremos la eficacia anticonvulsiva de distintos fármacos y su posible efecto antiepiléptico en el GASH:Sal. Se eligieron cinco fármacos antiepilépticos: Fenobarbital, ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina. El Fenobarbital y el ácido Valproico son fármacos antiepilépticos clásicos, ampliamente conocidos y utilizados en clínica. El Levetiracetam, la Lamotrigina y la Retigabina son fármacos de segunda y tercera generación que también se utilizan actualmente.

- ❖ Para determinar la vida media de los fármacos, se inyectan intraperitonealmente las dosis precisas de los fármacos a estudiar, y se obtienen muestras de sangre a diferentes tiempos para analizar su concentración en plasma por HPLC/MS.
- ❖ Para determinar la potencia anticonvulsivante (DE_{50}) de los fármacos a ensayar, se administran intraperitonealmente de forma aguda los fármacos en dosis crecientes, una por semana, antes de provocar las crisis convulsivas audiógenas. A partir de la respuesta (presencia o ausencia de crisis) de los animales a los fármacos, se determina la dosis eficaz media por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).
- ❖ Para evaluar el efecto de la administración crónica (4 semanas) de los fármacos, éstos se administran por vía oral, mezclados con miel diluida directamente en la boca, dos veces al día (ajustando la dosis según el peso de cada animal, que se toma cada tres días). Se estimula cada

animal el primer día antes de iniciar la administración, y posteriormente, una vez a la semana durante 4 las semanas siguientes. Se obtienen muestras de sangre la primera y la cuarta semana del periodo de tratamiento y, una vez terminado, se extraen dos cerebros por grupo para medir las concentraciones de fármacos en ambos tejidos por HPLC/MS. Paralelamente, se realiza un estudio neuroetológico para analizar los cambios en la semiología de las crisis generados por los fármacos antiepilépticos.

Valoramos la eficacia anticonvulsiva de los fármacos determinando las modificaciones en la severidad de las crisis (según los criterios de Jobe y Laird., 1981, modificados por el grupo de García- Cairasco, 1996) y los efectos tóxicos de ataxia y sedación (según los índices de Löscher y Hönack,1989).

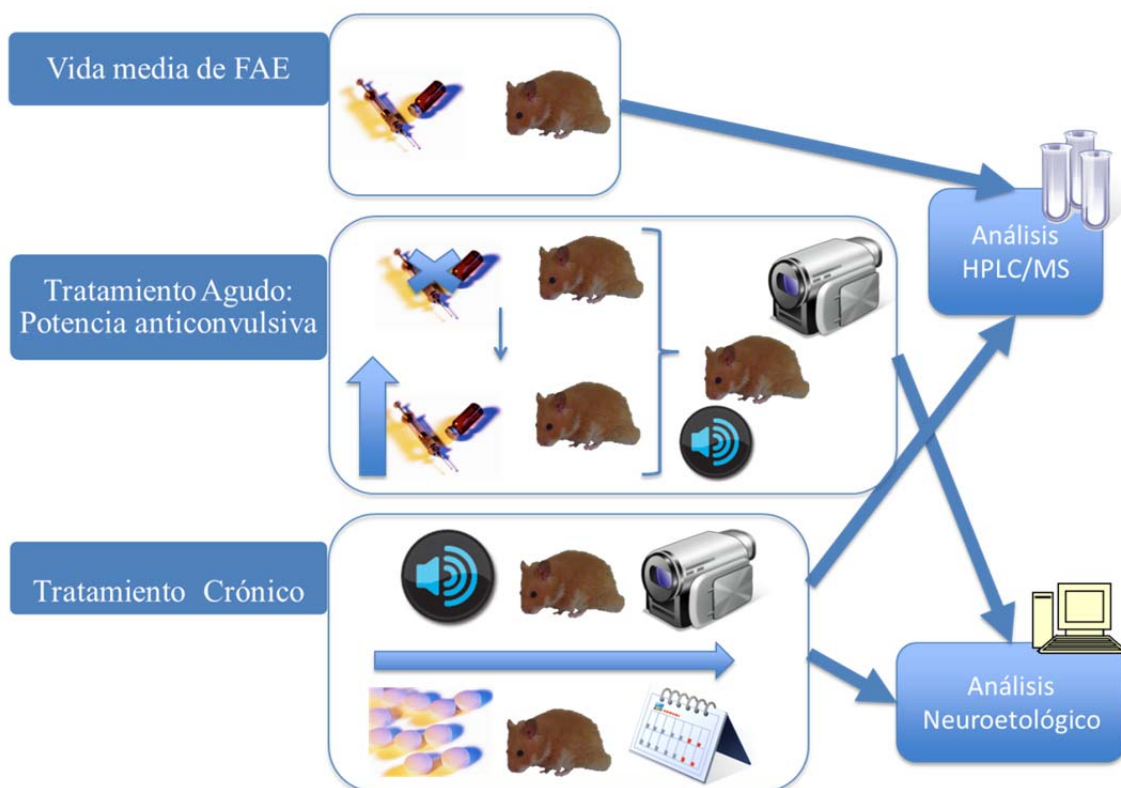


Figura 8. Esquema del diseño experimental empleado.

Comparamos la potencia anticonvulsiva y la efectividad de las dosis, (además de su toxicidad) de los distintos fármacos mediante la prueba de Friedman para datos no paramétricos, con el posthoc de Conover (Conover, 1980), llevados a cabo con el programa IBM SPSS.

Para la caracterización neuroetológica de las crisis convulsivas en el hámster GASH:Sal realizamos la estimulación auditiva, provocando las crisis epilépticas que se graban. Los análisis se realizan sobre tres períodos alrededor del estímulo auditivo: un minuto pre-estímulo, 1 minuto de estímulo o hasta la aparición de las convulsiones tónico-clónicas y tres minutos post-estímulo o un minuto en caso de ausencia de crisis. Los diferentes items comportamentales se clasifican según el programa ETHOMATIC, representando posteriormente la secuencia de manifestaciones temporo-comportamentales en esquemas gráficos de los eventos ictales denominados diagramas de flujo o fluxogramas (García-Cairasco y cols., 2004). Se determinó un criterio de separación, que estipulaba según el índice de severidad (IS) qué animales sufrían crisis ($IS \geq 2$) y cuáles no ($IS < 2$), basado en que la severidad de crisis menor de 2 representa un inicio de carrera salvaje que no es continuada, y no ejerce ningún efecto en el comportamiento posterior.



(Ejemplar de la cepa GASH:Sal)

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

En este estudio, empleamos 124 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) machos, de dos a tres meses, de la línea GASH:Sal, pertenecientes a la colonia mantenida en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (USAL). Durante los experimentos, se mantuvieron en el animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio establecidas por el Real Decreto español 53/2013 y por la Directiva Europea 2010/63/EU, bajo la supervisión del Comité de Bioética de la USAL. Se realizaron todos los esfuerzos para evitar cualquier maltrato animal y para reducir el número de animales utilizados para el estudio.

Del total de animales utilizados, 25 se destinaron al estudio de la cinética de absorción de fármacos, 6 para la caracterización de la crisis en condiciones basales, 30 ejemplares para el estudio de administración aguda, y 63 animales para el estudio de administración crónica de los diferentes fármacos.

Fármacos Antiepilépticos

Los fármacos utilizados fueron:

- Fenobarbital (PB), en formato comercial Luminal® (Kern Pharma), solución inyectable
- Ácido Valproico (VPA), en formato comercial Depakine® (Sanofi Aventis), solución inyectable para la fase aguda, y solución oral para la fase crónica.
- Levetiracetam (LEV), en formato comercial Keppra® (UCB Pharma), solución inyectable para la fase aguda, y solución oral para la fase crónica.
- Lamotrigina (LTG), fármaco obtenido gracias a una colaboración con la casa farmacéutica GlaxoSmithKline en forma pura para la fase aguda y crónica.
- Retigabina (RTG), fármaco obtenido gracias a una colaboración con la casa farmacéutica GlaxoSmithKline en forma pura para la fase aguda y crónica.

Estímulo Acústico

Para la estimulación acústica los ejemplares se colocan en un coso circular de metacrilato transparente (altura: 50 cm; diámetro: 37 cm). La estimulación se realiza con un sonido semialeatorio de 0-18 kHz con una intensidad de 115 a 120 dB SPL, reproducido por un ordenador que tiene acoplado un amplificador (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) y un altavoz de altas frecuencias (Beyma T2010, Valencia, Spain) que se encuentra ubicado en la parte superior de la arena cilíndrica. Tras un periodo de aclimatación de 1 minuto, se somete a los animales al estímulo sonoro hasta el inicio de la crisis audiógena o 1 minuto en caso de ausencia de crisis. La crisis se graba mediante una cámara digital (Sony TRV-8E) a 0,5 m de distancia horizontal.

Técnicas para el Estudio Farmacológico

❖ Extracción y procesamiento de las muestras de sangre sanguíneas

Se extrae sangre de la vena cava craneal de acuerdo con el procedimiento descrito por Picazo y cols., (2009), bajo anestesia aérea con isoflurano. Las condiciones de inducción fueron: 4% isoflurano y 1 l/min O₂, para la inducción de la anestesia, y 3% isoflurano y 0,4 l/min O₂, para el mantenimiento, aunque las condiciones varían según el fármaco.

La determinación de las concentraciones en sangre de los diferentes fármacos se realizó por HPLC/MS, a partir de suero, en el caso de PB, VPA, LEV y LTG, y de plasma en el caso de la RTG. Para ello, se extraen 100 µl de sangre por toma y se rehidrata el animal con 150 µl de suero salino al 0,9%, vía intraperitoneal (i.p.).

Para el análisis de fármacos en suero, las muestras se mantienen a 4 °C desde el momento de la extracción hasta la formación del coágulo. Una vez formado, se centrifuga a 4 °C durante 5 minutos a 10000 g, recogiendo el sobrenadante en alícuotas de 40 µl, que se congelan hasta su análisis. A cada alícuota, se añaden 40 µl de acetonitrilo (Panreac, Barcelona, España) y el estándar interno adecuado para cada fármaco, como se indica en la tabla 3, adecuando la concentración para 40 µl de

muestra. Las muestras se mezclan con un agitador vórtex y se dejan en agitación durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugan durante 5 minutos a 11000 g, recogiendo el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml nuevo y secando al vacío. Una vez deshidratada totalmente la muestra, se resuspende en 40 µl de metanol (Panreac, Barcelona, España) al 20% en agua destilada.

Para la obtención de plasma utilizado en el análisis de la RGB, las muestras se recogen en un tubo de 1,5 ml con 5 µl de EDTA 0,5M pH 8, manteniendo a 4°C. Posteriormente, se centrifugan a 13000g durante 10 minutos a 4°C, separando el sobrenadante en alícuotas de 40 µl (plasma) y congelando hasta su uso. Para la preparación de la muestra a analizar por HPLC, a los 40 µl de plasma, se añaden 40 µl de PBS 0,01M, 420 µl de cloroformo en alcohol isopropílico (95:5) y el estándar interno en concentración conocida (tabla 3). Se mezcla con el vórtex durante 30 segundos, dejando 10 minutos en agitación. Posteriormente, se centrifuga 10 minutos a 1500g, y el sobrenadante se coloca en un tubo nuevo y se seca al vacío. Una vez deshidratada totalmente la muestra, se resuspende en 40 µl de metanol al 20% en agua destilada.

❖ Extracción y procesamiento de tejido cerebral

De cada grupo de estudio farmacológico crónico, se eutanizan dos animales por sobredosis de Pentobarbital y se les extrae el hemisferio derecho. Las muestras, una vez pesadas, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido, y se guardan a -70°C hasta su uso posterior. En el momento del procesamiento, se añaden 2 ml de Ácido Perclórico 0,1M y se sonicán con Politrón®, centrifugando a continuación 15 minutos a 13000 g y separando el sobrenadante en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le adicionan una concentración conocida del estándar interno (tabla 3), 50 mg de alúmina, 100 µl de sodio metabisulfito 5 mM y 800 µl de mM Tris-1mM EDTA pH 8. Tras agitar 30 s con un vórtex, se deja en agitación durante 10 minutos, centrifugándose a continuación 5 minutos a 11000g. Para los estudios de VPA, LTG, LEV y RGB, se recoge el sobrenadante y se analiza por HPLC/MS. En el caso de PB, se desecha el sobrenadante y el pellet se lava dos veces con agua milliQ, centrifugando entre lavados a 11000g minuto y medio. Una vez terminados los

lavados, se añaden 100 µl de metanol, se agita con el vórtex y se centrifuga a 11000g 1 minuto y medio. El sobrenadante obtenido se analiza por HPLC/MS.

❖ Niveles sanguíneos de FAE

	Estándar Interno y concentración de análisis	Método Isocrático de elución (combinación de las fases*)	Referencias
Fenobarbital	Acetanilida, 25 µg/ml (Merck, Darmstadt, Alemania).	20 % de la fase B a tasa constante durante 15 minutos.	Tang y cols., 1979; Moriyama y cols. 1999
Ácido Valproico	Ácido Octanoico, 20 µg/ml (Panreac, Barcelona, España)	40% de la fase B hasta el minuto 6, en el siguiente minuto se incrementó linealmente hasta un 100% y se mantuvo por 4 minutos en esta concentración	Cheng y cols., 2007
Levetiracetan	Cafeína, 4 µg/ml (LiChro test standard) (Merck, Darmstadt, Alemania)	5% de la fase B hasta el minuto 3, en los siguientes 5 minutos se incrementó linealmente hasta un 20% y se mantuvo por 2 minutos en esta concentración	Donehy y cols., 1999; Contin y cols., 2008
Lamotrigina	Cloralfenicol 10 µg/ml (Sigma-Aldrich. Madrid, España)	75% de A y 25% de B por 15 minutos	Contin y cols., 2005; Contin y cols., 2010
Retigabina	Flupirtina 10 µg/ml (Metanor ®, MEDA. Lisboa, Portugal)	80% de A y 20% de B por 15 minutos	Bu y cols., 2007; Hempel y cols., 1999; Knebel y cols., 2000
*Fases: A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua; B: Acetonitrilo			

Tabla 3. Condiciones y estándares internos para el análisis de los fármacos antiepilépticos.

Las determinaciones de los niveles sanguíneos se realizaron por HPLC/MS en el Servicio General de Espectrometría de Masas de la USAL. El equipo utilizado para el análisis de HPLC fue un Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) y para el análisis de espectrometría de masas un espectrómetro de trampa iónica Agilent MSD Trap XCT (Agilent Technologies). La fase móvil fue bombeada con una velocidad de flujo de 0,2 ml/minuto en una columna X-Bridge C-18 (tamaño de partícula: 3,5 μm ; diámetro: 2,1 mm; altura 10 cm) (Waters Corporation, Milford MA, USA). Se utilizaron distintos métodos de elución para cada droga (Tabla 3). Para cuantificar los compuestos tal como eran eluidos por la columna, hemos usado un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters Associates), calibrándolo previamente a partir de soluciones de concentración conocida.

❖ Determinación de la vida media de los FAE

Para determinar la cinética de absorción de los diferentes fármacos en el GASH:Sal, se inyectan intraperitonealmente las dosis precisas de los FAE en las siguientes concentraciones: 500 mg/kg de ácido valproico (VPA), 20 mg/kg de Fenobarbital (PB), 100 mg/kg de Levetiracetam (LEV), 20 mg/kg de Lamotrigina (LTG) y 2,5 mg/kg de Retigabina (RGB). Se obtienen muestras de sangre a diferentes tiempos post inyección (15, 30, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos), para analizar, por HPLC/MS, su concentración en plasma, y realizar las curvas de concentraciones plasmáticas del fármaco. En el caso del PB se varió el protocolo, se extrajeron muestras a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos. Para cada fármaco, se emplean 5 hámsteres (n= 25).

❖ Determinación de la eficacia anticonvulsiva (DE_{50})

Para determinar la actividad anticonvulsiva de los fármacos, se les administra intraperitonealmente durante 5 semanas dosis crecientes de cada uno de los fármacos (una dosis cada semana) antes de provocar la crisis (Retigabina: 0,5, 1, 1,5 y 2,5 mg/kg; Lamotrigina: 5, 10, 15 y 20 mg/kg ; Ácido Valproico: 100, 150, 300 y 500 mg/kg; Fenobarbital 5, 10, 15, y 20 mg/kg; Levetiracetam: 30, 50, 80, 100 mg/kg). La primera semana, se inyecta suero salino a todos los animales para observar la crisis en estado basal. El tiempo que media entre la administración del fármaco y la

provocación de la crisis (tiempo de máximo efecto anticonvulsivo), se establece previamente. Se graban las diferentes pruebas de estimulación sonora, y se realiza un flujo de comportamientos, según se describe en el punto 5 de este apartado.

Valoramos la eficacia anticonvulsiva de los fármacos, determinando la severidad de las crisis según los criterios de JOBE, modificados por García- Cairasco (1996) (anexo 2) y la aparición de ataxia y/o sedación según los índices de Löscher y Hönack (1989), (anexo 2). A partir de la respuesta (presencia o ausencia de crisis) de los animales a los fármacos, se determina la dosis eficaz media (DE_{50}), por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). En el análisis de los resultados, se aplicó el test Friedman para datos no paramétricos con el post-hoc de comparaciones de Conover (1980). Todos los análisis se realizaron con el Programa de estadística SPSS PASW 18 (IBM).

❖ Tratamiento crónico: estimación del efecto antiepiléptico

Grupos a estudiar: Se utilizan 6 hámster GASH:Sal por fármaco en la primera fase, y, en la segunda fase, 5 hámsteres para PB, VPA y LEV, y 6 para los grupos de LTG y RGB.

➤ Primera fase de administración crónica:

Un grupo de 6 hámster GASH:Sal por fármaco y un grupo de 6 animales control recibieron el fármaco en el agua de bebida, calculándose la dosis diaria en base al peso de animal, que se determina cada 3 días, y a la diferente biodisponibilidad oral. La dosis administrada de cada fármaco se calculó en base a la DE_{50} parenteral: 12,5 mg/kg para PB, 237 mg/kg para VPA, 40 mg/kg para LEV, 5 mg/kg LTG y 4,16 mg/kg para RGB.

➤ Segunda fase de administración crónica:

Recurrimos a la modificación de la forma de administración de los FAE, al no obtener resultados con el protocolo anterior.

Se utilizan de 5 a 6 hámster GASH:Sal por fármaco y un grupo de 6 animales control al cual se le somete al mismo manejo que los animales tratados con fármaco.

Durante 4 semanas, se administra el fármaco por vía oral dos veces al día. La dosis se ajusta según el peso de cada animal, que se toma cada tres días. La dosis inicial del fármaco se administró durante 2 semanas, y se calculó en base a la ED₅₀ parenteral. Esta dosis se incrementó a partir de la tercera semana, en función de la respuesta anticonvulsiva y de la toxicidad del fármaco.

Se estimula cada animal el primer día antes de iniciar la administración, y posteriormente una vez a la semana durante 4 las semanas siguientes. El protocolo de estimulación, la grabación de las crisis, su valoración y la valoración de los efectos tóxicos (ataxia y sedación) son los mismos utilizados en la administración aguda. Se obtienen muestras de sangre una vez a la semana durante el periodo de tratamiento y, una vez terminado, se extraen dos cerebros por grupo para medir las concentraciones de fármacos en ambos tejidos por HPLC/MS.

Estudio Neuroetológico

❖ Adquisición de imágenes

Sobre las imágenes grabadas de la totalidad de las crisis, se realizan los análisis en tres ventanas de observación alrededor del estímulo audiógeno:

1. Ventana pre-estímulo de 1 minuto de duración
2. Un minuto durante el tiempo en el que se aplica el estímulo sonoro o hasta la aparición de las convulsiones tónico-clónicas (marcada por el opistótono)
3. Ventana de tres minutos post-estímulo o un minuto en caso de ausencia de crisis.

❖ Evaluación de los Cambios comportamentales

Las secuencias comportamentales, observadas durante las estimulaciones, se evaluaron con métodos neuroetológicos (Garcia-Cairasco y cols., 1996). Cada comportamiento presentado por los animales en las ventanas de observación se

registra segundo a segundo, de acuerdo con un diccionario de los diferentes ítem comportamentales (anexo 3). Una vez registrados, se ingresan los datos en el software ETHOMATIC (García- Cairasco y cols., 1996; García- Cairasco y cols., 2004), el cual genera un análisis estadístico de los mismos. El programa nos da la frecuencia y duración de los diferentes ítems observados por ventana, y la correlación entre ellos por el cálculo del Chi cuadrado (X^2). Esta información es transferida a unos diagramas de flujo de comportamiento, que son construidos en Microsoft Power Point 2011, que reflejan la secuencia de manifestaciones temporo- comportamentales (figura 9).



Figura 9. Flujo que ilustra los aspectos gráficos y estadísticos de los comportamientos observados. La frecuencia y duración de ejecución de cada comportamiento es proporcional a la altura y anchura del rectángulo, respectivamente. El grosor de la flecha y la dirección y indica la intensidad estadística y la preferencia de asociación entre dos ítems comportamentales.

❖ Caracterización neuroetológica de las crisis convulsivas en el hámster GASH:Sal

Paralelamente al estudio del efecto de la administración crónica de los diferentes FAE, se realizó un estudio neuroetológico de los hámsters GASH:Sal, sin recibir ningún tipo de fármaco, que actuó como control de los animales tratados (n =6). Se realizó un estímulo acústico una vez por semana durante 5 semanas. Del análisis de las grabaciones, según el procedimiento detallado anteriormente, se realiza un diagrama de flujo de los comportamientos observados.



(“Epilepsy, leaving the nightmare behind”, Eduardo Urbano Merino, 2013)

Resultados

Estudio Farmacocinético en el hámster GASH:Sal con Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina.

❖ Curvas de niveles plasmáticos de los FAE

Para determinar la cinética de absorción de los diferentes fármacos en el GASH:Sal se inyectaron intraperitonealmente los FAE en las siguientes concentraciones: 500 mg/kg de ácido Valproico (VPA), 20 mg/kg de Fenobarbital (PB), 100 mg/kg de Levetiracetam (LEV), 20 mg/kg de Lamotrigina (LTG) y 2,5 mg/kg de Retigabina (RGB). Se determinaron los niveles sanguíneos a diferentes tiempos (15, 30, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos). Para PB, se modificaron los tiempos de extracción a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Fenobarbital presenta una absorción y eliminación sanguínea muy rápida, con niveles no detectables del fármaco a los 30 minutos post-inyección (figura 10A).

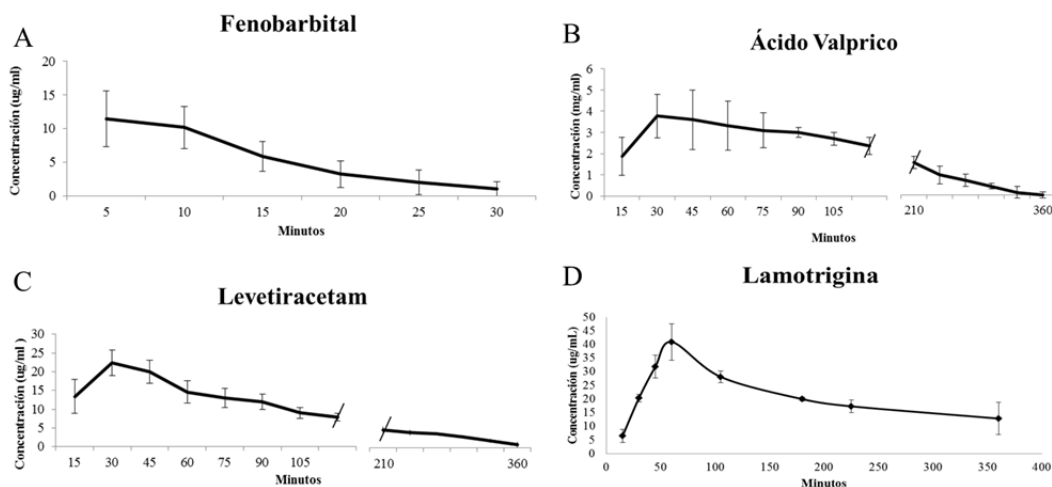


Figura 10. Concentraciones plasmáticas a distintos tiempos después de la inyección intraperitoneal de Ac. Valproico (500 mg/kg) y Levetiracetam (100 mg/kg) y Lamotrigina (2,5 mg/kg). Cada punto es la media \pm SEM de 8 animales.

El ácido Valproico, el Levetiracetam y la Lamotrigina presentaron una farmacocinética similar, con picos máximos en plasma para ácido Valproico y Levetiracetam alrededor de los 30 minutos, observándose niveles bajos del fármaco a

los 360 minutos (figura 10B y C). La Lamotrigina mostró su mayor nivel plasmático a los 60 minutos después de la administración, y mostró una tasa de eliminación más lenta (figura 10D).

No hemos podido determinar los niveles plasmáticos de fármaco en el caso de Retigabina.

❖ Niveles sanguíneos y cerebrales de los FAE en tratamiento crónico del GASH:Sal

Durante la administración crónica de los FAE, se realizaron extracciones sanguíneas para determinar los niveles de los fármacos en la primera y en la cuarta semana desde el inicio del tratamiento. Al final del tratamiento, se obtuvieron muestras de tejido cerebral, las cuales también fueron analizadas para determinar los niveles de FAE en el cerebro.

En el caso de PB, las concentraciones plasmáticas encontradas fueron 8,83 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 2,76) en la primera semana, y 0,13 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 0,014) en la cuarta; y la concentración cerebral fue 0,15 (+/- 0,05) $\mu\text{g/g}$. Para el VPA: 295,68 $\mu\text{g/ml}$ (+/-91,53) en la primera semana; 92,09 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 52,36) en la cuarta, y la concentración cerebral fue 1,22 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 0.75). En el caso del LEV, se encontraron concentraciones plasmáticas de 7,92 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 1,36) en la primera semana y 25,90 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 9.27) en la cuarta. LTG presentó niveles plasmáticos de 5,1 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 1,24) en la primera semana y 3,96 $\mu\text{g/ml}$ (+/- 1,25) en la cuarta. No se han podido determinar las concentraciones de LEV y LTG en tejido cerebral.

Caracterización neuroetológica de las crisis en el hámster GASH:Sal en estado basal.

En el grupo control de animales GASH:Sal, el diagrama de flujo representativo de la primera crisis (figura 11) presenta una estructura relativamente simple. En la ventana pre-estímulo se observan comportamientos exploratorios y algunos ítems comportamentales aislados de limpieza (recuadros azules). Tras el estímulo sonoro, se inicia la carrera salvaje en menos de un segundo (recuadros amarillos), y a

continuación aparecen las convulsiones tónico-clónicas (recuadros rojos), observándose hiperextensiones de la cabeza y miembros superiores e inferiores y finalizando al entrar el animal en inmovilidad postictal.

La duración completa de la crisis hasta el inicio del periodo post-ictal es de un promedio de 25,82 (+/- 2,44) segundos (figura 12). En el grupo control de animales GASH:Sal no tratados, la única variación observada después de las sucesivas estimulaciones, fue un ligero incremento (0 a 10 seg.) en el tiempo de latencia previo a carrera salvaje entre la primera y la última crisis.

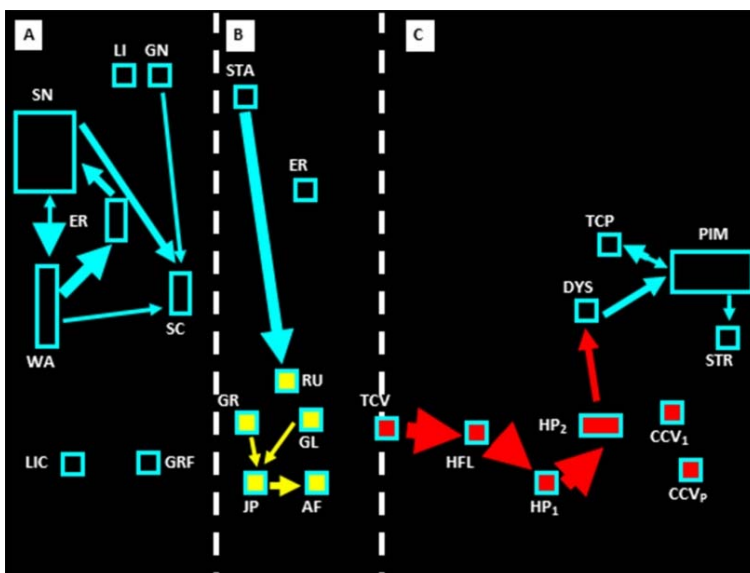


Figura 11. Diagrama de flujo de las crisis audiogénas del GASH:Sal. Muestra la secuencia de ítems conductuales en diferentes momentos de la primera crisis audiogénica de los GASH:Sal en ausencia de administración de fármacos antiepilépticos (n=24). (A) Ventana Pre-sonido, (B) durante la estimulación sonora, y (C) ventana post-estimulación sonora. La descripción de los ítems conductuales se encuentra en el anexo 3.

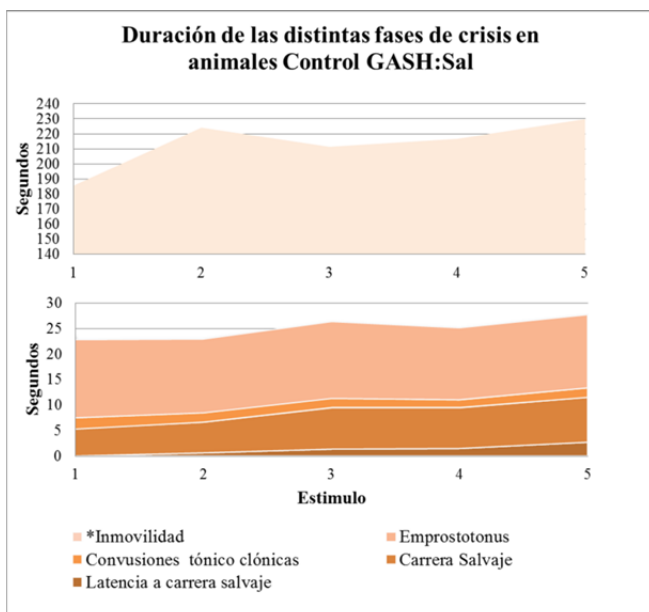


Figura 12. Duración de las diferentes fases de la crisis en los GASH:Sal sin tratamiento farmacológico. La imagen representa la duración de las diferentes fases de la crisis en 5 estimulaciones sonoras con un intervalo de 1 semana (n=6). *Inmovilidad post-ictal.

Modificación de la semiología de la crisis por administración aguda intraperitoneal con Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina en el hámster GASH:Sal.

❖ Determinación de la DE₅₀

PB, VPA, LTG y RTG presentan en el hámster GASH:Sal una eficacia anticonvulsiva dependiente de las dosis. El Levetiracetam, sin embargo, no presentó una respuesta clara en relación a la dosis.

Las dosis utilizadas para el PB fueron 5, 10, 15 y 20 mg/kg. Desde los 5 mg/kg, este fármaco presentó efecto anticonvulsivo en un 33% de los casos, pero no anuló las crisis completamente hasta los 20mg/kg (figura 13). La DE₅₀ estimada de PB es 10 mg/kg.

Las dosis utilizadas de VPA fueron 100, 150, 300 y 500 mg/kg. El VPA tiene un 75% de efecto anticonvulsivo a los 300 mg/kg y anuló totalmente las crisis con la dosis máxima de 500 mg/kg (figura 13). La DE₅₀ de VPA es 225 mg/kg.

Las dosis de LEV utilizadas fueron 30, 50, 80 y 100 mg/kg. Aunque sin ser un efecto claramente dosis-dependiente, el LEV presentó capacidad anticonvulsiva, anulando un 50-66% de las crisis con dosis de 30 y 50 mg/kg (figura 13). El rango de la dosis media eficaz está entre 30 y 50 mg/kg.

Las dosis administradas de LTG fueron 5, 10, 15 y 20 mg/kg. La LTG anuló las crisis en un 100% a partir de los 10 mg/kg (figura 13), calculándose una DE₅₀ de 5 mg/kg.

Para RGB, se utilizaron las dosis de 0,5, 1, 1,5 y 2,5 mg/kg. Tiene actividad anticonvulsiva desde la primera dosis en un 50%, y anula las crisis completamente a dosis de 1 mg/kg (figura 13). En el caso de la RGB, se determinó una DE₅₀ de 0,5 mg/kg.

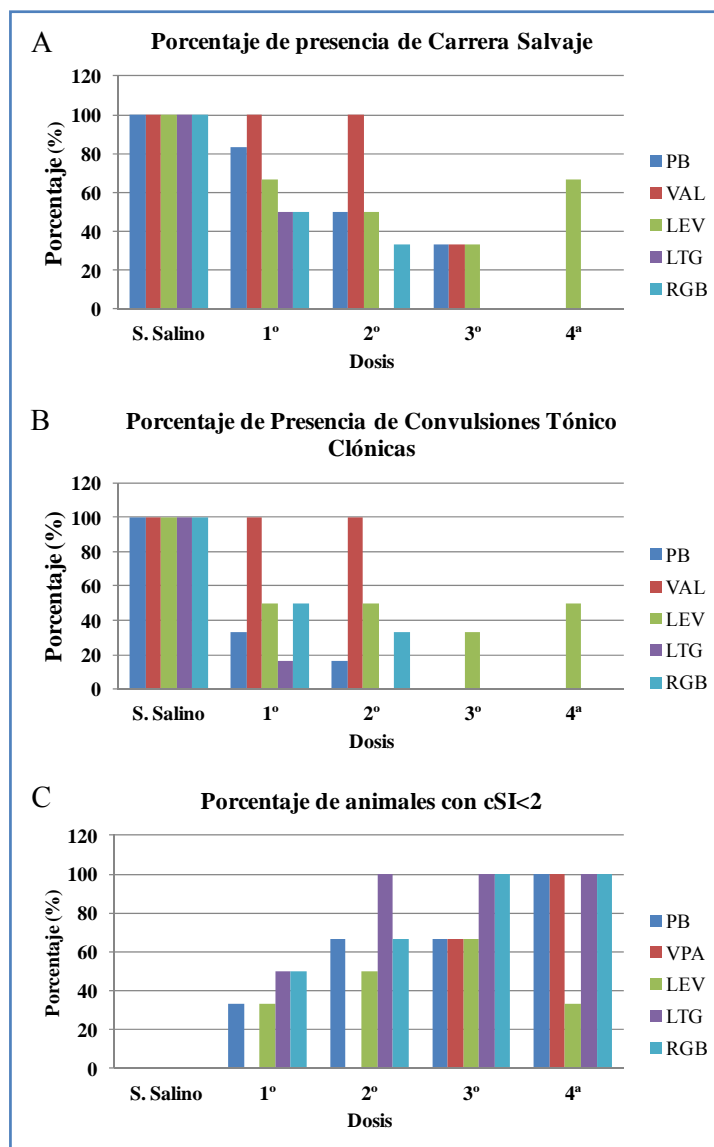


Figura 13. Porcentaje de animales GASH:Sal con y sin tratamiento que presentan carrera salvaje (A), y convulsiones tónico-clónicas (B). Porcentaje de animales a los que se les anula la crisis (C), presentando un índice de severidad categorizado (cSI) menor que 2. Los números 1°, 2°, 3° y 4° representan dosis crecientes de fármaco: 5, 10, 15, y 20 mg/kg de PB; 100, 150, 300, y 500 mg/kg de VPA; 30, 50, 80, y 100 mg/kg de LEV; , 10, 15, y 20 mg/kg de LTG; y 0,5, 1, 1,5 y 2,5 mg/kg.

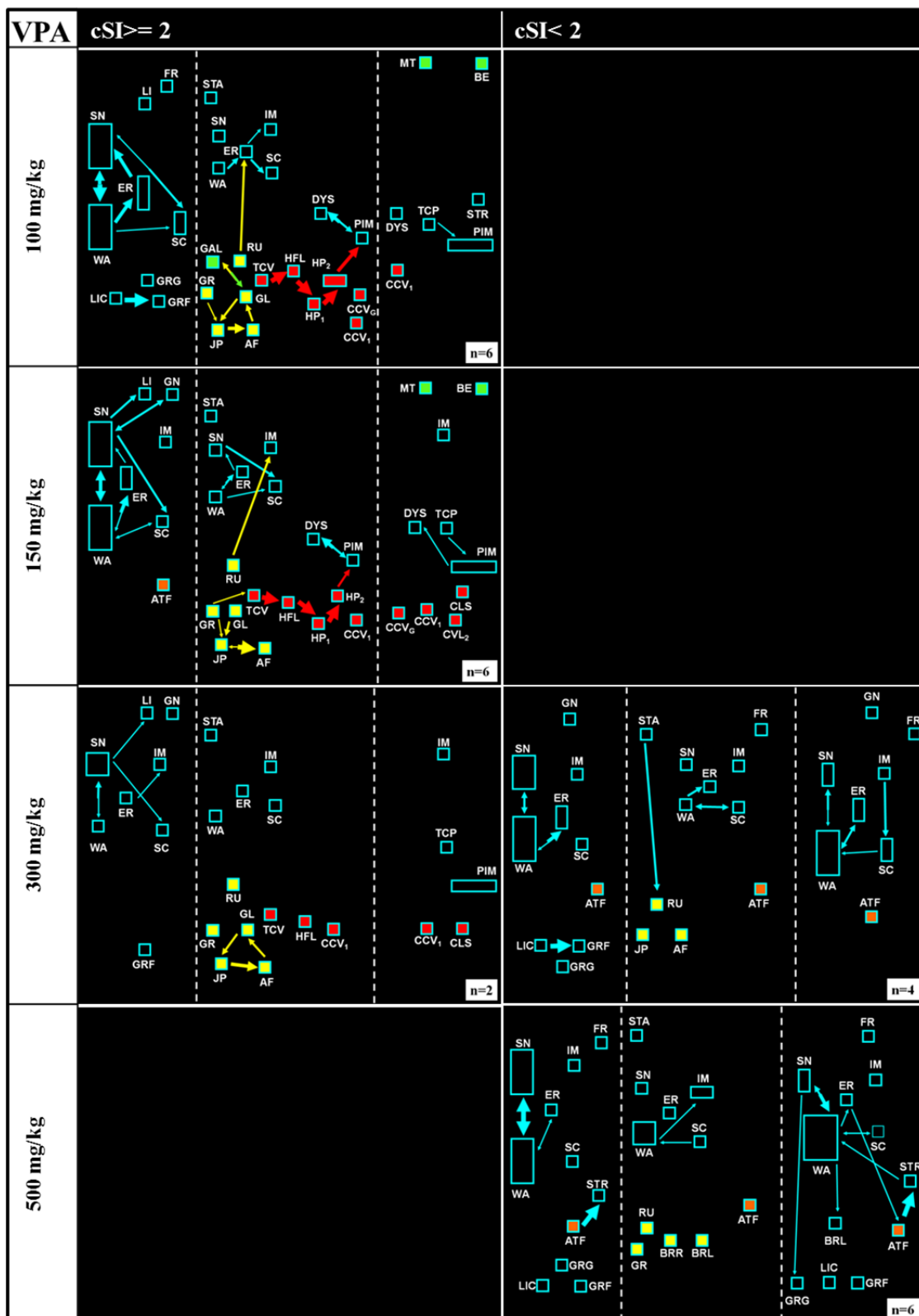


Figura 15. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Ácido Valproico (VPA) vía i.p. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas

En general, al modificarse el comportamiento ictal por la presencia del FAE, se ve afectada la fase de convulsión tónico-clónica, anulándose, y haciendo que la fase de carrera salvaje se prolongue y pase directamente a la inmovilidad postictal, sin convulsiones. Cuando esto ocurre, la duración de la inmovilidad postictal es mayor. A medida que las dosis van incrementándose, los tiempos de la carrera salvaje van disminuyendo, hasta anularse la crisis.

En los animales tratados con PB, hay una diferencia marcada en los comportamientos exploratorios entre los animales en los que se mantiene la crisis ($cSI \geq 2$) y en los que no lo hace ($cSI < 2$) (Figura 14).

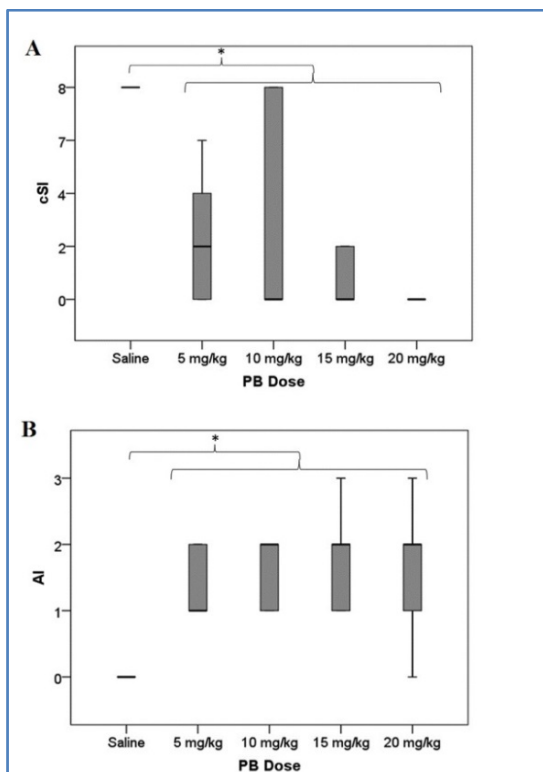
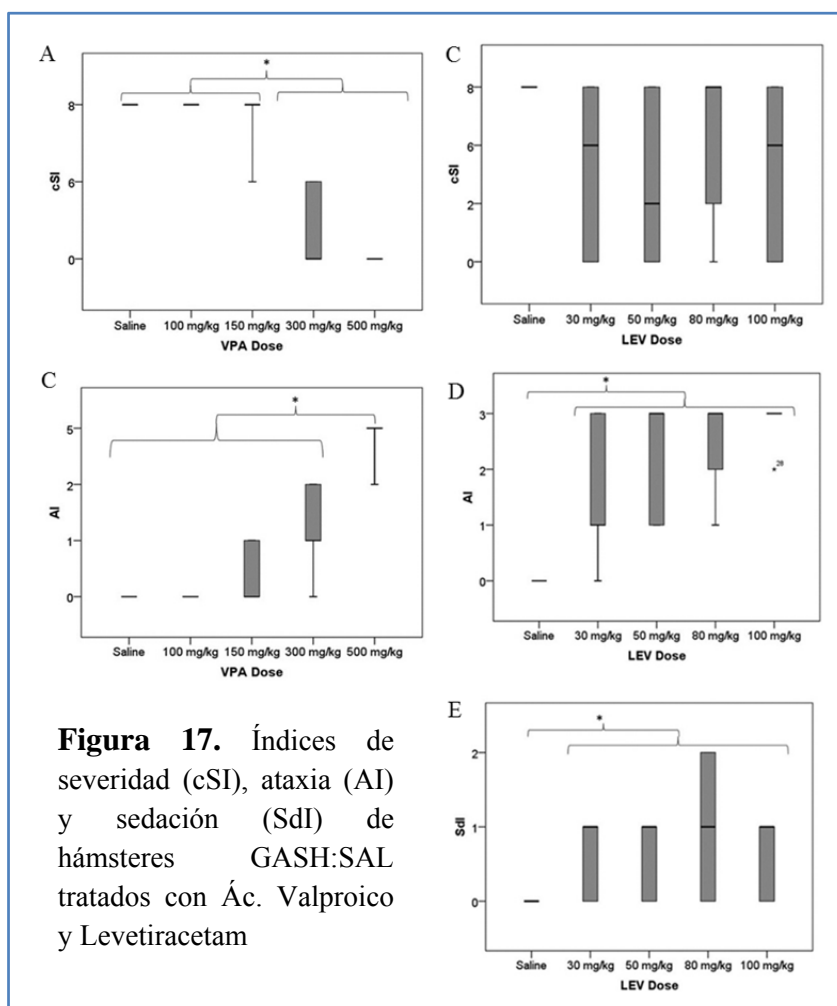


Figura 16. Índices de severidad y de ataxia de hámsters GASH:SAL tratados con Fenobarbital. A) Representación del índice de severidad de las crisis categorizado (cSI). B) Representación del índice de ataxia (AI) a diferentes dosis de Fenobarbital (PB).

En los animales con crisis, el PB disminuye la frecuencia y la correlación de los ítems exploratorios, mientras que en los animales con $cSI < 2$, la frecuencia de estos comportamientos aumenta. A partir de dosis de 10 mg/kg de PB, en los animales en los que se anula la crisis se observan caídas atáxicas (ATF), y a partir de los 15 mg/kg, se mantienen niveles altos de ataxia (figura 16). La semiología de la crisis se ve afectada desde la primera dosis, las correlaciones entre los comportamientos ictales disminuyen, y van desapareciendo las convulsiones tónico-clónicas hasta que, a los 15

mg/kg, sólo se observa carrera salvaje en los animales con $cSI \geq 2$. En los animales en los cuales se anuló la crisis, ésta fue remplazada por secuencias de items exploratorios y comportamientos de limpieza.

El VPA modificó levemente la semiología de la crisis (figura 15) hasta los 300 mg/kg, donde el 66% de los animales no tuvieron crisis. En el 33% de animales que mantuvieron las crisis, hubo menor gravedad convulsiva, y la crisis se vio fraccionada, presentado comportamientos exploratorios. Con dosis inferiores, el comportamiento en la fase pre-estímulo no varía, aunque se suma el ítem de parada, y desde los 150 mg/kg también se observan caídas atáxicas. La ataxia observada se incrementa considerablemente a los 300mg/kg, dosis en la que se inicia el efecto anticonvulsivo (Figura 17 A y B). Las crisis se anulan completamente con 500 mg/kg, donde la ataxia alcanza su mayor nivel.



El LEV, con las dosis más bajas, disminuye la frecuencia y correlación de los comportamientos exploratorios, pero los incrementa con las dosis más altas (figura 18). Con la primera dosis, disminuyen las correlaciones entre los ítems comportamentales durante la crisis, pero a medida que la dosis crece, en los animales que mantienen la crisis, las correlaciones aumentan otra vez. El número de comportamientos de limpieza se incrementa en relación directa con el incremento de la dosis. En la ventana correspondiente a la estimulación sonora, destaca la correlación encontrada entre el clúster de exploración y el de carrera salvaje. Se observan comportamientos orofaciales en la inmovilidad post-ictal. La presencia atáxica es dosis-dependiente, y los animales presentan niveles muy altos de sedación (figura 20 D).

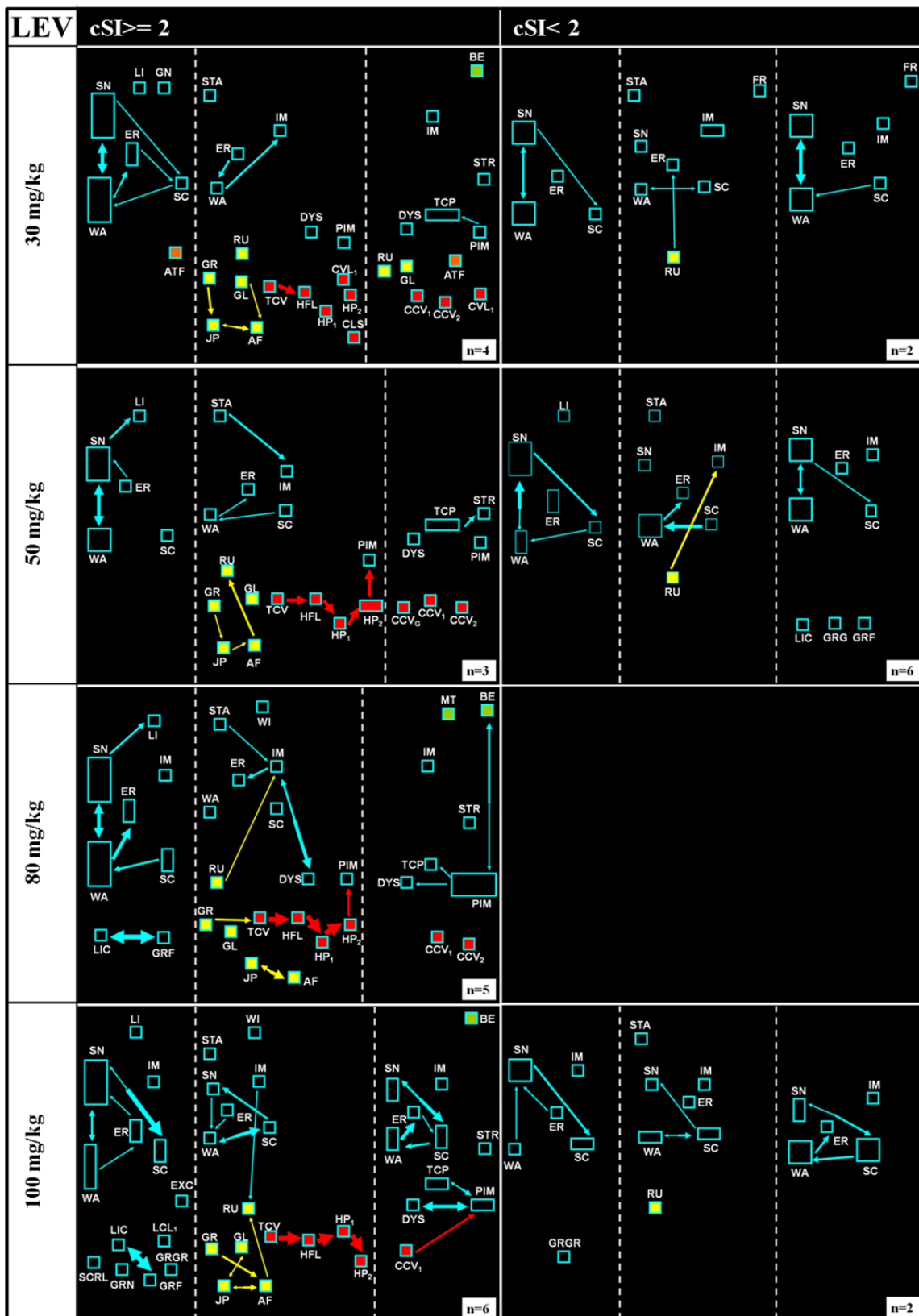


Figura 18. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Levetiracetam (LEV) vía i.p. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas.

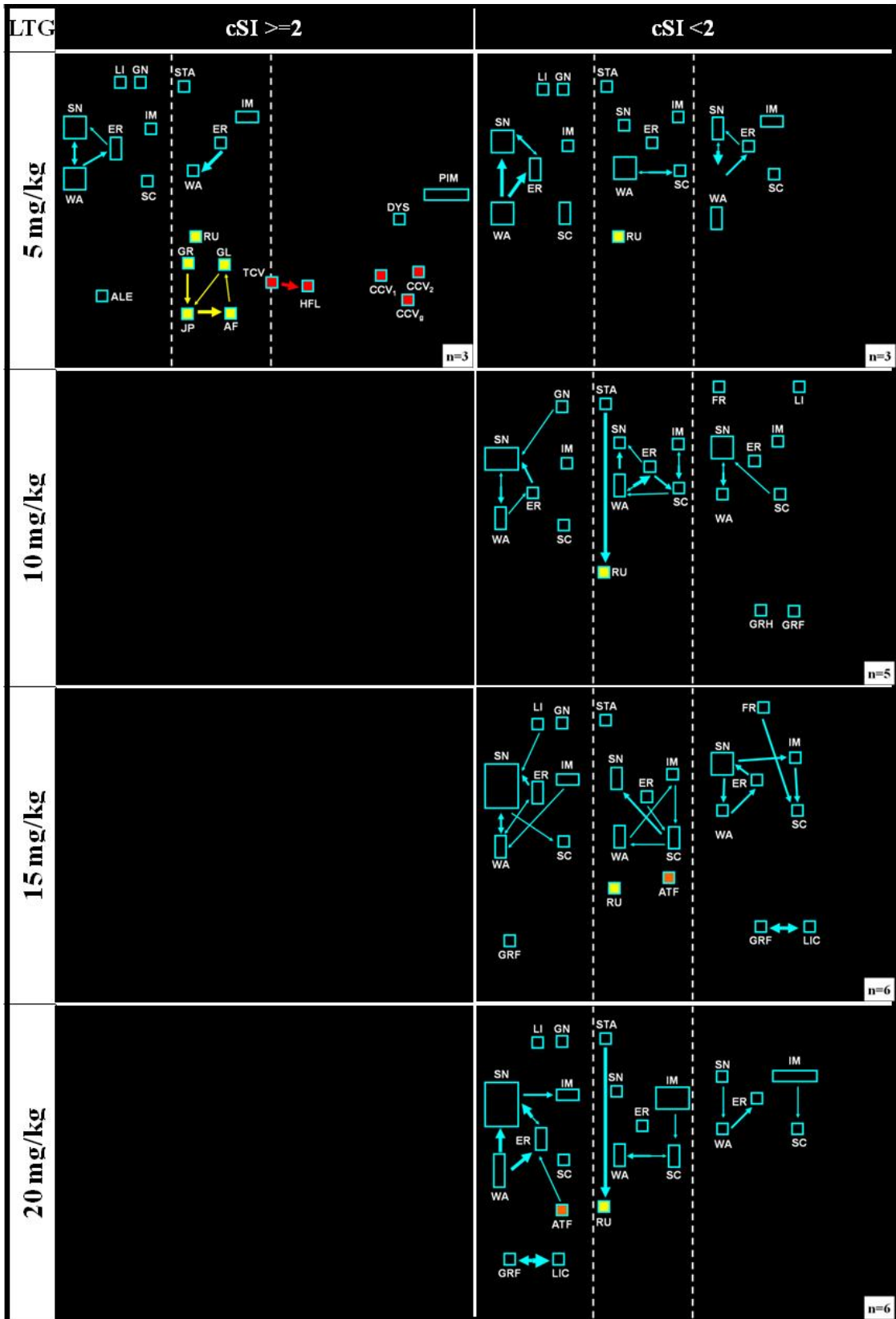


Figura 19. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Lamotrigina (LTG) vía i.p. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas.

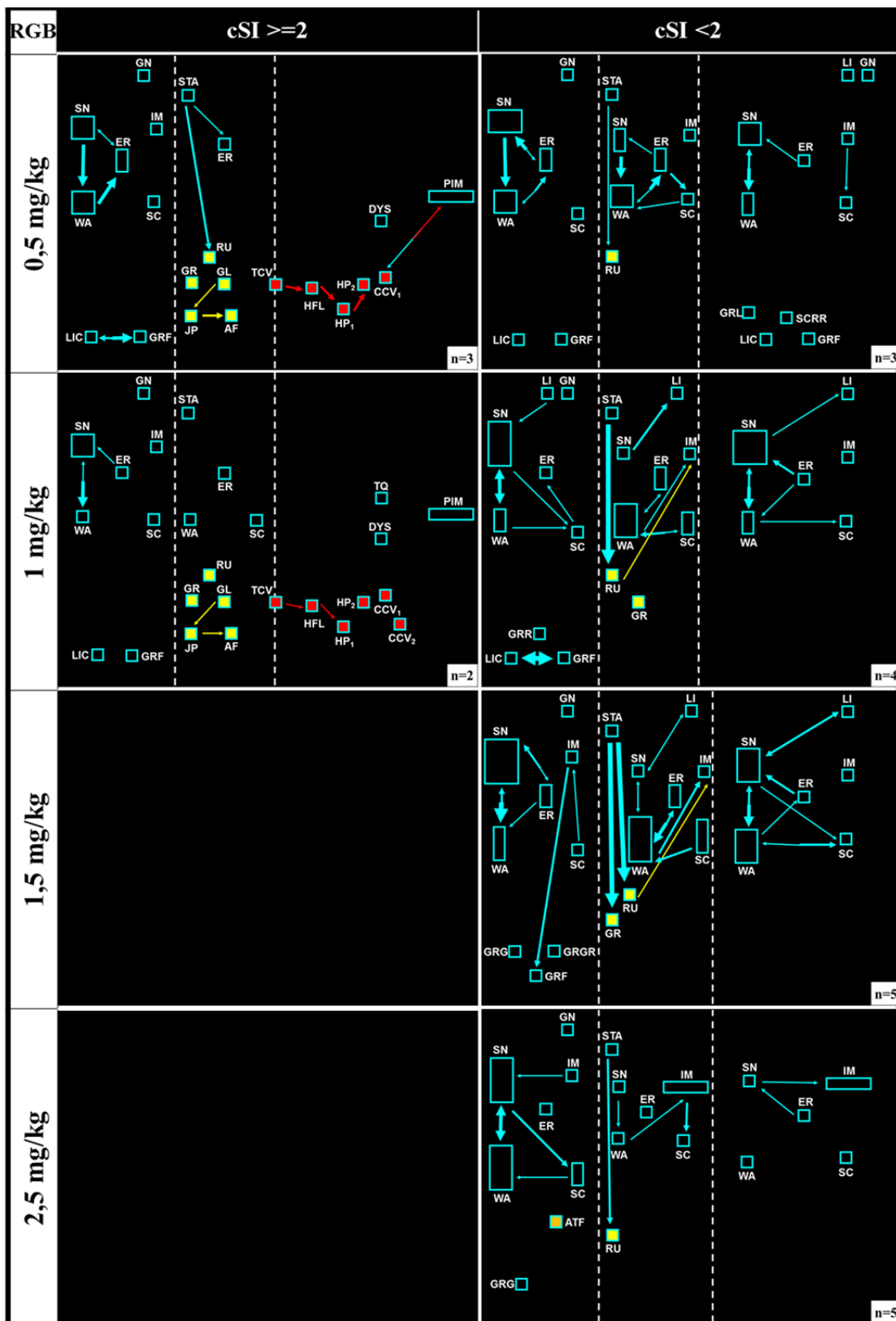


Figura 20. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con diferentes dosis de Retigabina (RGB) vía i.p. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas.

La LTG anula completamente la crisis a los 10 mg/kg, pero a partir de 5 mg/kg, los animales que mantienen la crisis ven disminuida su severidad, y no presentan hiperextensiones de los miembros en la fase tónico-clónica (figuras 19 y 21). En las tres ventanas aparecen comportamientos exploratorios, que tienden a disminuir en frecuencia y correlación, aunque, en algunos casos, se incrementa su duración. Con las dosis más altas, aumenta el número de caídas atáxicas. En general, con la LTG, la ataxia no es significativa, pero la sedación es muy alta en las dosis mayores (figura 21).

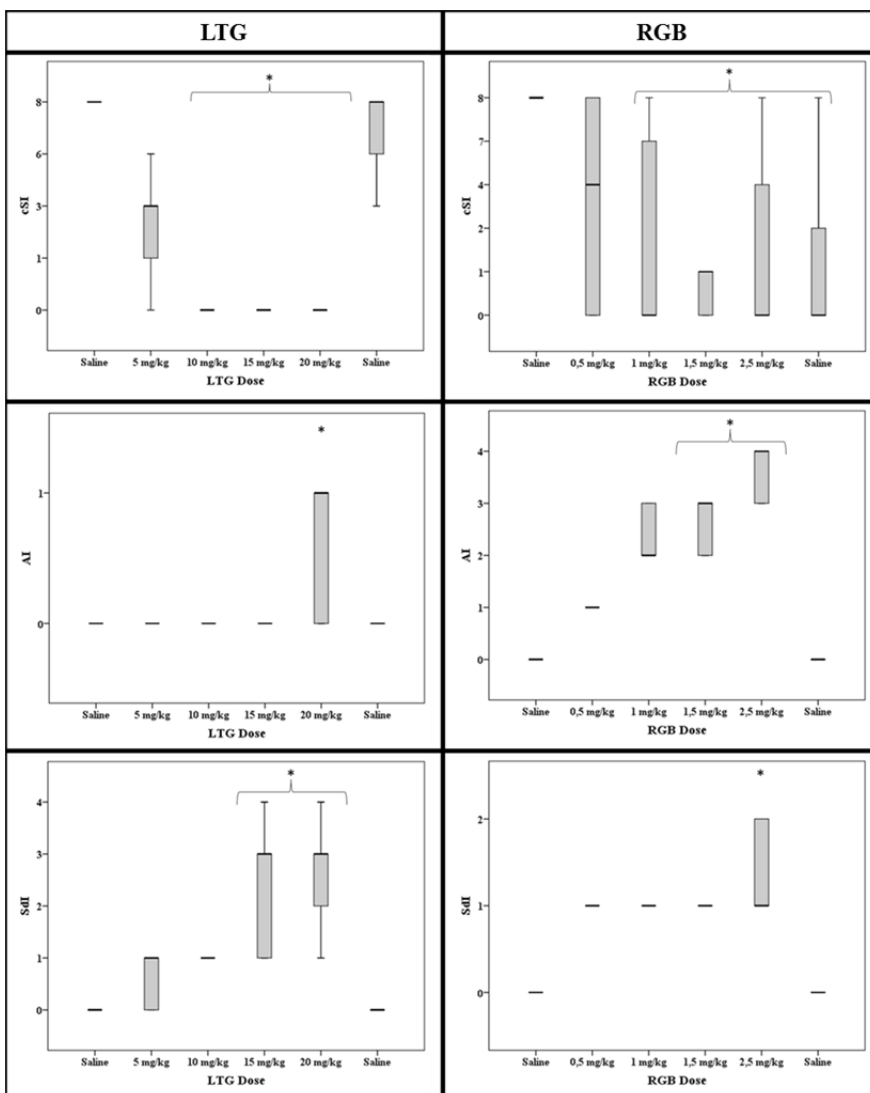


Figura 21. Índices de severidad (cSI), ataxia (AI) y sedación (SdI) de hámsteres GASH:SAL tratados con Lamotrigina (LTG) y Retigabina (RGB).

La RGB muestra efectos anticonvulsivos desde los 0,5 mg/kg, y provoca una disminución en la correlación de los comportamientos ictales y en la frecuencia y correlación de los clúster de exploración (Figura 20). En los animales en los que la crisis se ve anulada, predominan los comportamientos de exploración, y, a diferencia

de los otros fármacos estudiados, la frecuencia y correlación de los comportamientos es mayor a medida que aumenta la dosis. También aumentan los ítems de limpieza con la dosis, excepto con la dosis más alta, donde los niveles de ataxia y la presencia de sedación son muy altos (Figura 21).

Modificación de la semiología de la crisis tras administración crónica por vía oral de Fenobarbital, Ácido Valproico, Levetiracetam, Lamotrigina y Retigabina en el hámster GASH:Sal.

No se presentan los datos obtenidos en la primera parte de este estudio, en el que se administraron los FAE a un grupo de animales en el agua de la bebida, ya que no se obtuvieron datos ni de eficiencia anticonvulsiva, ni de modificación neuroetológica de las crisis, ni de presencia significativa del fármaco en sangre, por lo que inferimos la ineficacia de esta vía de administración.

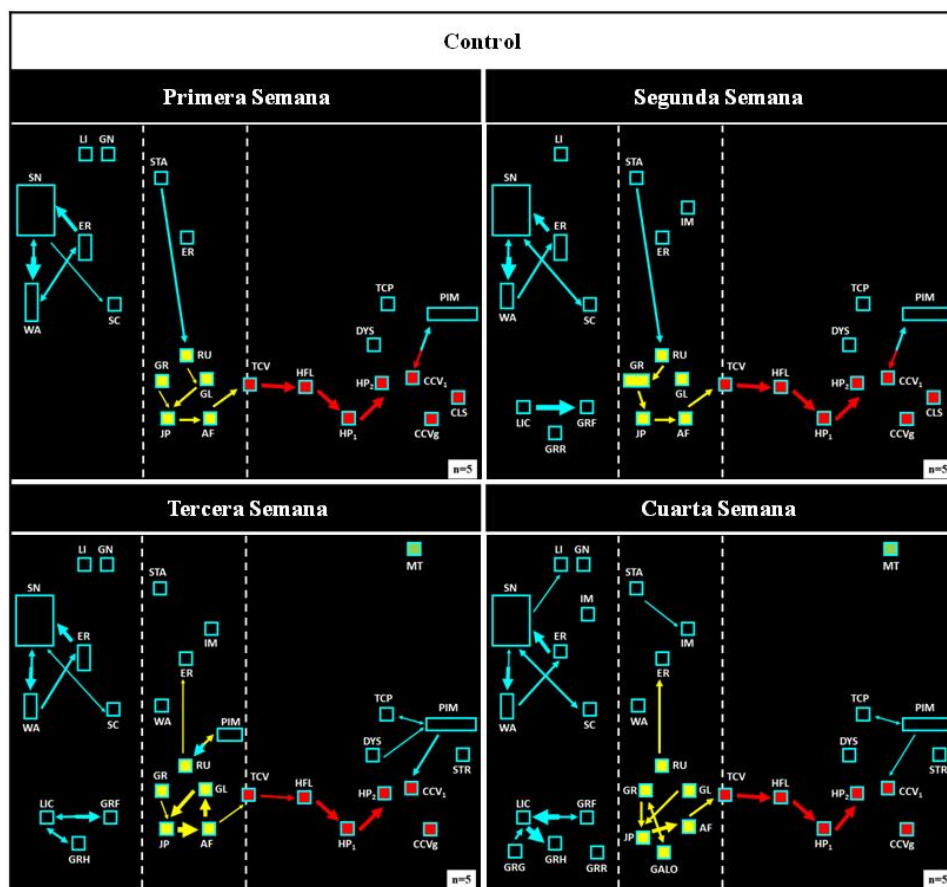


Figura 22. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal a lo largo de 4 semanas, recibiendo suero salino vía oral 2 veces/día.

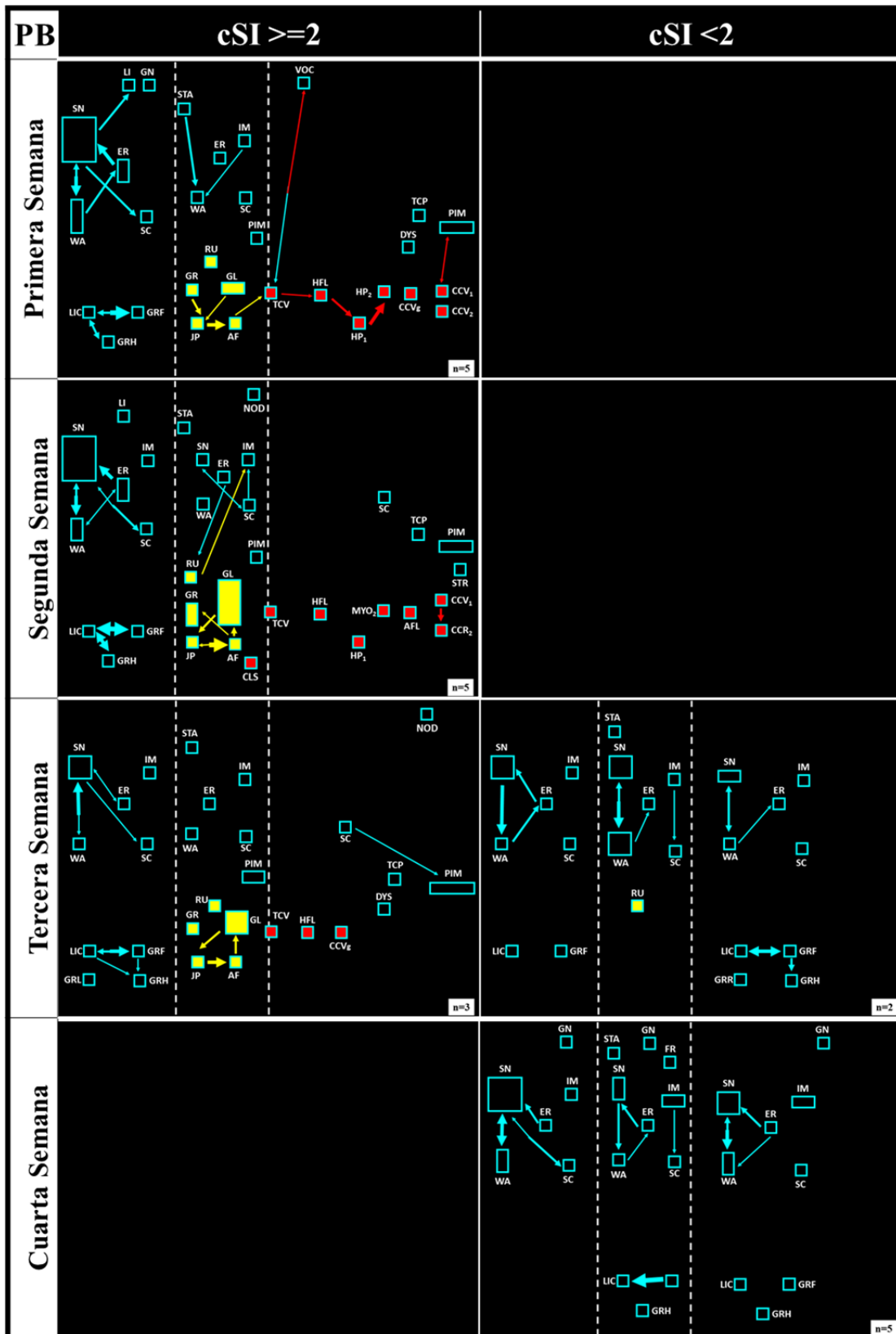


Figura 23. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados vía oral con 40 mg/kg/día de Fenobarbital durante la primera y segunda semana y 60 mg/kg/día durante la tercera y cuarta semana (n=5). Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas

En el segundo grupo, administramos de forma crónica y escalonada, por vía oral el FAE directamente en la boca con una pipeta, y obtuvimos los siguientes resultados.

En el grupo de GASH:Sal control (figura 22), a los que se administra vía oral suero salino 2 veces al día, no hay diferencias en la semiología de la crisis a lo largo de las 4 semanas, pero se pueden observar ligeras variaciones en la ventana pre-estímulo, con incrementos en algunos comportamientos de limpieza, y disminuciones en las acciones de roer y lamer.

Los únicos FAE estudiados que presentan eficacia anticonvulsiva después de la administración oral crónica son PB, a 60 mg/kg y LTG, a 25 mg/kg.

El PB (figura 23) con la dosis de 40 mg/kg/día, disminuyó la correlación de los comportamientos ictales, lo cual se compensó con un aumento en frecuencia y duración de los giros efectuados durante la carrera salvaje. A partir de la tercera semana, con la dosis de 60 mg/kg/día se observa una diferencia notable en la semiología, disminuyendo aún más las correlaciones entre los comportamientos ictales y los clúster de exploración. En la tercera semana, el 33,33% de los animales no sufre crisis al ser estimulados, y, en la cuarta, desaparece la crisis en el 100% de los animales. Se puede estimar que la DE_{50} oral se encuentra alrededor de 60 mg/kg/día. Desde el inicio del tratamiento, se observa una sedación intermedia, mientras que la ataxia aumenta en relación a la dosis (figura 25).

LTG muestra eficacia anticonvulsiva con 20 mg/kg/día en el 50 % de los animales (figura 23). Al incrementar la dosis hasta 25 mg/kg/día, el porcentaje de animales con crisis disminuye, y, en la última semana, no hay presencia de crisis en el 100% de los animales. Con la primera dosis, los animales con un $cSI \geq 2$ muestran todos los componentes de la crisis, pero con una correlación débil, y pueden sufrir convulsiones tónico-clónicas que no derivan en hiperextensiones. Con la dosis de 25 mg/kg/día, los comportamientos exploratorios son opuestos en los animales con un $cSI \geq 2$, donde disminuyen en frecuencia y duración, frente a los animales con un $cSI < 2$, en los que estos comportamientos aumentan en correlación y frecuencia, junto con el clúster de limpieza. Los niveles de ataxia y sedación son intermedios, en relación a los otras FAE (figura 28).

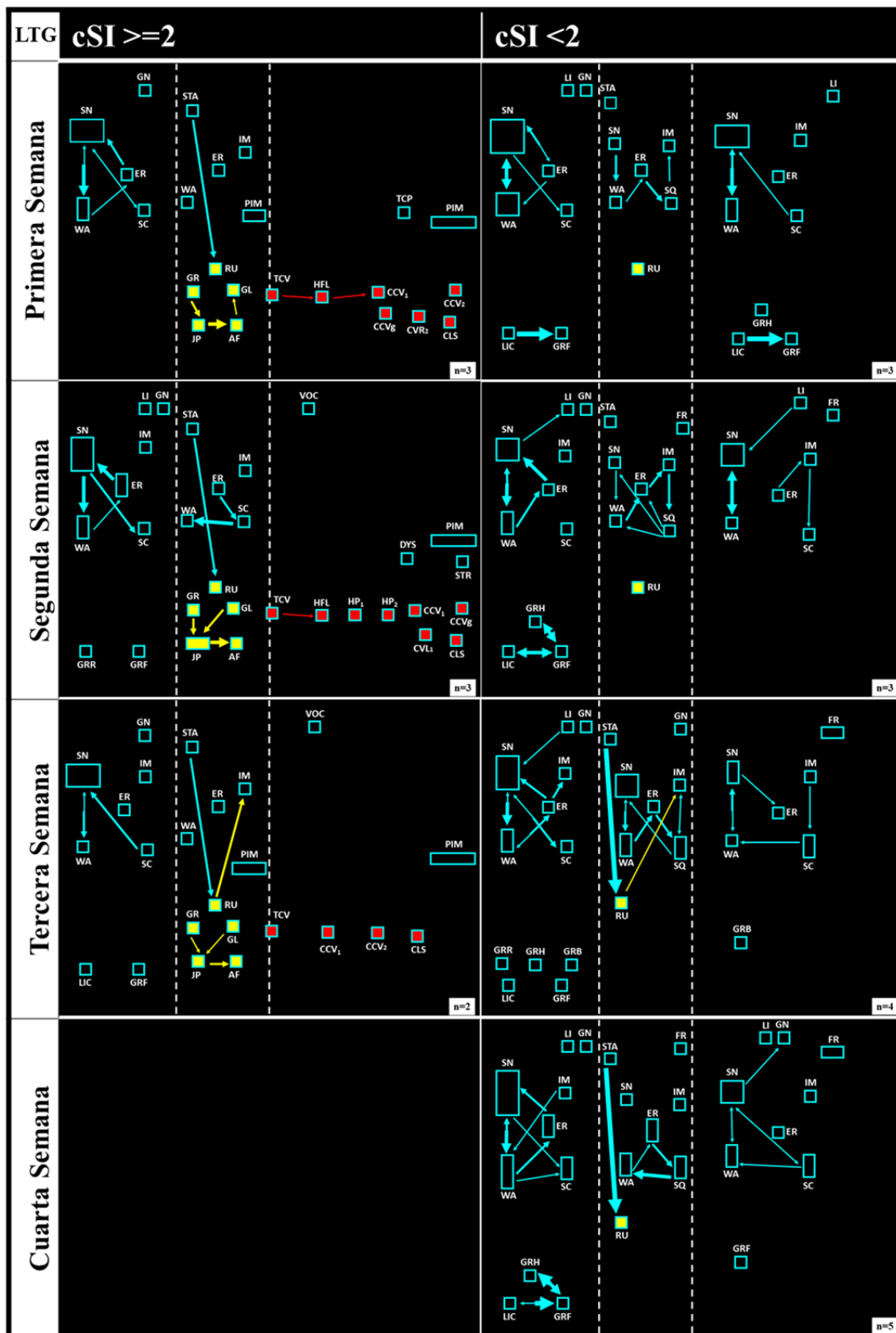


Figura 24. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal tratados con 20 mg/kg/día de Lamotrigina (LTG), durante la primera y segunda semana, y con 25 mg/Kg/día durante la tercera y cuarta semana. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas

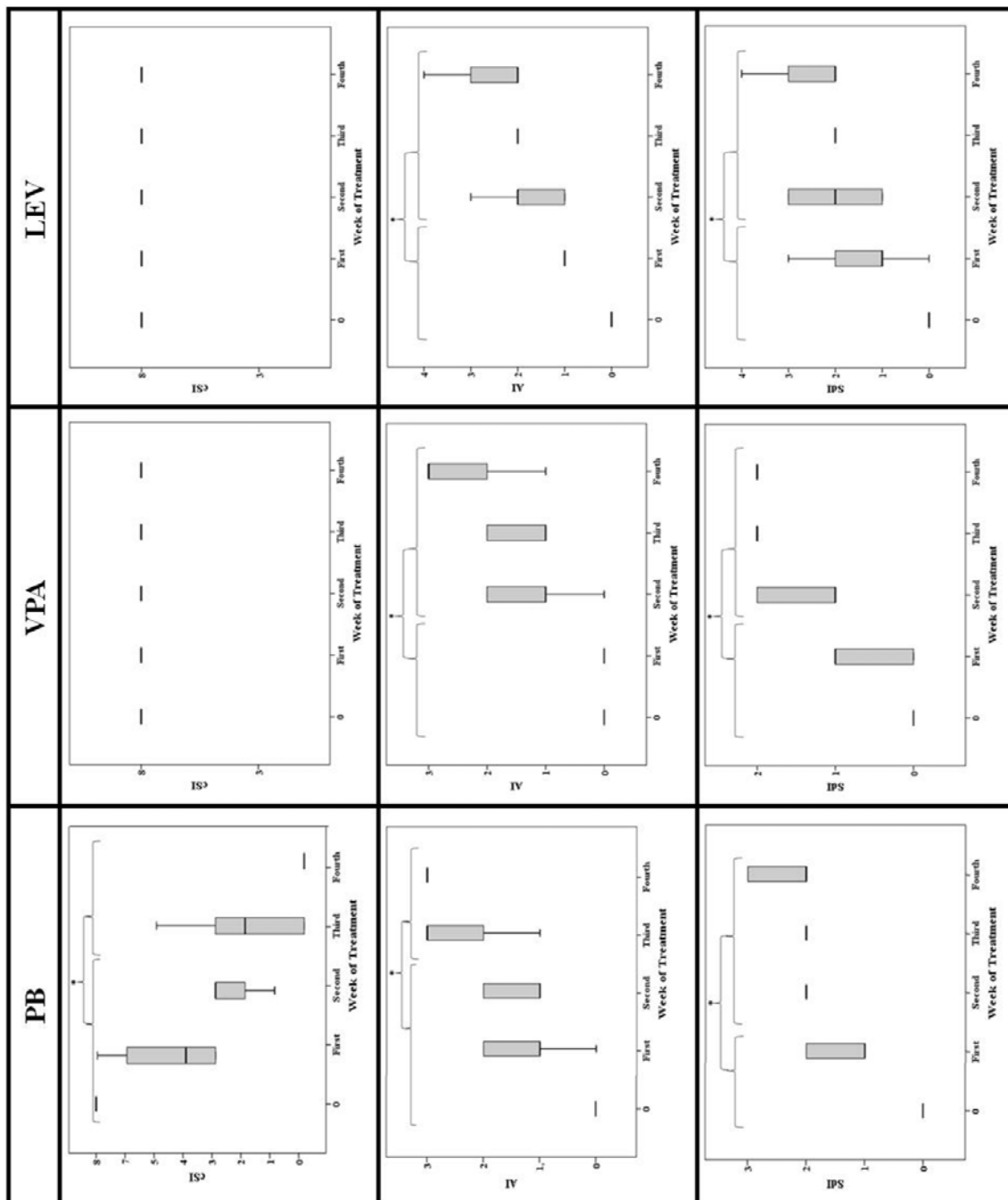


Figura 25. Índices de severidad (cSI) , ataxia (AI) y sedación (SdI) de hámsters GASH:SAL tratados vía oral durante 4 semanas con Fenobarbital (PB) (40 mg/kg/día, 1ª y 2ª semana; 60 mg/kg/día, 3ª y 4ª semana) Ác. Valproico (VPA) (300 mg/kg/día, 1ª y 2ª semana; 600 mg/kg/día, 3ª y 4ª semana); Levetiracetam (LEV) (100 mg/kg/día, 1ª y 2ª semana; 150 mg/kg/día, 3ª y 4ª semana).

En el tratamiento con VPA no se producen efectos anticonvulsivos, pero sí encontramos niveles muy altos de ataxia, que se incrementa con el tiempo y con la dosis (figura 25). A partir de la tercera semana, con la dosis a 600 mg/kg/día, en la ventana del estímulo, se pierde la relación directa entre el sobresalto y la carrera salvaje, y la carrera salvaje incrementa la correlación entre sus items. No se observan diferencias en los comportamientos ictales, aunque se ven incrementados los comportamientos de limpieza en la ventana pre-estímulo (figura 26A).

El LEV no presentó diferencias en los comportamientos exploratorios inter-crisis ni en la crisis (figura 26B). Aun así, encontramos los valores más altos de ataxia y sedación, valores que se van incrementado a lo largo de las semanas (figura 25).

La RGB no presento ningún cambio comportamental, inter-crisis o ictal (figura 27), y mostró muy pocos efectos secundarios a lo largo de la administración crónica (figura 28).

Finalmente, para observar los cambios sobre el peso de los animales que los FAE pudieran ejercer, pesamos los animales cada tres días. Los animales tratados con PB, LEV, LTG y RTG, no se vieron afectados en el crecimiento, pero el VPA generó fluctuaciones en el peso de los animales, especialmente con la dosis más alta empleada (figura 29).

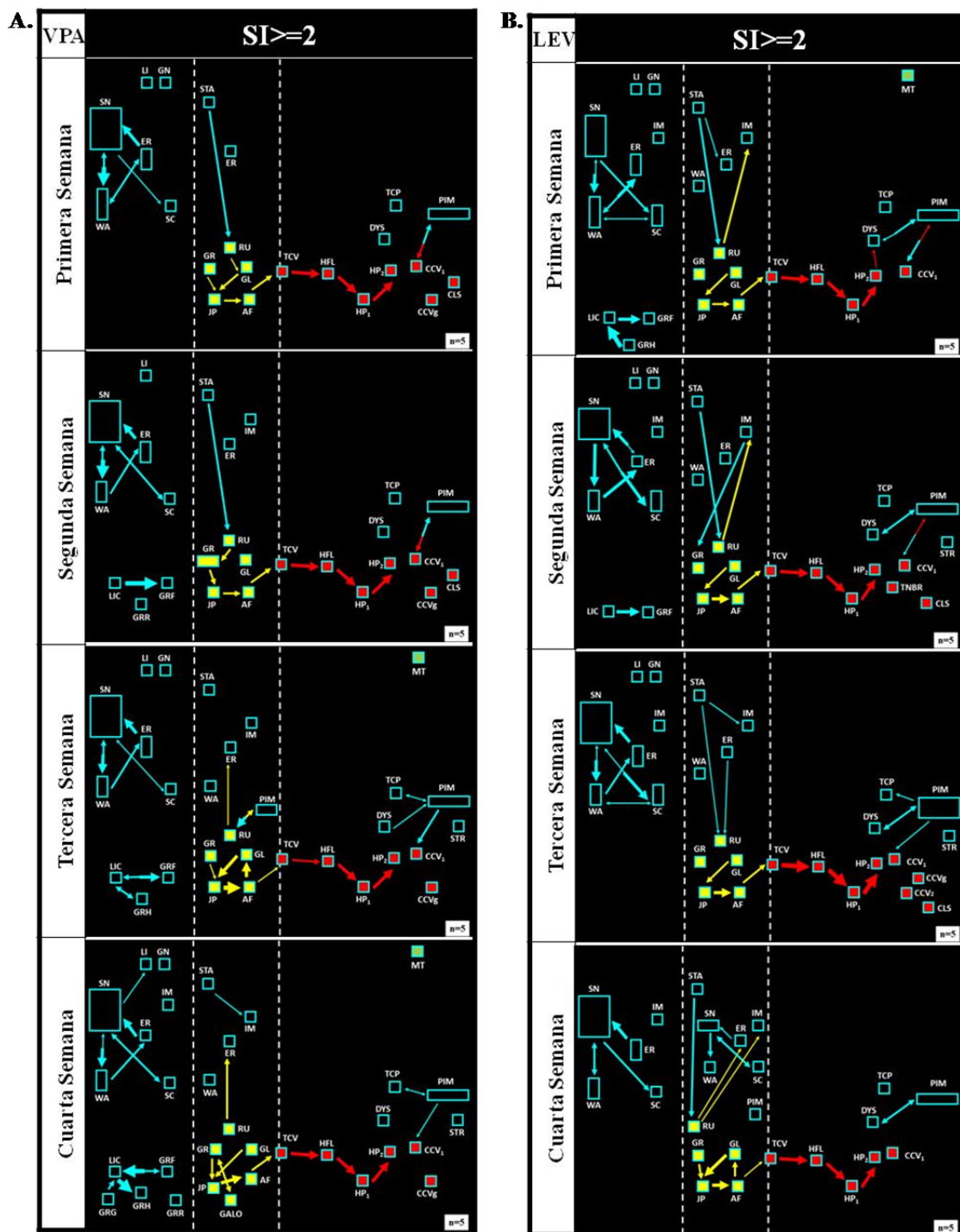


Figura 26. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal. A). Tratados con 300 mg/kg/día de ácido Valproico (VPA) durante la primera y segunda semana, y con 600 mg/Kg/día durante la tercera y cuarta semana (n=5). B). Tratados con 100 mg/kg/día de Levetiracetam (LEV) durante la primera y segunda semana, y con 150 mg/Kg/día durante la tercera y cuarta semana (n=5), Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas

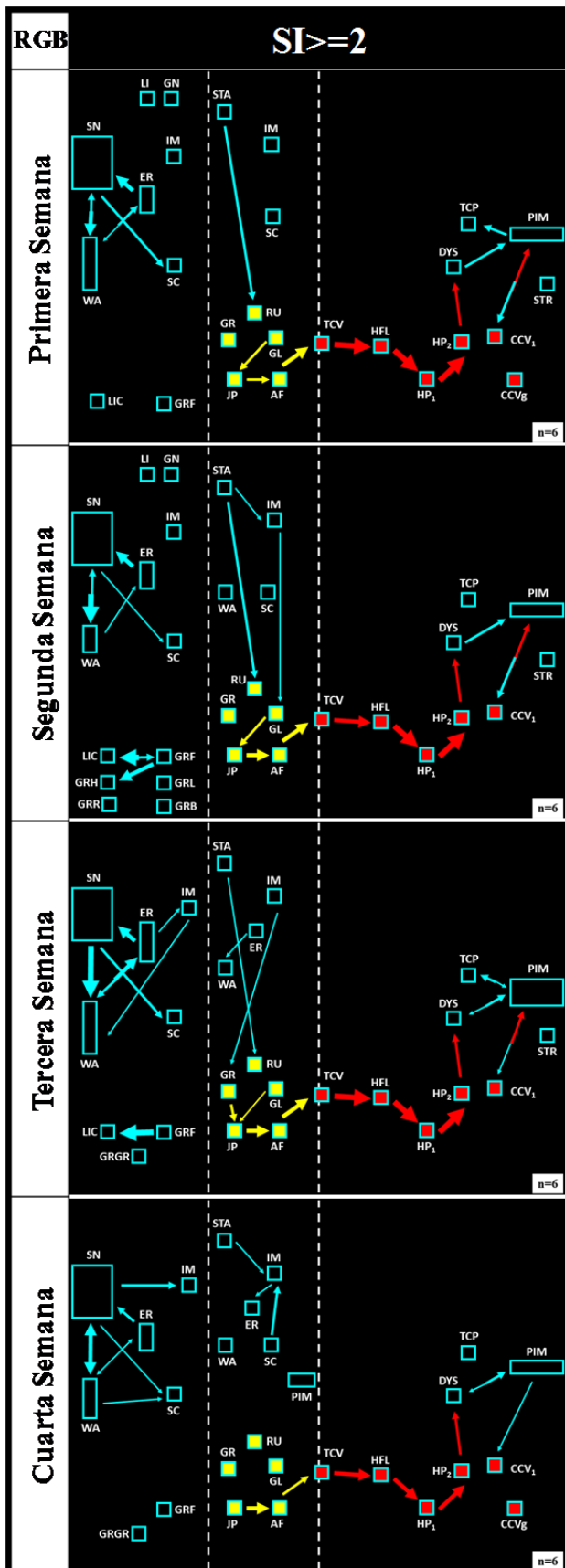


Figura 27. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de los GASH:Sal Tratados con 6 mg/kg/día de Retigabina (RGB) durante la primera y segunda semana, y con 12 mg/Kg/día durante la tercera y cuarta semana. Abreviaturas: cSI: índice de severidad categorizado. Ver resto de abreviaturas en el listado de abreviaturas

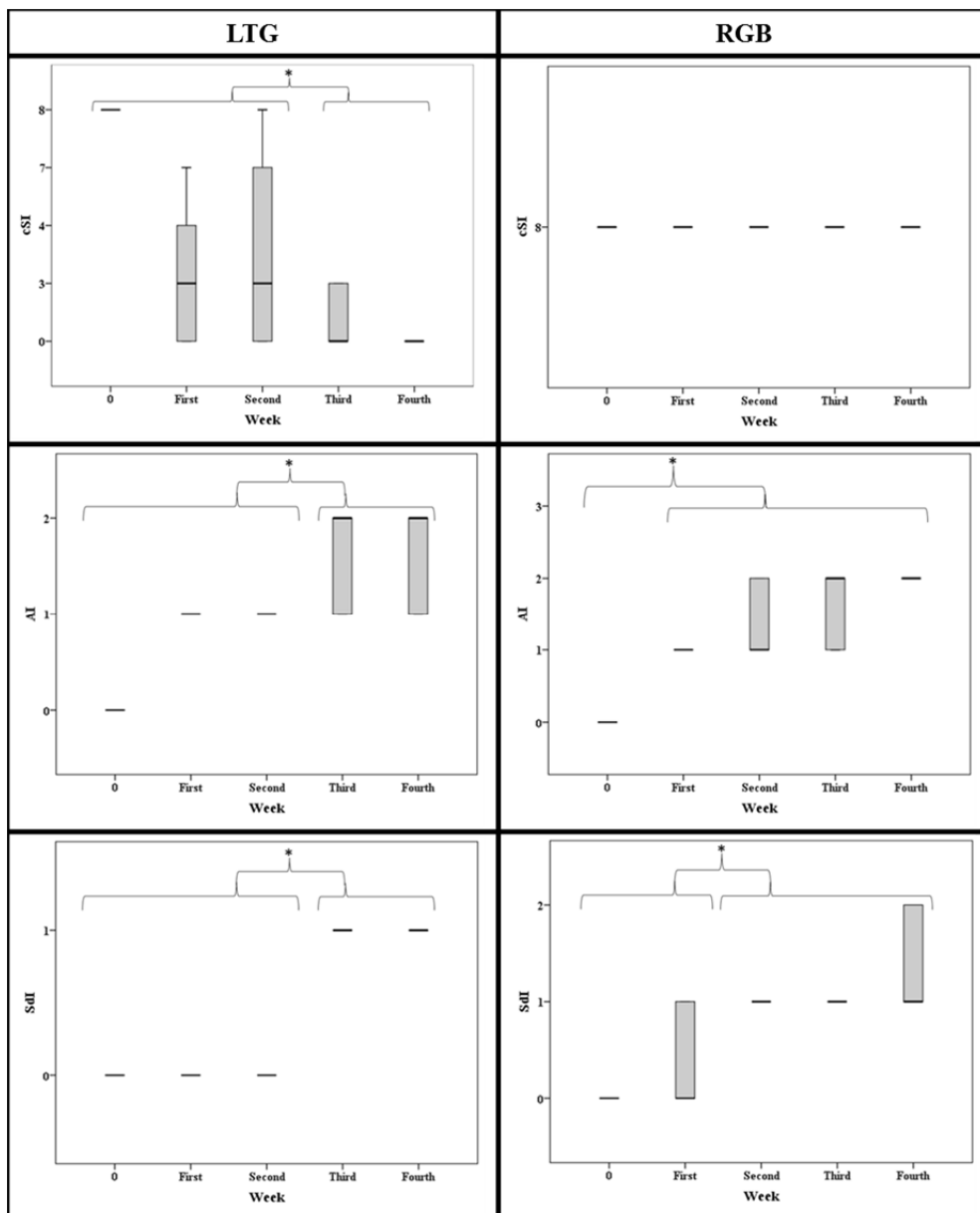


Figura 28. Índices de severidad (cSI) , ataxia (AI) y sedación (SdI) de hámsteres GASH:SAL tratados 4 semanas con Lamotrigina (LTG) (20 mg/kg/día, 1^a y 2^a semana; 25 mg/kg/día, 3^a y 4^a semana) y Retigabina (RGB) (6 mg/kg/día, 1^a y 2^a semana; 12 mg/kg/día, 3^a y 4^a semana).

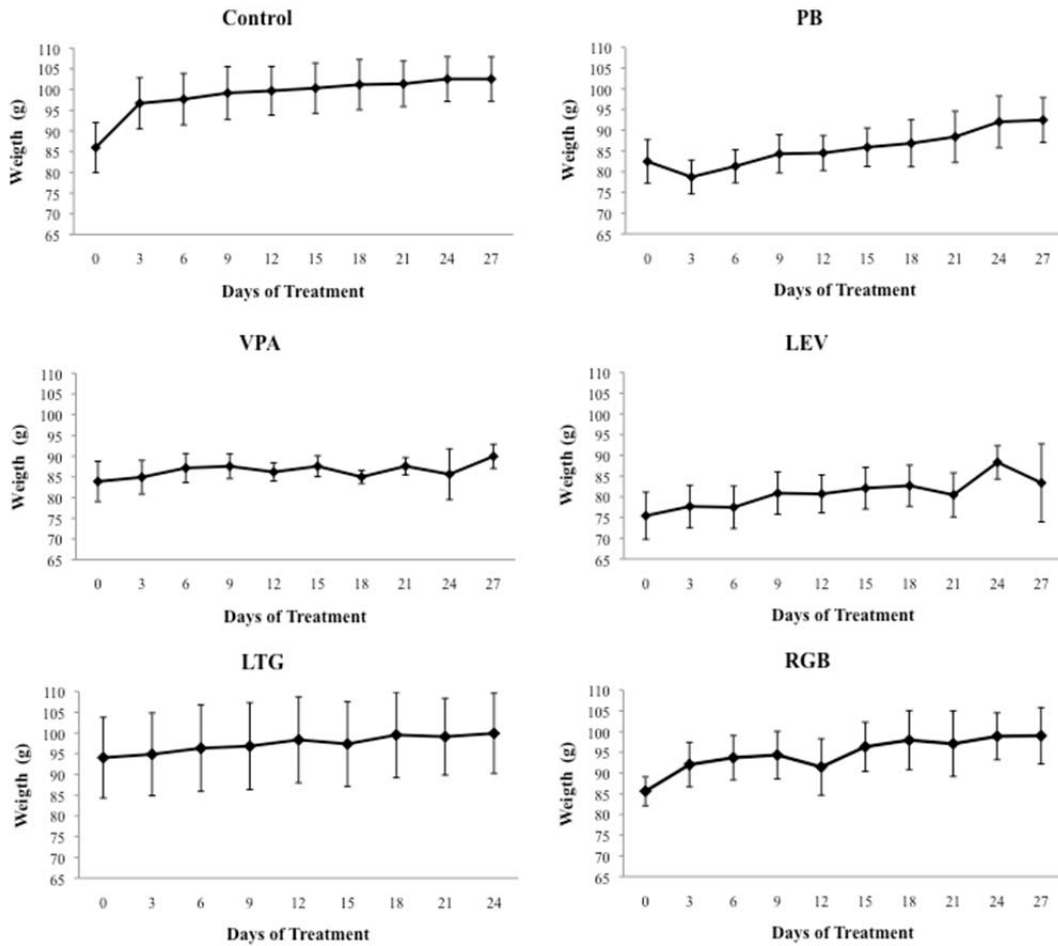


Figura 29. Curvas ponderales de los animales control y tratados con fármacos antiepilépticos. Abreviaturas: Fenobarbital (PB); Ác. Valproico (VPA); Levetiracetam (LEV); Lamotrigina (LTG); Retigabina (RGB).



(Del comic: "Epiléptico: la ascensión del Gran Mal". David B.)

Discusión

La epilepsia es el segundo desorden neurológico en el mundo después de los accidentes cerebrovasculares, y, a pesar de ser una de las enfermedades más estudiadas en todos los tiempos, no se ha logrado conocer por completo. Una de las herramientas más importantes para el estudio básico de los procesos ictales y su tratamiento son los modelos animales. En la actualidad, existe una gran variedad de modelos de crisis y de epilepsias, y dependiendo del estudio que deseemos realizar, se va a necesitar un tipo de modelo u otro.

Una de las líneas más amplias en la investigación de epilepsia es el descubrimiento y evaluación de fármacos antiepilépticos (FAE), en la que el uso de modelos animales es una herramienta clave (Contreras, 2000; García y cols., 2010). Pero la mayoría de estos fármacos se prueban sobre modelos animales convencionales, particularmente sobre modelos de crisis convulsivas agudas. En estos modelos, las crisis se inducen en un animal sin patología, generalmente en una sola sesión por medios físicos o químicos (Prince y Farrell, 1969). Este tipo de modelos es útil para estudiar algunos mecanismos de actividad epiléptica (Engel y Schwartzkroin, 2006; Fisher, 1989), el problema está en que al ser modelos de crisis y no de epilepsia, realmente evalúan la capacidad anticonvulsiva de los FAE, pero no su eficacia antiepiléptica. Además, al tratarse de animales sanos que simulan crisis generadas artificialmente, no reflejan gran parte de otras epilepsias, como las genéticas, que pueden tener un sustrato ictogénico diferente. Asimismo, en el caso de utilizar modelos de inducción química, no se pueden descartar interacciones entre los FAE y la droga epileptógena.

Por otra parte, están los modelos de epilepsia que facilitan el estudio de los procesos de epileptogénesis, así como las consecuencias derivadas de la actividad epiléptica persistente. Cada vez más, se intentan desarrollar este tipo de modelos, entre ellos los genéticos (Contreras, 2000; Cabo de la Vega y cols., 2006; Rogawski y Bazil, 2008; Löscher, 2011) como herramienta de identificación de mecanismos celulares y moleculares de la epilepsia, que permitan descubrir nuevas dianas terapéuticas (Löscher, 2002; Pitkanen y cols., 2007). En este sentido, hay que señalar que en los últimos tiempos, y, gracias a la aparición de nuevos modelos experimentales y de

modernas técnicas moleculares y anatómicas, los nuevos FAE se dirigen a dianas más precisas, y se presentan como tratamientos útiles para todo tipo de epilepsias (Rogawski y Bazil, 2008).

Con respecto al tipo de crisis modelado, la mayoría de los modelos existentes lo hacen sobre crisis focales (Sayin y cols., 2003), mientras que los modelos de crisis generalizadas tienen una estrecha vinculación con la susceptibilidad genética, encontrándonos con modelos modificados genéticamente (transgénicos) (Singh, 1998; Noebels y cols., 1990).), y modelos genéticamente epileptógenos, como el hámster GASH:Sal, entre otros (Buchhalter, 1993; Noebels, 1999). Löscher (2002) sugiere que los modelos surgidos de una mutación espontánea, como es el caso de los modelos de crisis audiogénicas, son preferibles para el desarrollo de nuevos FAE, y que los modelos a utilizar en el estudio de FAE deben ser fáciles de manejar, eficientes en costo y tiempo, y con una actividad clínica predecible, características que el GASH:Sal cumple. El modelo utilizado en este estudio, el hámster GASH:Sal, presenta crisis epilépticas audiogénicas de origen genético, cuya susceptibilidad se transmite según un patrón de herencia autosómica recesiva (Muñoz de la Pascua y López, 2005). Las crisis en el hámster GASH:Sal han mostrado características comportamentales similares a las de otros modelos audiogénicos como son las “Wistar Audiogenic Rat” (WAR), las “Genetically epilepsy-prone rat” (GEPR) y los ratones “Dilute Brown Non-Aguti/J2” (DBA/J2) (Collins y cols., 1970; Seyfried y Glaser, 1985; Ross y Coleman, 2000), aunque presentan ventajas frente a estos modelos, ya que prácticamente todos los animales, una vez cumplidos los dos meses de edad, presentan crisis convulsivas generalizadas en respuesta al estímulo sonoro (Muñoz de la Pascua y López, 2005).

La patología espontánea presente en los GASH:Sal, causada por el desenmascaramiento de genes recesivos en los cruces endogámicos, como modelo, es más fácil de equiparar a los fenómenos epilépticos causados por mutaciones aleatorias que surgen *de novo* en el humano. Al tener este modelo las crisis convulsivas audiogénicas de naturaleza epileptiforme (Carballosa- González y cols., 2013), podemos utilizar estos animales como modelo experimental de síndromes epilépticos de carácter reflejo. Por otro lado, podemos reproducir los episodios ictales de forma muy

estable e independientemente de factores fisiológicos secundarios, pudiendo emplearlo para validar fármacos antiepilépticos sin que existan interferencias químicas.

Hay claramente una escasez de investigación inicial básica con FAE en modelos animales adecuados para valorar su eficacia y seguridad (Glaser y cols., 2006), que se hace extensiva a la problemática observada en la clínica como es la refractariedad al tratamiento farmacológico de algunos pacientes (25-30%) (French, 2007), la ineficacia en el tratamiento a largo plazo (Torres-Zambrano y cols., 2007), la politerapia (Armijo y Herranz, 2007) y la elevada prevalencia de toxicidad de muchos FAE (Warner y cols., 1992). Parte de estos problemas podrían ser solventados con la utilización de mejores modelos animales en la investigación preclínica.

Para la validación farmacológica de la línea del hámster GASH:Sal como modelo de epilepsia, hemos determinado los efectos en este animal de diferentes fármacos antiepilépticos clásicos y de nueva generación, tanto en administración aguda como crónica.

El hámster es una especie poco utilizada en este tipo de investigación farmacológica, por lo que no están definidas las características farmacocinéticas de la mayoría de los fármacos.

En nuestro estudio, valoramos la eficacia de los FAE, no sólo por la capacidad de anular las crisis en respuesta a un estímulo sonoro, sino también analizando las modificaciones comportamentales que provoca el fármaco. La evaluación comportamental de las convulsiones experimentales se ha hecho habitualmente mediante escalas que miden la severidad de las crisis, mejoradas recientemente con otras que miden específicamente comportamiento, como es el índice audiogénico de Jobe y cols., (1981), que permite correlacionar estas medidas con otros componentes de las crisis. El uso de una herramienta neuroetológica, como la que utilizamos en nuestro estudio, nos permite ir más allá y realizar un análisis cuantitativo de todos los comportamientos epilépticos (García- Cairasco y cols., 1992). Esto nos brinda la posibilidad de una mejor aproximación al estudio de la epilepsia, aportando además una visión general y compleja del conjunto de comportamientos relacionados con el

evento ictal que estamos analizando. Otra ventaja del análisis neuroetológico es la posibilidad de analizar parámetros de toxicidad, como ataxia o sedación, por separado, a diferencia de su valoración con el aparato de rotarod, utilizado habitualmente al efecto (Aslam y cols., 2011), e identificar otros efectos adversos difíciles de valorar por otros medios. Además, el análisis de los flujos comportamentales, nos permite ver las modificaciones que provocan los fármacos administrados, tanto en la semiología de la crisis, como en el comportamiento inter-crisis.

Antes de iniciar el estudio farmacológico caracterizamos comportamentalmente al GASH:Sal en un grupo de animales sin tratamiento farmacológico, al objeto de comparar con los cambios provocados por los FAE, y observar si se encontraban componentes de kindling, consecuencia de las estimulaciones consecutivas. Se observó en el comportamiento inter-crisis que los animales tienen una alta actividad, sin momentos de inmovilidad, lo que está relacionado con el comportamiento ansioso típico de la especie (Salvador y cols., 2008). Los ítems comportamentales mas frecuentes son el oler, el caminar y la postura erecta, los cuales no varían después en los estímulos consecutivos. En cuanto a las crisis, no se observaron diferencias en las distintas estimulaciones, excepto un mínimo incremento en el tiempo de duración de la latencia previo a la carrera salvaje. Este patrón de crisis que se mantiene en estímulos consecutivos, debe asociarse a una mutación estable asociada a los circuitos epilépticos (Muñoz de la Pascua y López, 2005). Al no observarse elementos de kindling, la interpretación del comportamiento de los animales tratados con los FAE no se ve afectada, por lo que las apariciones o variaciones de ítems comportamentales se determinan como consecuencia del efecto farmacológico.

En nuestro trabajo, hemos observado diferencias esperables entre la eficacia de los FAE en el tratamiento agudo y crónico sobre los GASH:Sal. En el caso de la administración aguda de FAE, la respuesta fue la previsible, teniendo en cuenta su comportamiento en otros modelos y las características farmacocinéticas específicas de la especie animal (Barcia y cols., 1999; Bialer M., 2002; Gilbert y cols., 2002; Gilbert y Teskey, 2007; Porter y cols., 2007; Rostock y cols., 1996; Silva Brum y Elisabetsky, 2000; Silver y cols., 1991; Stefan y Feuerstein, 2007; Tober y cols., 1996).

Cuando analizamos el efecto anticonvulsivo tras la administración intraperitoneal de dosis únicas de los fármacos antiepilépticos en el hámster GASH:Sal, la RGB es el FAE más potente de los ensayados, comparando las DE_{50} de todos ellos en su tiempo de efecto máximo.

En nuestro modelo, Fenobarbital presenta eficacia anticonvulsiva sobre las crisis generadas por un estímulo sonoro, con una DE_{50} de 10 mg/kg i.p., que es un valor intermedio si lo comparamos con las DE_{50} encontradas en otros modelos, como por ej. 9 mg/kg, i.p., en un modelo de *Maximal electroshock seizure* (MES) en rata, hasta 21,8 mg/kg, en ratón (Bialera y cols., 2004). La toxicidad de PB se tradujo en ataxia con dosis altas, aunque no apareció sedación

El VPA se comporta en nuestra línea de forma similar a lo descrito en otros estudios en hámster, y presenta niveles de fármaco libre mucho más altos que en humanos (Nau, 1986). El VPA presenta unos valores en la DE_{50} en ratones con crisis audiogénicas (155 mg/kg,i.p.) (Bialera y cols., 2004) similares a los encontrados en nuestro modelo, que alcanzan los 225 mg/kg,i.p. Es, por tanto, un fármaco eficaz para controlar las convulsiones tónico-clónicas, a pesar de que algunos estudios (Löscher y Schmidt, 2006) afirman que el VPA ejerce mayor protección frente a las convulsiones provocadas por el modelo de Pentilinetetrazol (PTZ) (modelo de crisis de ausencia) que por MES (modelo de crisis generalizadas tónico-clónicas). Con dosis altas de 300 mg/kg, cuando muestra actividad anticonvulsiva en la mayoría de los animales, aparece ataxia en niveles altos. Esto parece confirmar una característica de este fármaco, ya que gran parte de los estudios en rata y ratón indican una baja neurotoxicidad del VPA (Chapman y cols., 1982; Abbott y Acheampong, 1988; Löscher y cols., 1984).

El Levetiracetam no mostró un efecto anticonvulsivo dosis-dependiente en el estudio agudo, como sí hace en modelos de crisis audiogénicas en ratón, en los que suprime la carrera salvaje y las convulsiones tónico- clónicas, con una DE_{50} entre 40 y 96 mg/kg, i.p. (Gower y cols., 1995), en el rango de las determinadas por nosotros en el hámster. En ratas con crisis audogénicas el efecto anticonvulsivo de LEV es dosis-independiente (Gower y cols., 1995), de forma similar a lo sucedido en el hámster

GASH:Sal. Otros autores describen dosis mucho más altas de LEV (>500 mg/kg,i.p) (Bialer y cols., 2004) en modelos similares para lograr protección anticonvulsiva. En cuanto a los efectos adversos, el LEV generó sedación y ataxia en nuestro modelo, lo que no sorprende, porque la somnolencia y la sedación suelen ser reportados como efectos relacionados con este FAE.

Lamotrigina presenta una eficacia anticonvulsiva en el modelo GASH:Sal, en el rango de las dosis descritas en modelos de epilepsia en roedores (Bialer y cols., 2004). En la mayoría de los modelos animales de crisis epilépticas, Lamotrigina ejerce actividad anticonvulsiva en dosis de 2-20 mg/kg, i.p. (Goa y cols., 1993), similares a las empleadas en nuestro modelo. En ratas y ratones, pueden apreciarse, además de la disminución en la actividad motora y ataxia, efectos adversos comportamentales a dosis altas (> 80 mg / kg), muy alejadas de las dosis anticonvulsivas, lo que indica una gran ventana terapéutica para este fármaco (Miller y cols., 1986). LTG presenta muy baja toxicidad neurológica en nuestro modelo, con pocos efectos de ataxia y sedación a las dosis utilizadas, tanto por vía oral como intraperitoneal, datos acordes con los hallazgos descritos en otros roedores (Miller y cols., 1986).

Retigabina ha demostrado ejercer una potente actividad anticonvulsiva, dosis-dependiente en distintos modelos de epilepsia (Porter y cols., 2007). En el hámster GASH:Sal, ha sido el FAE con mayor potencia anticonvulsiva, y con un comportamiento muy bueno en relación a la incidencia y severidad de efectos adversos. Llama la atención el efecto óptimo de este fármaco en un modelo como el nuestro de crisis generalizadas, dado que en la clínica se muestra más eficaz frente a las crisis parciales (Rogawski y cols., 2009).

En resumen, podemos confirmar que los FAE utilizados fueron anticonvulsivos eficaces frente a las crisis audiógenas en el modelo GASH:Sal. El PB, LTG y LEV disminuyen la severidad de las crisis desde dosis bajas, inhibiendo, en algunos casos, la generación de la crisis. Este hecho puede estar relacionado a la acción bloqueante de los canales de Ca^{2+} y Na^{2+} que provocan estos fármacos. En la patología epiléptica, durante la propagación de la actividad exitatoria ictal se observa alta frecuencia de descarga neuronal, afectando actividad neural normal; los FAE bloquearían esta

excesiva tasa de disparo al bloquear los canales (Bialer, 2002; Rogwaski and Löscher, 2004, Martella y cols., 2005; Pisani y cols., 2006). Los FAE actúan, en este caso, ayudando a modular las corrientes de sodio I_{NaP} y I_{NaF} , y de las de calcio HVA (Rogawski and Loscher, 2004; Mantegazza y cols., 2010). El efecto ejercido por la RGB se debe a su efecto sobre los canales $KCNQ_{2-5}$, al incrementar su actividad neural a través de un cambio en la hiperpolarización de su apertura por voltaje, reduciendo así la excitabilidad neuronal (Knebel y cols., 2000, Brown y Passmore, 2009; Jensen y cols., 2005).

PB, VPA, LEV y RGB actúan también incrementando la acción inhibitoria de GABA, ya sea por efecto directo en el receptor $GABA_A$ o indirectamente sobre las enzimas de síntesis de GABA o moduladores alostéricos (Rowgaski, 2004; Errington y cols, 2008 Rogawski y Bazil, 2008; Shenzer y cols, 2005; Tatulian y cols., 2001). En las dosis mayores, los efectos secundarios observados, sedación y ataxia, están relacionados con la acción inhibitoria GABAérgica.

En el estudio crónico, nos hemos topado con algunas limitaciones, relacionadas en parte con las peculiaridades etológicas y de respuesta farmacocinética de la especie (Van Hoosier, 1987) y con las propiedades de la vía de administración oral. Hemos tenido que modificar el diseño inicial para intentar conseguir niveles eficaces del fármaco que se mantengan en el tiempo, y, con varios FAE, aún estamos en etapas preliminares. La vía para la administración crónica tenía que ser obligatoriamente oral, para evitar la producción de crisis con la manipulación de los animales, ya que el estrés es un cofactor desencadenante de las crisis (Muñoz y cols., 2013). Empezamos con la administración de los FAE en el agua de la bebida, sistema que se manifestó ineficaz, ya que no se alcanzaban niveles plasmáticos suficientes, que se explica, en parte, por la forma de hidratarse los animales, fundamentalmente nocturna (Löscher y cols., 1988). En una segunda fase, empleamos la administración por vía oral, empleando una jeringa y diluyendo el fármaco en agua con miel, suministrándolo dos veces al día. La necesidad de incrementar sustancialmente la dosis oral de los FAE, provocaba una elevada toxicidad, similar a la mostrada en dosis equiparables administradas parenteralmente, lo que nos llevó a un diseño de tratamiento crónico

escalonado, en el que aumentamos la dosis de forma progresiva, intentando provocar el desarrollo de tolerancia a los efectos adversos.

A pesar de mejorar la respuesta anticonvulsiva con el nuevo sistema de administración, ya que PB y LTG ejercieron efecto protector, el resto de los fármacos no fueron eficaces. Este hecho podría explicarse por las considerables diferencias en la biodisponibilidad de los FAE, según la vía de administración utilizada, hecho ampliamente comprobado en la literatura (Nau, 1986).

En el diseño de administración crónica de los FAE, parece que no conseguimos llegar a los niveles sanguíneos de fármaco necesarios para generar un efecto anticonvulsivo en los casos de LEV, VPA y RGB. No fue posible dentro de nuestro diseño iniciar el estudio con dosis más altas, por la elevada toxicidad manifestada en los animales con las dosis utilizadas, por lo que queda pendiente el ensayo con otras dosis en un protocolo de administración progresiva, que facilite el desarrollo de tolerancia a los efectos adversos.

Los FAE que no tuvieron efecto en administración oral, VPA y LEV, presentaron efectos tóxicos (ataxia y sedación) muy elevados, que se corresponden bien con las dosis tan altas utilizadas. Hemos comprobado que, tras la administración crónica de ácido Valproico, aparecen niveles plasmáticos y cerebrales suficientes para ejercer protección anticonvulsiva, pero sin embargo no se observa este efecto, lo que nos hace plantear la posibilidad de que se hayan puesto en marcha mecanismos de tolerancia no dilucidados. También, es posible que los niveles plasmáticos no sean el único parámetro farmacocinético que explique la eficacia anticonvulsiva en este modelo. No podemos tampoco reproducir la potencial acción antiepiléptica del Levetiracetam, que se ha visto en una amplia gama de modelos animales (Löscher y Hönack, 1983).

La RGB, no presenta efectos anticonvulsivos, cambios comportamentales ni toxicidad tras la administración oral con las dosis utilizadas. No ha sido posible detectar niveles plasmáticos ni cerebrales de Retigabina medibles por HPLC, tras su administración oral crónica, lo que nos obliga a replantearnos las dosis necesarias y la vía de administración. En el estudio crónico futuro, hemos previsto la utilización de bombas osmóticas que aseguren la liberación continua del fármaco, ya que parte de la ausencia

de respuesta eficaz puede ser debida a que no se llegue a unos niveles de fármaco estables en sangre que generen neuroprotección frente a los procesos ictales. Otra explicación plausible es que la propia especie o bien las alteraciones congénitas de esta línea puedan alterar la respuesta a la sensibilidad de un fármaco dado.

Es importante remarcar que no hay modelo que cubra todos los tipos de epilepsias, y aunque los patrones epilépticos observados en el modelo sean similares a los de las crisis humanas, no significa que la fisiopatología sea la misma (Fisher, 1989). La epilepsia es una enfermedad compleja en la que se ven afectados distintos sistemas, y esto se refleja en la heterogeneidad en las distintas manifestaciones clínicas y en los distintos patrones comportamentales (Tejada y cols., 2013). Por ello, junto al estudio de la farmacocinética de los FAE y la modificación de la severidad de las crisis, hemos estudiado los cambios comportamentales que se producen en nuestro modelo de epilepsia tras la administración de diversos FAE.

Tras la administración de FAE, el comportamiento exploratorio, tanto en tratamiento agudo como crónico, tiende a disminuir, reduciéndose especialmente la frecuencia de los items principales, como caminar y oler. Esta situación podría estar influida por la disminución locomotora y en el tono muscular generado por los FAE (Consroe y cols., 1980; Lohtman y cols, 1988; Barcia y cols. 1999). En general, las alteraciones que provocan los fármacos antiepilépticos en nuestro modelo sobre el proceso ictal una vez el fármaco ejerce su efecto anticonvulsivo, es la eliminación de las convulsiones tónico-clónicas, afectándose inicialmente la hiperextensión de las extremidades; a medida que aumentamos la dosis del FAE, se va modificando la carrera salvaje hasta anular la crisis por completo. Este efecto inhibitorio dosis-dependiente puede estar respondiendo a diferentes niveles de acción sobre las dianas utilizadas por los FAE. En una próxima fase, se realizará el mismo protocolo acompañado de un estudio electroencefalográfico, en el que se pueda registrar simultáneamente cómo se ve afectada la actividad neuronal por los FAE en nuestro modelo.

Para modelar la epilepsia, han sido utilizados distintos organismos, entre los que podemos encontrar moscas, peces, gusanos y roedores (Nef, 2001), estos últimos tienen una especial ventaja, al poseer un repertorio de comportamientos complejos,

por lo que son los organismos de preferencia en el estudio de las respuestas a los FAE (Nef, 2001). Löscher (2011) indica que los modelos para el descubrimiento de FAE deben ser fáciles de manejar, eficientes en costo y tiempo, y con una actividad clínica predecible, características que el GASH:Sal cumple. En este modelo, las crisis se generan por un sonido, lo que contribuye a su consideración como un modelo económicamente rentable.

Dentro de la validación de estos modelos, se tiene que tener en cuenta la respuesta farmacológica, además de reproducir los síntomas y tener un EEG característico de los síndromes epilépticos (Rubio, 2012; Barrera y cols., 2013). Podemos concluir que se necesitan nuevos modelos animales no sólo de convulsiones, sino fundamentalmente de epilepsia. Esta necesidad es prioritaria en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos, que deben identificarse sobre mejores modelos, capaces de descubrir moléculas con mecanismos de acción diferentes a los evaluados por los modelos actuales. Proponemos el hámster GASH:Sal como un futuro modelo de epilepsia, con unas características interesantes para su utilización en el estudio de las epilepsias audiogénicas.



("Little Boxes". Janet Yagoda Shagam)

Conclusiones

Primera

La administración aguda de Fenobarbital, Ácido Valproico, Lamotrigina y Retigabina en el hámster GASH:Sal, provoca un efecto anticonvulsivo dosis-dependiente, con un orden de potencia: Retigabina > Lamotrigina > Fenobarbital > Ácido Valproico.

Segunda

La administración aguda de Levetiracetam en el hámster GASH:Sal ejerce un efecto anticonvulsivo independiente de la dosis en todas las concentraciones usadas, aunque sin llegar a ser eficaz en el 100% de los animales tratados.

Tercera

Lamotrigina y Fenobarbital, cuando se administran de forma crónica por vía oral, ejercen un efecto de protección anticonvulsiva en el hámster GASH:Sal, aunque con dosis efectivas mayores que las utilizadas por vía parenteral.

Cuarta

Ácido Valproico, Levetiracetam y Retigabina, en administración crónica por vía oral, no ejercen efecto anticonvulsivo en el hámster GASH:Sal.

Quinta

Todos los fármacos ensayados en el hámster GASH:Sal, tanto en administración aguda como crónica, provocan ataxia y sedación de forma dosis-dependiente.

Sexta

El estudio neuroetológico nos permite concluir que, la administración de fármacos antiepilépticos al hámster GASH:Sal modifica la secuencia comportamental de las crisis audiógenas de una manera dosis-dependiente, anulando inicialmente la fase de

convulsión tónico-clónica, y prolongando la fase de carrera salvaje, que pasa directamente a la inmovilidad postictal, la cual aumenta su duración.

Séptima

En el hámster GASH:Sal, los fármacos antiepilépticos inducen una variación en la frecuencia y duración de los ítems exploratorios en los períodos de pre-estímulo, estímulo y post-estímulo sonoro.

Octava

El estudio del hámster GASH:Sal ha proporcionado la descripción de un nuevo ítem neuroetológico, la caída atáxica, que se produce en animales tratados con fármacos antiepilépticos, de una forma dosis-dependiente y relacionado con la toxicidad de los mismos.

Novena

Se demuestra que el hámster GASH:Sal constituye un modelo animal de utilidad para el estudio de fármacos antiepilépticos, ya que las crisis tónico-clónicas evocadas responden a los mismos, y pueden ser modificadas por fármacos antiepilépticos clásicos y de nueva generación.

Bibliografía

Abbott, F.S. & Acheampong, A.A., 1988. Quantitative structure-anticonvulsant activity relationships of valproic acid, related carboxylic acids and tetrazoles. *Neuropharmacology*. 27, 287-94.

Anlezark, G., Horton, R.W., Meldrium, B.S., Sawaya, C.B., 1976. Anticonvulsant action of ethanolamine-O-sulphate and di-n-propylacetate and the metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in mice with audiogenic seizures. *Biochem Pharmacol*. 25, 413-7.

Aparicio, M., 1982. Anatomía comparada de la porción troncoencefálica del sistema acústico en el hámster dorado. Comportamiento morfológico de dicho sistema en la epilepsia audiógena genética espontánea., Universidad de Valladolid.

Armijo, J.A., Herranz, J.L., 2007. Politerapia racional en epilepsia.III. Posibles asociaciones de antiépilépticos. *Rev Neurol*. 45 (4): 236-244

Arzy, S., Allali, G., Brunet, D., Michel, C.M., Kaplan, P.W., Seeck, M., 2010. Antiepileptic drugs modify power of high EEG frequencies and their neural generators. *Eur J Neurol*. 17, 1308-12.

Aslan,M., Orhan, D.D., Orhan, N., 2011. Effect of *Gentiana olivieri* on experimental epilepsy models. *Pharmacogn Mag*. 7(28): 344–349.

Baraban, S.C., 2007. Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Curr Opin Neurol*. 20, 164-8.

Barcia, J.A., Rubio, P., Alos, M., Serralta, A., Belda, V., 1999. Anticonvulsant and neurotoxic effects of intracerebroventricular injection of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine in an amygdala-kindling model of epilepsy in the rat. *Epilepsy Res*. 33, 159-67.

Barrera- Bailón B., Oliveira J.A.C., López D.E., Muñoz de la Pascua L.J., Garcia-Cairasco N., Sancho C., 2013. Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior* (submitted)

Berg, A. T. & Scheffer I. E., 2011. "New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century." *Epilepsia* 52(6): 1058-1062.

Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010a. Berg, A.T., Scheffer, I.E., 2011. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia*. 52, 1058-62.

- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010b. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 51, 676-85.
- Berkovic, S. F. & Scheffer I. E., 1997. "Genetics of human partial epilepsy." *Curr Opin Neurol* 10(2): 110-114.
- Berti, P., Dal-Col, M.L., Wichert-Ana, L., Kato, M., Terra, V.C., de Oliveira, J.A., Velasco, T.R., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2010. The neurobiological substrates of behavioral manifestations during temporal lobe seizures: a neuroethological and ictal SPECT correlation study. *Epilepsy & behavior: E&B*. 17, 344-53.
- Bialer M., J.S.I., Kupferberg H.J., Levy R.H., Loiseau P., Perucca E., 2002. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Research* 51 31-71.
- Bialer, M., Twymanc, R.E., White, H. S, 2004. Correlation analysis between anticonvulsant ED50 values of antiepileptic drugs in mice and rats and their therapeutic doses and plasma levels *Epilepsy & Behavior* 5, 866–872
- Bradford, H.F., 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol*. 47, 477-511.
- Brown, D.A., Passmore, G.M., 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*. 156, 1185–1195.
- Bu, W., Nguyen, M., Xu, C., Lin, C.C., Yeh, L.T., Borges, V., 2007. Determination of N-acetyl retigabine in dog plasma by LC/MS/MS following off-line microElution 96-well solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 852, 465-72.
- Buchhalter, J.R., 1993. Animal models of inherited epilepsy. *Epilepsia* 34, Suppl. 3:S31-41.
- Cabo-de la Vega, C; P. Villanueva-Hernández, P; Prieto-Martín, A., 2006. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol*. 42 (3): 159-168
- Carballosa- González, M.M., Muñoz L.J., López-Alburquerque, T., Pardal-Fernández, M.J., Nava, E., de Cabo, C., López, D.E., 2013. EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research* (enviado)

Carballosa-González, M.M., 2008. Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH:sal. In: Instituto de Neurociencias Castilla y León (INCyL). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Salamanca.

Castro, O.W., Furtado, M.A., Tilelli, C.Q., Fernandes, A., Pajolla, G.P., Garcia-Cairasco, N., 2011. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res.* 1374, 43-55.

Chapman, A., Keane, P.E., Meldrum, B.S., Simiand, J., Vernieres, J.C., 1982. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol.* 19, 315-59.

Cheng, H., Liu, Z., Blum, W., Byrd, J.C., Klisovic, R., Grever, M.R., Marcucci, G., Chan, K.K., 2007. Quantification of valproic acid and its metabolite 2-propyl-4-pentenoic acid in human plasma using HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850, 206-12.

Chevrie J.J., & Aicardi J., 1977. Convulsive disorders in the first year of life. Etiologic factors. *Epilepsia*, 18: 489-498.

Cockerell, O.C., Gupta, S., Catchpole, M., Sander, J.W., Shorvon, S.D., 1995. The British Neurological Surveillance Unit: a nation-wide scheme for the ascertainment of rare neurological disorders. *Neuroepidemiology.* 14, 182-7.

Collins, R.C., Plum, F., Posner, F., Sanders, A.P., Kramer, R.S., Woodhall, B., Currie, W.D., 1970. Energy and epilepsy. *Science.*, 25;170(965):1430-1431.

Conover, W.J., 1980. *Practical nonparametric statistics.* Wiley, New York. ISBN: 0471028673

Consroe, P., Kudray K., Schmitz R., 1980. Acute and chronic antiepileptic drug effects in audiogenic seizure-susceptible rats. *Experimental neurology.* 70(3): p. 626-37.

Contin, M., Balboni, M., Callegati, E., Candela, C., Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., 2005. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 828, 113-7.

Contin, M., Mohamed, S., Candela, C., Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., 2010. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878, 461-5.

- Contreras, D. 2000. Modelos experimentales en epilepsia. *Rev Neurol.* 30 (4): 370-376
- Czuczwar, S.J., Turski, L., Kleinrok, Z., 1982. Anticonvulsant action of phenobarbital, diazepam, carbamazepine, and diphenylhydantoin in the electroshock test in mice after lesion of hippocampal pyramidal cells with intracerebroventricular kainic acid. *Epilepsia.* 23, 377-82.
- Dailey, J.W., Cheong, J.H., Ko, K.H., Adams-Curtis, L.E., Jobe, P.C., 1995. Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction of clinical response. *Neurosci Lett.* 195, 77-80.
- Dal-Cól, M.L.C., Terra-Bustamante, V.C., Velasco, T.R., Oliveira, J.A.C., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2006. Neuroethology application for the study of human temporal lobe epilepsy: From basic to applied sciences. *Epilepsy & Behavior: E&B.* 8, 149-160.
- Dodge, J.C., Illig, A.M., Snyder, P.J., Badura, L.L., 2000. GABA levels within the medial preoptic area: effects of chronic administration of sodium valproic acid. *Psychoneuroendocrinology.* 25, 519-34.
- Doheny, H.C., Ratnaraj, N., Whittington, M.A., Jefferys, J.G., Patsalos, P.N., 1999. Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant Levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy Res.* 34, 161-8.
- Donato Di Paola, E., Gareri, P., Davoli, A., Gratteri, S., Scicchitano, F., Naccari, C., De Sarro, G., 2007. Influence of levetiracetam on the anticonvulsant efficacy of conventional antiepileptic drugs against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Epilepsy Res.* 75, 112-21.
- Engel J Jr, Schwartzkroin PA. 2006. What should be modeled? En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (Ed.). *Models of seizures and epilepsy.* Elsevier Academic Press, pp1-14.
- Engel, J., Jr., 2006. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res.* 70 Suppl 1, S5-10.
- Errington, A.C., Stohr, T., Heers, C., Lees, G., 2008. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol.* 73, 157-69.
- Etholm, L., Heggelund, P., 2009. Seizure elements and seizure element transitions during tonic-clonic seizure activity in the synapsin I/II double knockout mouse: a neuroethological description. *Epilepsy & behavior : E&B.* 14, 582-90.
- Fernandez, S., Donaire, A., Maestro, I., Seres, E., Setoain, X., Bargallo, N., Rumia, J., Boget, T., Falcon, C., Carreno, M., 2011. Functional neuroimaging in startle epilepsy: involvement of a mesial frontoparietal network. *Epilepsia.* 52, 1725-32.

Fisher, R.S. 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev* 14: 245-278. Van Hoosier Jr G.L. 1987. Laboratory hamsters. Ed. Charles W. McPherson Academic press

Fisher, R.S., Vickrey B.G., Gibson P., Hermann B., Penovich P., Scherer A., Walker S., 2000. The impact of epilepsy from the patient's perspective II: views about therapy and health care. *Epilepsy Res.* 41:53-62.

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

Frankel, W.N., 2009. Genetics of complex neurological disease: challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats. *Trends Genet.* 25, 361-7.

Frankel, W.N., Valenzuela, A., Lutz, C.M., Johnson, E.W., Dietrich, W.F., Coffin, J.M., 1995. New seizure frequency QTL and the complex genetics of epilepsy in EL mice. *Mamm Genome.* 6, 830-8.

French, J.A., 2007. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia.*;48 Suppl 1:3-7.

Fuentes-Santamaria, V., Alvarado, J.C., Herranz, A.S., Garcia-Atares, N., López, D.E., 2007. Morphologic and neurochemical alterations in the superior colliculus of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* 75, 206-19.

Fuentes-Santamaria, V., Alvarado, J.C., Herranz, A.S., Garcia-Atares, N., Lopez, D.E., 2008. Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* 79, 224-7.

Fuentes-Santamaria, V., Cantos, R., Alvarado, J.C., Garcia-Atares, N., López, D.E., 2005. Morphologic and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsia.* 46, 1027-1945.

Furtado, M.A., Braga, G.K., Oliveira, J.A., Del Vecchio, F., Garcia-Cairasco, N., 2002. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 43 Suppl 5, 37-9.

Galvis-Alonso, O.Y., Cortes De Oliveira, J.A., García-Cairasco, N., 2004. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 125: 787-802.

Garcia- Cairasco, N., Doretto, M.C., Pradom, R.P., Jorge, B.P.D., Terra, V.C., Oliveira, J.A.C., 1992. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behav Brain Res.*, 48:49-56.

Garcia Garcia, M.E., Garcia Morales, I., Matías Guiu, J., 2010. Modelos experimentales en epilepsia . *Neurología* 25(3):181-188

Garcia-Cairasco, N., Doretto, M.C., Ramalho, M.J., Antunes-Rodrigues, J., Nonaka, K.O., 1996. Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 53, 503-10.

Garcia-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J.A., Furtado Mde, A., 2004. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy & behavior : E&B.* 5, 455-63.

Gilbert, T.H., Corley, S.M., Teskey, G.C., 2002. Conventional anticonvulsant drugs in the guinea pig kindling model of partial seizures: effects of acute phenobarbital, valproate, and ethosuximide. *Exp Brain Res.* 146, 336-44.

Gilbert, T.H., Teskey, G.C., 2007. Conventional anticonvulsant drugs in the guinea-pig kindling model of partial seizures: effects of repeated administration. *Exp Brain Res.* 178, 115-25.

Gil-Verona, J.A., Gómez, M., Gómez, P., Macías, J., García-Atarés, N., 1991. Comportamiento morfológico de la porción troncoencefálica del sistema acústico en hámsters que padecen epilepsia audiógena." *Rev. Esp. Epilepsia* 6, 85-95.

Gjerstad, L., & Tauboll, E., 2003. [Epilepsy and genetics]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 123, 2731-4.

Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Chadwick, D., Guerreiro, C., Kalviainen, R., Mattson, R., Perucca, E., Tomson, T., 2006. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia.* 47, 1094-120.

Goa, K.L., Ross, S.R., Chrisp P., 1993, Lamotrigine. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy, *Drugs* 46, 152.

Godin, Y., Heiner, L., Mark, J., Mandel, P., 1969. Effects of DI-n-propylacetate, and anticonvulsive compound, on GABA metabolism. *J Neurochem.* 16, 869-73.

Goldsmith, I.L., Zupano, M.L., Buchhalter, J.R., 2000. Long-term seizure outcome in 74 patients with Lennox-Gastaut syndrome: effects of incorporating MRI headimaging in defining the cryptogenic subgroup. *Epilepsia*, 41: 395-399.

Gower, A.J., Hirsch, E., Boehrer, A., Noyer, M., Marescaux, C., 1995. Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 22, 207-13.

Gross, R.A., 1992. A brief history of epilepsy and its therapy in the Western Hemisphere. *Epilepsy Res.* 12, 65-74.

Guerrini, R., Casari, G., Marini, C., 2003. The genetic and molecular basis of epilepsy. *Trends Mol Med.* 9, 300-6.

Gurnett, C.A., Hedera, P., 2007. New ideas in epilepsy genetics: novel epilepsy genes, copy number alterations, and gene regulation. *Arch Neurol.* 64, 324-8.

Hempel, R., Schupke, H., McNeilly, P.J., Heinecke, K., Kronbach, C., Grunwald, C., Zimmermann, G., Griesinger, C., Engel, J., Kronbach, T., 1999. Metabolism of retigabine (D-23129), a novel anticonvulsant. *Drug Metab Dispos.* 27, 613-22.

ILAE, 1989. Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30:389-399.

Jensen, H.S., Calløa, K., Jespersen, T., Jensen B. S., Olesen S.P., 2005. The KCNQ5 potassium channel from mouse: A broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Molecular Brain Research.* 139, 52 – 62.

Jobe P.C., & Laird H.E., 1981. Neurotransmitter abnormalities as determinants of seizure susceptibility and intensity in the genetic models of epilepsy. *Biochem Pharmacol.* 30(23):3137-3144

Kammerer, M., Rassner, M.P., Freiman, T.M., Feuerstein, T.J., 2011. Effects of antiepileptic drugs on GABA release from rat and human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 384, 47-57.

Kaneko, S., Okada, M., Iwasa, H., Yamakawa, K., Hirose, S., 2002. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res.* 44, 11-30.

Klassen, T., Davis, C., Goldman, A., Burgess, D., Chen, T., Wheeler, D., McPherson, J., Bourquin, T., Lewis, L., Villasana, D., Morgan, M., Muzny, D., Gibbs, R., Noebels, J., 2011. Exome sequencing of

- ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell*. 145, 1036-48.
- Klitgaard, H., Matagne, A., Gobert, J., Wulfert, E., 1998. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol*. 353, 191-206.
- Klitgaard, H., Matagne, A., Lambert, Y., 2002. Use of epileptic animals for adverse effect testing. *Epilepsy Res*. 50, 55-65.
- Knebel, N.G., Grieb, S., Leisenheimer, S., Locher, M., 2000. Determination of retigabine and its acetyl metabolite in biological matrices by on-line solid-phase extraction (column switching) liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 748, 97-111.
- Kotagal P., Luders H.O., Williams G., Nichols T.R., McPherson J., 1995. Psychomotor seizures of temporal lobe onset: analysis of symptom clusters and sequences. *Epilepsy Research* 20(1):49-67.
- LaRoche, S.M., & Helmers, S.L., 2011. The New Antiepileptic Drugs. *JAMA*. 291, 605-614.
- Le Van Quyen, M., Navarro, V., Martinerie, J., Baulac, M., Varela, F.J., 2003. Toward a neurodynamical understanding of ictogenesis. *Epilepsia*. 44 Suppl 12, 30-43.
- Litchfield, J.T., Jr., & Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 96, 99-113.
- Löscher, W., & Hönack, D., 1983. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats, *Eur. J. Pharmacol*, 232, 147-158.
- Löscher, W., & Hönack, D., 1989. Comparison of the anticonvulsant efficacy of primidone and phenobarbital during chronic treatment of amygdala-kindled rats. *Eur J Pharmacol*. 162, 309-22.
- Löscher, W., & Hönack, D., 1993. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur J Pharmacol*. 232, 147-58.
- Löscher, W., & Rogawski, M.A., 2012. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia*. 53 Suppl 8, 12-25.
- Löscher, W., & Schmidt D., 2006. "New Horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies." *Epilepsy Res* 69(3): 183-272.

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

Löscher, W., & Schmidt, D., 2006. New Horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. *Epilepsy Res.* 69, 183-272.

Löscher, W., & Stephens, D.N., 1988. Chronic treatment with diazepam or the inverse benzodiazepine receptor agonist FG 7142 causes differential changes in the effects of GABA receptor stimulation. *Epilepsy Res.* 2, 253-9.

Löscher, W., & Vetter, M., 1985. In vivo effects of aminooxyacetic acid and valproic acid on nerve terminal (synaptosomal) GABA levels in discrete brain areas of the rat. Correlation to pharmacological activities. *Biochem Pharmacol.* 34, 1747-56.

Löscher, W., 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 50, 105-23.

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

Löscher, W., Hönack, D., Rundfeldt, C., 1998. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 284, 474-9.

Löscher, W., Nau, H., Marescaux, C., Vergnes, M., 1984. Comparative evaluation of anticonvulsant and toxic potencies of valproic acid and 2-en-valproic acid in different animal models of epilepsy. *Eur J Pharmacol.* 99, 211-8.

Lothman, E.W., Salerno, R. A. Perlin, J. B., Kaiser, D. L., 1988. Screening and characterization of antiepileptic drugs with rapidly recurring hippocampal seizures in rats. *Epilepsy Res.* 2(6): p. 367-79.

Luszczki, J.J., 2009. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacological Reports.* 61, 197-216.

Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B., 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 9861-6.

- Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D.S., Avoli, M., 2010. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 9, 413-24.
- Martella, G., De Persis, C., Bonsi, P., Natoli, S., Cuomo, D., Bernardi, G., Calabresi, P., Pisani, A., 2005. Inhibition of persistent sodium current fraction and voltage-gated L-type calcium current by propofol in cortical neurons: implications for its antiepileptic activity. *Epilepsia.* 46, 624-35.
- Martino, G.H., & Martino, R.H., 2007. *Manual de Epilepsia, Vol.*, Nobuko, Buenos Aires. ISBN: 978-987-584-088-1
- Medina Malo, C., 2004. *Epilepsia: Aspectos Clínicos y Psicosociales.* Ed. Panamericana Médica, Bogotá. ISBN: 958-91-7198-3
- Meldrum, B., 2002. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* 50, 33-40.
- Miller, A.A., P. Wheatley, D.A. Sawyer, M.G. Baxter and B. Roth, 1986, Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: I. Anticonvulsant profile in mice and rats, *Epilepsia* 27, 483
- Moriyama, M., Yamashita, S., Domoto, H., Furuno, K., Araki, H., Gomita, Y., 1999. Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring. *J.Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 723, 301-5.
- Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., 2005. Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No. 2, R243-9.
- Muñoz de la Pascua, L., & López, D.E., 2005. Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Ed. Muñoz de la Pascua, Luis. Salamanca, ISBN 13: 978-84-609-5027-1
- Muñoz-García, D., Del Ser, T., Bermejo, F., Portera, A., 1982. Truncal ataxia in chronic anticonvulsant treatment. Association with drug-induced folate deficiency. *J Neurol Sci.* 55, 305-11.
- Nau H., 1986. Species Differences in Pharmacokinetics and Drug Teratogenesis. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 70, pp. 113-129.
- Nef, P., 2001. Key animal models for the identification and validation of drug targets. *Drug Discoveries & Therapeutics.* 6, 91-96.

Nicita, F., De Liso, P., Danti, F.R., Papetti, L., Ursitti, F., Castronovo, A., Allemand, F., Gennaro, E., Zara, F., Striano, P., Spalice, A., 2012. The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies. *Seizure*. 21, 3-11.

Noebels, J.L., 1999. Single-gen models of epilepsy. En: Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, editores. *Jasper's Basic mechanisms of the epilepsies*. Advances in neurology. Vol 79. 3.a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p. 227-238.

Noebels, J.L., Qiao, X., Bronson, R.T., Spencer, C., Davisson, M.T., 1990. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res*. 7, 129-35.

Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol*. 51, 39-87.

Ottman, R., 2005. Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*. 46 Suppl 10, 7-14.

Otto, J.F., Kimball, M.M., Wilcox, K.S., 2002. Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol Pharmacol*. 61, 921-7.

Panayiotopoulos, C.P., 2005. *The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management*. LIBRERIA MEDICA BERRI. ISBN: 9781846286438.

Picazo, M.G., P.J. Benito, García-Olmo, D.C. 2009. Efficiency and safety of a technique for drawing blood from the hamster cranial vena cava. *Lab animal*, 38(6): p. 211-216.

Pisani, A., Bonsi, P., Martella, G., De Persis, C., Costa, C., Pisani, F., Bernardi, G., Calabresi, P., 2004. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. *Epilepsia*. 45, 719-28.

Pitkanen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismagi, J., Grohn, O., Nissinen, J., 2007. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*. 48 Suppl 2, 13-20.

Pitkanen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. 14 Suppl 1, 16-25.

Porter, R.J., Nohria, V., Rundfeldt, C., 2007. Retigabine. *Neurotherapeutics*. 4, 149-54.

- Prieto-Martin, A.I., Llorens, S., Pardal-Fernandez, J.M., Munoz, L.J., López, D.E., Escribano, J., Nava, E., de Cabo, C., 2012. Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sci.* 90, 531-7.
- Prince, D.A., & Farrell, D., 1969. Centrencephalic' spike wave discharges following parenteral penicillin injection in the cat. *Neurology* 19: 309-310.
- Rho, J.M., Donevan, S.D., Rogawski, M.A., 1996. Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 497 (Pt 2), 509-22.
- Rogawski, M.A., & Bazil, C.W., 2008. New molecular targets for antiepileptic drugs: alpha(2)delta, SV2A, and K(v)7/KCNQ/M potassium channels. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 8, 345-52.
- Rogawski, M.A., & Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 5, 553-64.
- Rosenberg, G., 2007. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci.* 64, 2090-103.
- Ross, K.C., & Coleman, J.R., 2000. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 639-53.
- Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E.E., Kutscher, B., Löscher, W., Hönack, D., White, H.S., Wolf, H.H., 1996. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 23, 211-23.
- Rubio, M.C., 2012. Modelos experimentales de epilepsia. Principales características y manifestaciones. ED. Editorial Academica Española. ISBN:978-3-659-03415-2
- Salas-Puig, J., Mateos, V., Amorin, M., Calleja, S., Jimenez, L., 2000. Reflex epilepsies. *Rev Neurol.* 30 Suppl 1, S85-9.
- Salvador, N., Guillén, J., Peralta, J.M., 2008. Biología general y mantenimiento de las especies más utilizadas. In: *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. Textos Universitarios, Vol. Volume I*, J.M. Zuñiga, J.M. Orellana, J.A. Tur. Universidad de Alcalá, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), Alcalá, pp. 95-150.
- Sarkisian, M.R., 2001. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy & behavior : E&B.* 2, 201-216.

Sayin, U., Osting, S., Hagen, J., Rutecki, P., Sutura, T., 2003. Spontaneous seizures and loss axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in Kindled rats. *J Neurosci.* 23:2759-2768.

Schauwecker, P.E., 2011. The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 97, 1-11.

Schenzer, A., Friedrich, T., Pusch, M., Saftig, P., Jentsch, T.J., Grotzinger, J., Schwake, M., 2005. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci.* 25, 5051-60.

Schmidt, D., 2011. Efficacy of new antiepileptic drugs. *Epilepsy Curr.* 11, 9-11.

Seyfried, T.N., & Glaser, G.H., 1985. A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. *Epilepsia.*, 26(2):143-145

Sgado, P., Viaggi, C., Pinna, A., Marrone, C., Vaglini, F., Pontis, S., Mercuri, N.B., Morelli, M., Corsini, G.U., 2011. Behavioral, neurochemical, and electrophysiological changes in an early spontaneous mouse model of nigrostriatal degeneration. *Neurotox Res.* 20, 170-81.

Shearer P., & Riviello J., 2011. Convulsive status epilepticus in adults and children: Treatment guidelines and protocols. *Emerg Med Clin N Am.* 29:51–64

Shinnar, S., & Berg, A.T., 1996. Does antiepileptic drug therapy prevent the development of "chronic" epilepsy? *Epilepsia.* 37, 701-8.

Shorvon S., 2009. Epidemiology: Status Epilepticus. En: Schwartzkroin P, ed. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research.* Oxford: Academic Press; p.1502–1509.

Sidiropoulou, K., Diamantis, A., Magiorkinis, E., 2010. Hallmarks in 18th- and 19th-century epilepsy research. *Epilepsy & behavior : E&B.* 18, 151-61.

Sidiropoulou, K., Diamantis, A., Magiorkinis, E., 2010. Hallmarks in 18th- and 19th-century epilepsy research. *Epilepsy & behavior : E&B.* 18, 151-61.

Silva Brum, L.F., Elisabetsky, E., 2000. Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 67, 411-6.

Silver, J.M., Shin, C., McNamara, J.O., 1991. Antiepileptogenic effects of conventional anticonvulsants in the kindling model of epilepsy. *Ann Neurol.* 29, 356-63.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer A., Anderson V.E., Leppert, M., 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 18:25-29.

Soria, M.A., Macias, J.A., Aguirre, A., Gómez, P., Gómez, M.E., 1987. Epilepsia audiógena en una cepa endogámica de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Esp. Epilepsia.* 2 (1), 27-33.

Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the Mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res.*, 7(2):129-135.

Stefan, H., & Feuerstein, T.J., 2007. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol Ther.* 113, 165-83.

Stefani, A., Hainsworth, A.H., Spadoni, F., Bernardi, G., 1998. On the inhibition of voltage activated calcium currents in rat cortical neurones by the neuroprotective agent 619C89. *Br J Pharmacol.* 125, 1058-64.

Steinlein, O.K., 2002. Channelopathies can cause epilepsy in man. *Eur J Pain.* 6 Suppl A, 27-34.

Striano, S., Coppola, A., del Gaudio, L., Striano, P., 2012. Reflex seizures and reflex epilepsies: old models for understanding mechanisms of epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 100, 1-11.

Szupera, Z., 2011. [New antiepileptic drugs, and therapeutic considerations]. *Ideggyogy Sz.* 64, 329-32.

Tang, M., Lau, C.E., Falk, J.L., 1979. Serum phenobarbital and barbital concentrations in rats on a limited food regimen. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 11, 359-61.

Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F.C., Brown, D.A., 2001. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci.* 21, 5535-45.

Tejada, J., Costa, K.M., Bertti, P., Garcia-Cairasco, N., 2013. The epilepsies: Complex challenges needing complex solutions. *Epilepsy & behavior: E&B.* 26, 212-28.

Tober, C., Rostock, A., Rundfeldt, C., Bartsch, R., 1996. D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur J Pharmacol.* 303, 163-9.

Torres-Zambrano M, Castillo Támara E, Camargo Ballestas JM. 2007. Resistencia farmacológica en epilepsia. *Acta Neurol Colomb* 23: 278-285.

Van Hoosier Jr G.L. 1987. *Laboratory hamsters.* Ed. Charles W. Mc Pherson Academic press

Wamil, A.W., & McLean, M.J., 1993. Phenytoin blocks N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 267, 218-27.

Warner T, Patsalos PN, Prevett M, Elyas AA, Duncan JS. 1992. Lamotrigine induced carbamazepine toxicity: an interaction with carbamazepine-10,11-epoxide. *Epilepsy Res.* 11: 147-150.

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

Wilby J, K.A., Hawkins N, Epstein D, McIntosh H, McDaid C, Mason A, Golder S, O'Meara S, Sculpher M, Drummond M and Forbes C, 2005. Clinical effectiveness, tolerability and cost-effectiveness of newer drugs for epilepsy in adults: a systematic review and economic evaluation. In: *Health Technology Assessment.* Vol. 9.

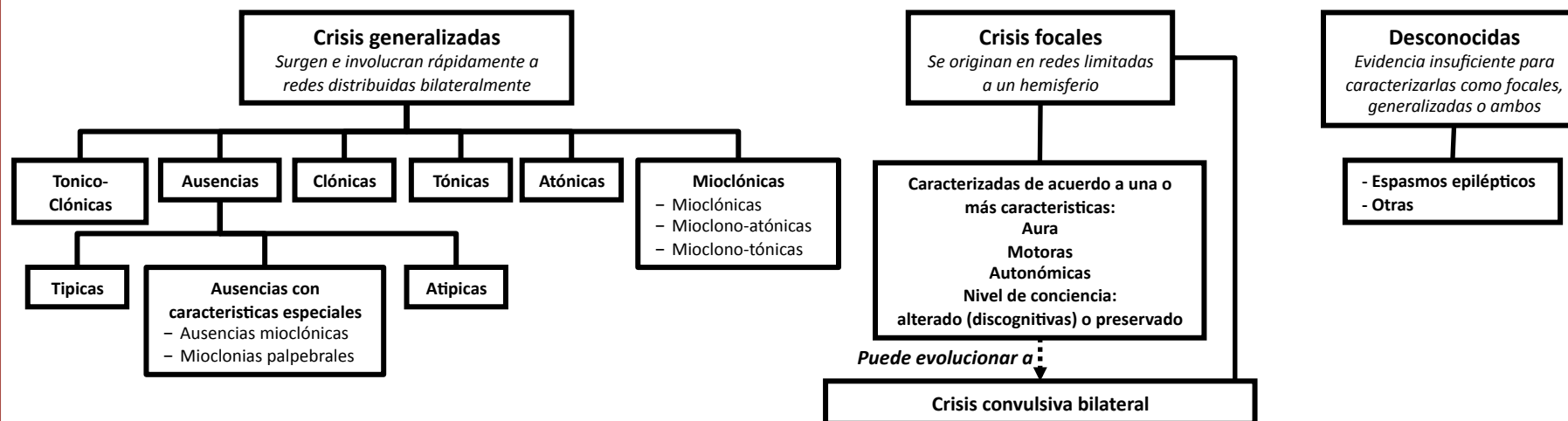
Winden, K.D., Karsten, S.L., Bragin, A., Kudo, L.C., Gehman, L., Ruidera, J., Geschwind, D.H., Engel, J., Jr., 2011. A systems level, functional genomics analysis of chronic epilepsy. *PLoS One.* 6, e20763.

Yeung, S., Schwake, M., Pucovsky, V., Greenwood, I., 2008. Bimodal effects of the Kv7 channel activator retigabine on vascular K⁺ currents. *Br J Pharmacol.* 155, 62-72.

Anexo 1

Propuesta de la ILAE de Terminología Revisada para la Organización de Crisis y Epilepsias 2010

Classification of Seizures



Cambios en terminología y conceptos

Nuevo término y concepto	Ejemplos	Término antiguo y concepto
Etiología		
Genética: un defecto genético contribuye directamente a la epilepsia y las crisis son el sintoma principal del trastorno	Canalopatías, déficit de Glut1, etc.	Idiopático: presuntamente genético
Estructural-metabólica: causada por una alteración estructural o metabólica cerebral	Esclerosis tuberosa, malformaciones corticales, etc.	Sintomático: secundario a una alteración cerebral conocida o que se supone que existe
Desconocida: la causa es desconocida y podría ser genética, estructural o metabólica		Criptogénico: presuntamente sintomático
Terminología		
Autolimitado: tendencia a resolverse espontáneamente con el tiempo		Benigna
Farmacosensible: altamente probable que se controle con medicación		Catastrófica
Crisis focales: la semiología de las crisis descrita de acuerdo a determinadas características subjetivas (auras), motoras, autonómicas y discognitivas		Parcial compleja
Que evoluciona a crisis convulsiva bilateral: eg. tónica, clónica, tónico-clónica		Secundariamente generalizada
		Secondarily generalized

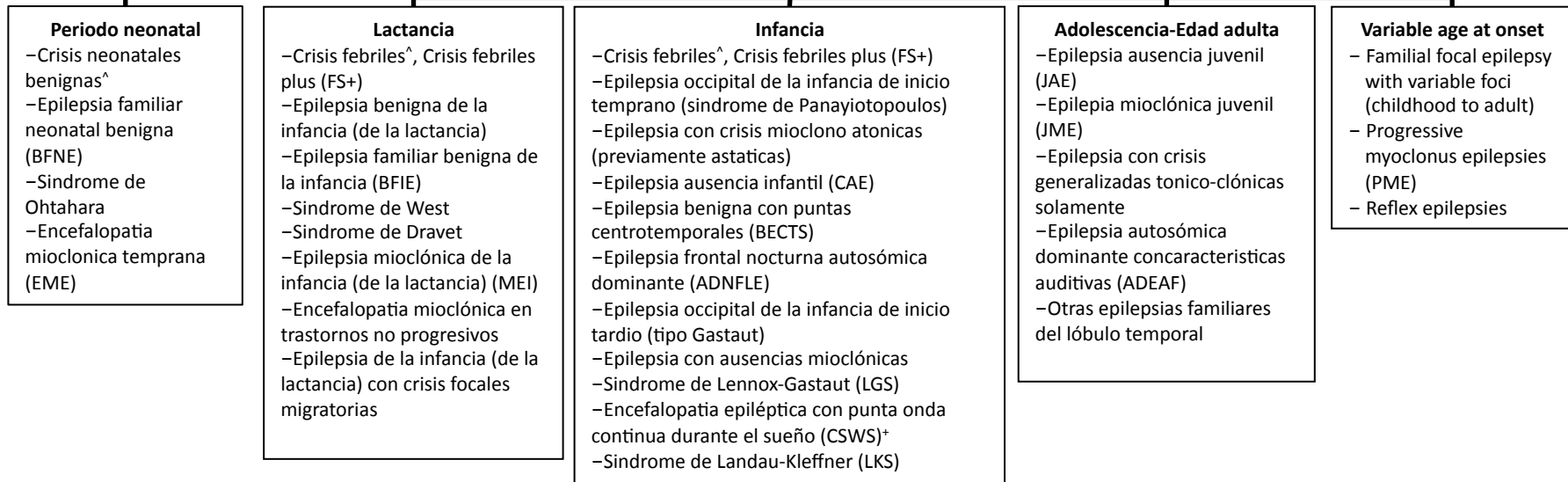
Referencias: 1. Berg AT et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51:676-685.
2. Berg AT, Cross JH. *Lancet* 2010;9:459-61. 3. Blume WT et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: Report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 2001;42:1212-1218.

ILAE Proposal for Revised Terminology for Organization of Seizures and Epilepsies 2010

Síndromes Electroclínicos y Otras Epilepsias Agrupadas por Especificidad del Diagnóstico

Síndromes electroclínicos

Un ejemplo de cómo se pueden organizar los síndromes:
Ordenados por edad típica de inicio*



Constelaciones específicas/Síndromes quirúrgicos

Constelaciones específicas/Síndromes quirúrgicos

- Epilepsia temporal mesial con esclerosis del hipocampo (ETM con HS)
- Síndrome de Rasmussen
- Crisis gelásticas con hamartoma hipotalámico
- Epilepsia con hemiconvulsión-hemiplejía

Epilepsias no sindrómicas**

Epilepsias atribuidas a causas estructurales-metabólicas y organizadas de acuerdo a ellas

- Malformaciones del desarrollo cortical (hemimegalencefalia, heterotopias, etc)
- Síndromes neurocutáneos (complejo esclerosis tuberosa, Sturge-Weber, etc)
- Tumor, infección, trauma, angioma, lesiones prenatales y perinatales, accidente cerebrovascular, etc.

Epilepsias de causa desconocida

* La ordenación de los síndromes electroclínicos no refleja la etiología

[^] No diagnosticadas tradicionalmente como epilepsia

⁺ Algunas veces denominado estatus epiléptico eléctrico durante el sueño lento (ESES)

** Formas de epilepsia que no cumplen criterios para síndromes específicos o constelaciones

This Proposal is a work in progress....

We welcome your thoughts on this proposal. Please visit our Classification & Terminology Discussion Group at: <http://community.ilae-epilepsy.org/home/> to login and register your comments.

Anexo 2

Índice de Severidad (SI)/ Índice de Severidad categorizado (cSI)

Jobe (1981). Modificado por García Cairasco, 1996.

SI	Comportamientos epilépticos	cSI
0.00	No Crisis	0
0.11	Una carrera salvaje	1
0.23	Una carrera salvaje (correr más saltar más caídas atónicas)	2
0.38	Dos carreras salvajes	3
0.61	Convulsión tónica (<i>opisthotonus</i>)	4
0.85	Convulsiones tónicas más convulsiones clónicas generalizadas	5
0.90	Flexión ventral de la cabeza más cSI5	6
0.95	Flexión miembros superiores más cSI6 ^a	7
1.00	Flexión miembros inferiores mas cSI6 ^a	8

^aCategorías que generalmente son seguidas por convulsiones tónico clónicas (CCV2).

Índice de Ataxia (AI)

Lösher and Hönack(1989)

Valor	Comportamientos
1	Ligera ataxia en los miembros posteriores (inestabilidad de los cuartos traseros), no hay disminución de tono muscular abdominal.
2	Ataxia más pronunciada, con arrastramiento de los miembros posteriores y una ligera pérdida del tono muscular
3	Mayor increment en la ataxia, un arrastramiento más pronunciado de los miembros posteriores y disminución de tono muscular
4	Ataxia marcada, el animal pierde el balance en la locomoción hacia adelante y pérdida del tono muscular abdominal
5	Ataxia muy marcada con pérdidas frecuentes de equilibrio durante la locomoción, pérdida del tono muscular abdominal

Índice de Sedación (SdI)
Lösher and Hönack(1989)

Valor	Comportamientos
1	Locomoción hacia adelante ligeramente reducida
2	Locomoción reducida con periodos de descanso (en parte con los ojos cerrados)
3	Locomoción reducida con mas periodos de descanso
4	No hay locomoción, el animal esta inmóvil con los ojos cerrados

Anexo 3

Diccionario de comportamientos
(Abreviaturas del inglés mirar lista de abreviaciones página 4)

Abreviatura	Comportamiento	Abreviatura	Comportamiento
DYS	Disnea	WA	Caminar
ER	Postura Erecta	WDS	Agitación como perro
EXC	Excreción de heces y orina	AF	Caída Atónica
FR	Postura de Congelamiento	BRL	Giro sobre Eje Izq.
GN	Roer	BRR	Giro sobre Eje Der.
GRB	Limpieza	GR	Girar derecha
GRF	Limpieza cara	GL	Girar izquierda
GRG	Limpieza genitales	JP	Salto
GRH	Limpieza de Cabeza	RU	Correr
GRHL	Limpieza de Cabeza Izq.	CCV1	Convulsiones Clónicas miembros superiores
GRL	Limpieza de Cuerpo Izq.	CCV2	Convulsiones Clónicas miembros inferiores
GRN	Limpieza del cuello	CCVg	Convulsiones Clónicas generalizadas
GRR	Limpieza de Cuerpo Der.	CVL1	Convulsiones Clónicas miembro inferior derecho
IM	Inmovilidad	CVL2	Convulsiones Clónicas miembro inferior izquierdo
LI	Lamer	HFL	Flexión ventral de la Cabeza
LIC	Lamer las garras	HP ₁	Extensiones miembros superiores
NOD	Cabeceo	HP ₂	Extensiones miembros inferiores
PIM	Inmovilidad post ictal	TCV	Convulsiones Clónicas miembros inferiores
SN	Oler	ATF	Caída Atáxica
STA	Sobresalto	BE	Guiñar
STR	Enderezamiento	MT	Movimientos masticatorios

	Comportamientos exploratorios, de limpieza y otros
	Comportamientos de carrera salvaje
	Comportamientos convulsivos tónico clónicos
	Comportamientos relacionados con los fármacos antiepilépticos
	Automatismos orofaciales

PHARMACOLOGICAL AND NEUROETHOLOGICAL STUDY OF THREE
ANTIPILEPTIC DRUGS IN THE GENETIC AUDIOGENIC SEIZURE HAMSTER
(GASH:Sal)

B. Barrera- Bailón¹, J. A. C. Oliveira², D. E. López^{1,3}, L. J. Muñoz⁴, N. Garcia-
Cairasco², C. Sancho^{1,5}

(1) Institute of Neurosciences of Castilla and León / IBSAL. University of
Salamanca, Salamanca (Spain)

(2) Physiology Department. Ribeirão Preto School of Medicine. University of São
Paulo. Ribeirão Preto (Brazil)

(3) Department of Cell Biology and Pathology. School of Medicine. University of
Salamanca, Salamanca (Spain)

(4) Animal Experimentation Service. University of Salamanca, Salamanca (Spain).

(5) Department of Physiology and Pharmacology. School of Medicine. University of
Salamanca, Salamanca (Spain)

Corresponding authors:

Consuelo Sancho Sánchez <sanchoc@usal.es>

Norberto Garcia-Cairasco <ngcairas@fmrp.usp.br>

Abstract

Epilepsy modeling is essential for understanding the basic mechanisms of the epileptic process. The Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal) exhibits generalized tonic-clonic seizures of genetic origin in response to sound stimulation and is currently being validated as a reliable model of epilepsy. Here, we performed a pharmacological and neuroethological study using the well-known and widely used antiepileptic drugs (AEDs) Phenobarbital (PB), Valproic Acid (VPA), and Levetiracetam (LEV). The intraperitoneal administration of PB (5-20 mg/kg) and VPA (100-300 mg/kg) produced a dose-dependent decrease in GASH:Sal audiogenic seizure severity scores. The administration of LEV (30-100 mg/kg) did not produce a clear effect. Phenobarbital showed a short plasmatic life and had a high antiepileptic effect starting at 10 mg/kg that was accompanied by ataxia. VPA acted only at high concentrations and was the AED with the most ataxic effects. LEV at all doses also produced sedation and ataxia side-effects. We conclude that the GASH:Sal is a reliable genetic model of epilepsy suitable to evaluate AEDs.

Keywords: pharmacokinetics, phenobarbital, valproic acid, levetiracetam, seizures, animal models of epilepsy

Running Title: AEDs and the GASH-Sal strain

1. Introduction

According to the International League Against Epilepsy (ILAE), epilepsy is defined as a disorder of the brain that is characterized by an enduring predisposition to epileptic seizures, which are defined as a transient occurrence of signs and/or symptoms due to abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain [1, 2]. Epilepsy is a disorder that has semiology and genetic heterogeneity because it has a variety of syndromes and manifestations. Genetic factors are largely considered to determine the susceptibility to seizure induction and the neuropathological consequences of epilepsy [3, 4]. To our knowledge, the occurrence of ictogenesis and epileptogenesis is due to a molecular imbalance generated in the brain between GABA and glutamate, in addition to other neurotransmitters [5, 6], that induces modifications in gene transcription, protein expression, and/or the structure of receptors [4, 7-10].

Epilepsy modeling is essential for understanding the basic mechanisms of the disease [3, 4] and for testing new antiepileptic drugs (AEDs). Currently there are a variety of animal models of epilepsy, primarily rodent, but also fly, fish, and worm models [11-13].

Genetic Audiogenic Seizure Hamsters (GASH:Sal) are a line of Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) that are being validated as a model of epilepsy. They exhibit acute audiogenic seizures (AS) of genetic origin in response to sound stimulation. These AS require the activation of brainstem auditory pathways and originate largely at the level of the inferior colliculus [14, 15]. These hamsters exhibit morphological and neurochemical abnormalities in the auditory pathway [13, 16].

Neuroethology is a useful tool for studying epilepsy, as it analyzes seizures in an integrated manner using the principle that evaluation of behavioral sequences is more consistent than studies of isolated behaviors [17, 18]. Neuroethological studies have been performed in epilepsy models, such as AS in rats [19], as well as in models that use pilocarpine [20, 21] and in synapsin knockout mice [22]. Further studies have been performed in temporal lobe epilepsy patients [23, 24]. Associations between pairs of behaviors in a time frame are used to detect frequency, duration and correlation parameters by statistical association. Groups of behaviors with significant associations are configured as behavioral clusters [17, 18].

As a part of the validation process of the GASH-Sal strain, we performed the current study using well-known and widely prescribed AEDs, including Phenobarbital (PB), Valproic Acid (VPA), and Levetiracetam (LEV). The goal of this study was to characterize the pharmacology of these AEDs using neuroethological tools in the GASH:Sal hamster.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Two month old male GASH:Sal hamsters were used. They were obtained from the inbred strain maintained at the animal facility of the University of Salamanca (USAL, Spain) and were housed during the experiments in the animal house at the Institute of Neuroscience of Castilla y León (INCyL) of the USAL. The experimental animals were handled and cared for according to the Guidelines of the Spanish (RD 1201/05) and European (2010/63/EU) Directives, under the supervision of the corresponding Institutional Animal Care and Use Committee. All efforts were made to avoid unnecessary animal suffering and to reduce the number of animals used in the study.

2.2. Acoustic stimuli

The stimuli were applied in a cylindrical acrylic arena (height: 50 cm; diameter: 37 cm). The sound of shaking keys was recorded using a high pass filter (>500 Hz; microphone Bruel & Kjaer #4134 and preamplifier Bruel & Kjaer #2619), digitized above 4 kHz, and reproduced by a computer coupled to an amplifier (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) and a tweeter (Beyma T2010, Valencia, Spain) in the upper portion of the arena. The final sound was a semi-random sound of 0-18 kHz with an intensity of 115 to 120 dB.

2.3. AEDs

Three AEDs were used for these experiments: PB (Luminal®, Kern Pharma) VPA (Depakine®, Sanofi Aventis) and LEV (Kepra®, UCB Pharma).

2.4. Pharmacology of the AEDs

2.4.1. Blood extraction and sample preparation

Blood was extracted at various times (30, 60, 120, 240 and 360 min) post-injection of the AEDs. The doses of the drugs were: 20 mg/kg of PB, 500 mg/kg of VPA and 100 mg/kg of LEV. Blood was extracted from the cranial vena cava according to the procedure described by Picazo *et al.* [25] under oral anesthesia (induction: 4% isoflurane and 1 l/min O₂, maintenance: 3% isoflurane and 0.4 l/min O₂). At each time point, 100 µl of blood was extracted and the animal was rehydrated with 150 µl of 0.9% saline. The samples were kept at 4°C until a clot formed and were then centrifuged for 5 minutes at 10000 g at 4°C. The supernatant (serum) was collected in 20 µl aliquots and frozen until used. Then, 20 µl of acetonitrile (Panreac, Barcelona, Spain) and an internal standard (IS) were vortexed with the serum aliquot, agitated for 5 min, then centrifuged for 5 minutes at 11000 g. The supernatant was placed in another tube and left to dry at room temperature. The sample was suspended in 20 µl of 20% methanol in dH₂O. The IS used were: 25 µg/mL acetanilide (Merck, Darmstadt, Germany) for PB, 20 µg/mL octanoic acid (Panreac) for VPA, 20 µg/mL caffeine (LiChro test standard, Merck, Darmstadt, Germany) for LEV.

2.4.2. Blood drug concentration

Serum levels determinations were carried out to adjust the timing interval for each AED. The blood drug concentrations were determined using HPLC/MS at the General Service of Mass Spectrophotometer of the USAL. The equipment used for analysis of the samples included an Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) for the HPLC assay and an Agilent trap XCT (Agilent Technologies) for the mass spectrophotometry assay. The mobile phase consisted of A (water containing 0.1% formic acid) and B (acetonitrile). The mobile phase was delivered at a flow rate of 0.2 mL/min to a X-Bridge C-18 column (particle size: 3.5 µm; diameter: 2.1 mm; length: 10 cm) (Waters Corporation, Milford MA, USA). Different methods of elution were used for each drug [26]. The PB method consisted of a 20% constant rate of the B phase, and the total run time was 15 minutes [27, 28]. The VPA method was initiated with 6 minutes of 40% B phase, which was linearly increased to 100% B phase over 1 minute and was maintained at this concentration for 4 minutes [29]. The LEV method was initiated with 5% B phase, which was linearly increased to 20% B phase from minute 3 to 8 and was then maintained at this concentration for 2 minutes [30].

2.5. Anticonvulsant drug potency: AEDs doses and acute treatment

The dose of each AED was chosen based on its efficacy at suppressing seizures in other experimental models of epilepsy [27, 28, 30, 31]. The administered doses of each drug were: PB - 5, 10, 15 and 20 mg/kg; VPA - 100, 150, 300 and 500 mg/kg; LEV - 30, 50, 80 and 100 mg/kg. Each animal received different doses of the same AED 15 to 30 minutes before the stimuli. In the first week, the animals received the vehicle (0.9% saline, 0.001 mL/g of animal weight), and during the following testing weeks the animals received one dose per week for five weeks total. A fourth group of animals was added as a control and received saline instead of drug for all five stimuli. Drug potency comparisons were based on administered dosages and were determined at the individual time of the peak anticonvulsant effect. The median effective doses (ED_{50}) values for the various treatment outcomes were calculated following the method of Litchfield and Wilcoxon [32] in PSS PASW Statistical 18 (IBM).

2.6. Neuroethological study

2.6.1. Behavioral observation

The protocols consisted of three phases of behavioral observation: 1 minute pre-sound, 30 second of sound, and 3 minutes post-sound. All observation windows were recorded for further analysis (Figure 1).

2.6.2. Seizure severity indexes and neuroethological analysis

Three behavioral evaluations were used. The severity index (Table 1) was used to determine the intensity of the seizures [17, 18, 33]. The ataxia (Table 2) and sedation (Table 3) indexes were used to measure the toxic effects of the drugs on normal behavior [33, 34].

Table 1 around here

Table 2 around here

Table 3 around here

After each animal was scored using the cSI, we divided the animals into two groups for further analysis. Those with a cSI greater than or equal to 2 ($SI=0.23$) were considered as animals that maintained seizures, and those with a cSI lower than 2 were considered as animals in which the seizures were blocked. The behavioral sequences

observed during the different stimuli were assessed using neuroethological methods. Every behavior presented in a given time window was recorded, second by second, according to a dictionary of behavioral items (Table 4) described by Garcia-Cairasco *et al.*[18]. Once the data were obtained, the ETHOMATIC [17, 18] program was used for statistical analysis of the data. This program displays the mean frequency and mean duration of each behavioral item in the given observation window. The program also performs statistical analysis, verifying significant associations between pairs of behavioral items and calculating X^2 values. Flowcharts representing all of the statistically significant data were constructed using Microsoft Power Point 2011 (see Figure 1 for flowchart calibration).

Figure 1 around here

Table 4 around here

2.6.3. Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using SPSS PASW Statistical 18 (IBM) software. For comparisons between different the AEDs doses, we used the non-parametric Friedman test with Conover post-hoc comparisons [35].

3. Results

3.1. Pharmacology of the AEDs in GASH:Sal hamsters

3.1.1. Serum Levels

To determine the timing of the maximal levels of the drugs, we measured blood levels after the intraperitoneal administration of an effective anticonvulsant dose. The results obtained from the serum AED concentration analysis (Figure 2) show that the blood absorption and elimination of free PB in GASH:Sal hamsters is excessively fast, as non-detectable levels of the drug were recorded 30 minutes post-injection. VPA and LEV showed a similar kinetic profile, reaching the highest serum levels at 30 min post-injection, but had a low but still detectable drug blood concentration after 6 hours.

Figure 2 around here

3.1.2. Anticonvulsant effects

The three drugs have anticonvulsant effects at their peak plasma concentrations, i.e., 10 min (PB) or 30 min (VPA and LEV) after the i.p. injections (Figure 2). At low doses, AEDs modified the seizures (Figure 3) by prolonging the time of wild running, by suppressing the tonic-clonic phase, and by elongating the time of the post-ictal period. In the case of PB and VPA, the seizures completely vanished at the higher doses.

The anticonvulsant effect of PB was present at the smallest dose (5 mg/kg), at which approximately 33% of the animals did not present any of the components of an epileptic seizure. VPA had a 75% protective effect against seizure at the 300 mg/kg dose. PB and VPA generated anticonvulsant effects in accordance with increasing doses. LEV did not have a dose-dependent anticonvulsant effect, nor did it reach a maximum effect at any of the doses used. In fact, LEV achieved stronger protective effects (50-66%) at lower doses (30-50 mg/kg). LEV did not alter, or only very slightly altered, wild running at any of the doses used.

Figure 3 around here

All three drugs were evaluated for anticonvulsant potency as measured by the ED₅₀, the dose that completely blocks seizures in 50% of animals after stimulation. The dose of PB that produced 50% seizure blockade was 10 mg/kg. In the case of VPA, the calculated ED₅₀ was 225 mg/kg. LEV did not present a linear correlation between the decrease in seizures related to dose, but the ED₅₀ range was between 30 and 50 mg/kg.

3.2. Neuroethological study

3.2.1. Characterization of seizures in the GASH:Sal hamster

The seizures of the GASH:Sal hamster, as described by Muñoz and López [36], consist of generalized tonic-clonic seizures that can be divided into different phases, starting with (a) a behavioral arrest, followed by (b) a period of wild running, then (c) tonic-clonic convulsions, with (d) head ventral flexion, forelimb extension and hindlimb extension, and ending with (e) post-ictal immobility. The duration of the convulsive phases is 25.82 ± 2.44 sec.

The representative flowcharts of an acute (first) seizure in the GASH:Sal hamster are shown below in more detail (Figure 4). During the pre-sound window, the behavioral exploration cluster represents the main activity of the hamsters. Although the

animals did not have immobility periods, some isolated grooming behaviors were observed. During the sound-window, wild running began approximately 7 seconds post-stimulus. The third window began with a tonic seizure (TCV), followed by a behavioral cluster of generalized clonic seizures with hyperextensions (HP1 and HP2) and ended with post-ictal immobility (PIM).

Figure 4 around here

3.2.2. Characterization of the anticonvulsant effects of AEDs in the GASH:Sal hamster

At a dose of 5 mg/kg PB, 33,3% of the animals did not have seizures when stimulated. Animals treated with PB had reduced frequencies of the exploratory items and also had a reduced number of interactions between the different behaviors involved in this cluster (Figure 5). During the stimulus window, the animals maintained some of the wild running behavioral components, but there were no interactions between the components and the animals presented exploratory behavior for the remainder of the duration of the stimulus. During the last period, the animals maintained this exploratory behavior at a level lower than that of control animals. The animals that suffered a seizure at this dose differ from the control animals in the short presence of exploratory behaviors and in the convulsive cluster without hindlimb extension. At 10 mg/kg of PB, the animals with no seizure (66.6%) had an increased frequency of exploratory behavior in all three windows, with the presence of drug-related ataxic falling (ATF; orange symbol) in the pre-stimulus window. These animals maintained some wild running but had no interactions between the components. Some grooming behaviors appeared during the post-stimulus observation window. The seizures of the drug-treated animals differed from the control animals by a reduction in the interactions of all of the associated behaviors.

Figure 5 around here

Orofacial automatisms (ex: blinking eye) were present during the post-ictal period. At 15 mg/kg of PB, the animals that were seizure free displayed similar behavior to that of the 10 mg/kg of PB animals, except for the strong presence of grooming behavior during the post-stimulus period. Differences were noted in the animals that had seizures; they only presented wild running behavior items with high

interactions and there was an exploratory cluster of low frequency and duration during the stimulus window. At the 20 mg/kg doses, all the animals were seizure free in all of the observation windows, the principal behavioral cluster being exploratory with a high frequency of all the items. There was a high number of grooming behaviors at this dose. The cIS and the AI showed significant differences at all the doses in contrast to the vehicle (Figure 6).

Figure 6 around here

The neuroethological sequence (Figure 7) of the hamsters injected with VPA showed a clear-cut effect of the doses that had an anticonvulsant effect and those that did not. At the lower dose, 100 mg/kg, all the animals had seizures, and no differences were seen in the pre-stimulus window. When the stimulus began, some exploratory items accompanied the wild running behavior, which decreased the interactions between the different behaviors in the cluster. During the post-ictal immobility window, orofacial automatisms, such as eye-blinking and mastication, were observed. At the 150 mg/kg dose of VPA, some ataxic walking was observed and there was an increase in the interactions between the exploratory items in the stimulus window. After the exploration cluster, wild running was initiated and was followed by the regular phases of the seizure pattern. Additionally, automatisms were still present in the post-ictal phase and some ataxia was noted at this point. At 300 mg/kg VPA, 66.6% of the animals lacked seizures, the exploratory cluster decreased and the interactions were lower in all three windows. Once the sound finished, freezing behavior was observed, followed by exploration. The level of ataxia at this point was highly pronounced (Figure 8). At the higher dose, 500 mg/kg VPA, no animal had seizures, and the main behavioral cluster was exploratory. Some wild running behaviors were present but were not maintained as in the previous dose.

Figure 7 around here

The frequency and duration of the exploratory behavior were lower than normal, except for during the post-stimulus window, when they were accompanied by a marked ataxic walk (Figure 8).

Figure 8 around here

At a dose of 30 mg/kg LEV, 33.3% of the animals did not have seizures. As shown in the figure 9, the exploration clusters were affected in all three windows (lower frequency and duration), and interactions between the items were highly decreased when compared to the control group. As seen with the other AEDs, in the animals that had seizures there was an increase in the latency to wild running. At a LEV dose of 50 mg/kg, 50% of the animals lacked seizures and there was an increase in the interactions between the exploratory behaviors. Some grooming items were seen during the post-stimulus window. At the 80 mg/kg dose, 66% of the animals had complete seizures, but there was an increase in the latency period to wild running, and orofacial automatisms were present. At the final dose (100 mg/kg), 66% of the animals did not have seizures and the main component was the exploratory cluster in all three windows. No other cluster had a significant presence in the flowchart. In addition to the lack of an anticonvulsant effect, LEV also presented high toxicity effects, such as ataxia and sedation (Figure 10).

Figure 9 around here

Figure 10 around here

Discussion

Validation of the GASH:Sal hamster as a chronic model of generalized epilepsy may reveal the physiological and neurochemical changes that manifest in the epileptic brain. The present study shows that the anticonvulsant effects of PB and VPA, both with a similar profile, are dose-dependent and that PB and VPA have higher anticonvulsant potency than LEV in the GASH:Sal hamster seizure model. This result contributes to our understanding of the effects of AEDs.

In fact, an animal model of epilepsy is validated when in addition to being able to reliably reproduce the objective symptoms and EEG features of the epilepsy syndrome it is also able to respond to targeted pharmacological treatment. As an additional strategy to increase our understanding of the pathophysiology of epilepsy the GASH:Sal hamster has been observed to replicate generalized seizures [37] and to respond to treatment. As such, the GASH:Sal hamster serves as a useful tool for the design and evaluation of new AEDs.

Animal models of disease serve an indispensable function in identifying the biochemical basis of disease and aiding in the development of biological screening methods for molecules with the potential to suppress or stop disease progression. Organisms such as worms, flies, yeast or fish serve as a complementary approach to *in vitro* assays and are employed in a wide variety of studies, ranging from developmental and cellular processes to gene mapping and screening. One advantage of a rodent model is its repertoire of complex behaviors [38], therefore, it has long been the standard choice for pharmaceutical drug target validation. However, when choosing an appropriate model for AEDs screening, special attention must be paid to the processes underlying the epileptogenesis of a particular epilepsy syndrome. There is an extensive discussion about which types of models are the best for studying AEDs. The use of epilepsy models (e.g., Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg) or seizure models (e.g., maximal electroshock seizure) depends on the focus of the study [12]. Löscher (2002) [39] suggests that models resulting from spontaneous mutations, such as AS models, are preferred for drug development. The complexity of the epilepsies and the need for a better understanding of the mechanisms underlying them is reflected in the ongoing characterization and enhancement of animal models [11, 12, 39, 40].

When looking to the neuroethological evaluation of GASH:Sal of the current study we can see that in the pre-stimulus observation window, the hamsters were hyperactive with high levels of exploratory behavior, which is congruent with the normal anxious behavior of the species [41]. When the behavioral sequence of the drug-free hamsters group was observed, it was noticed that, with slight variations, the seizure pattern was quite standard. This is compatible with an already demonstrated stable inherited mutation associated with the epileptogenic circuits in the GASH-Sal inbred strain (36). Nevertheless, the minimal differences in latency and wild running were considered and explored, although they did not show statistical significance (data not shown), as if there was a kindling component consequence of repeated stimulation. Although this did not seem to be the case, the presence of kindling would naturally affect our interpretation of the effects of the AEDs on the behavioral sequences of the studied hamsters because all doses of a given drug were applied to the same animal but with sufficient time intervals between doses.

PB is one of the oldest AEDs used in the clinical treatment of epilepsy and has been validated in different animal epilepsy models [40]. PB is rapidly and completely

absorbed following i.p. administration. PB was the AED that had the highest range of anticonvulsant effect, and PB can block seizures in a dose-dependent manner from 5 to 20 mg/kg. With a dose of 10 mg/kg, only 33.33% of the animals seized, and they also showed a longer latency period, most likely due to the protective action of the drug. When the animals finished wild running, they continued to show exploratory behavior. These data indicate that PB at lower doses protects by avoiding the propagation of electric onset generated by the stimulus, possibly due to blockade of the Na^{2+} and Ca^{2+} channels [34, 42, 43]. At higher doses, PB fully blocks the seizure by enhancing the inhibition that is mediated by longer opening of the GABA-A channels, thereby decreasing the hyperactivity of glutamate and dopamine [44]. By increasing the PB dose, the animal's normal behavior (pre-stimulus window) was affected by the drug. Ataxic walking and falls, in conjunction with an increase in grooming behavior, accompanied the exploration, except at the highest dose (in which the hamsters had the highest level of ataxia).

In our study, which used a nonselective depressor of the nervous central system, we observed high levels of ataxia level, related to high doses of PB, mainly 15 and 20 mg/kg, but similar to Silva Brum and Elisabetsky [40] we did not observe any sedation, which is in contrast to other rodent models [34, 40, 45-47]. The presence of grooming behavior associated with toxic doses of PB needs further study because this behavior is extremely sensitive to pharmacological treatment and is recognized as a reliable marker of stress-related disturbances and, in some cases, is a useful model for studying the organization and neural mechanisms of movement sequences [48, 49].

VPA, one of the oldest classical anticonvulsant drugs, acts similarly to PB to enhance the inhibitory actions of GABA [29, 43, 44]. The administration of VPA causes an elevation of cerebral GABA levels in rodents [50], which coincides with the period of protection against AS [51]. In contrast, other authors have demonstrated that VPA induces anticonvulsant activity against AS and electroshock-induced convulsions at doses that are insufficient to raise brain GABA levels [52-54]. VPA blocks seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock and shows anti-kindling properties [55] in a variety of animal models. In our experimental conditions, the maximum plasmatic level was observed 15 minutes after intraperitoneal administration of the drug, which is in agreement with the results obtained in other animals [56, 57]. In our model, VPA only showed anticonvulsant activity at the highest dose, 300 mg/kg, and was accompanied by high levels of ataxia. We observed that animals with VPA at

doses below 300 mg/kg maintained some wild running elements despite not seizing. Furthermore, the ataxic effect starts at 150 mg/kg, showing high toxicity of this drug. At the same time it produces anticonvulsant effects it also produces ataxic walking. According to some authors, VPA has relatively low neurotoxicity in gerbils and rats, and, in mice, some sedation is seen at doses necessary to block convulsions [31, 58, 59]. The neurotoxic manifestation at anticonvulsant doses could be related to specific characteristics of the hamster species. There is extended information regarding the toxic effects of VPA in embryos, but there is a lack of information on the behavioral effects caused by VPA, mainly because of the low neurotoxicity seen in human adults [58].

LEV belongs to a group of nootropics drugs called racetams [60] that have anticonvulsant and neuroprotective properties [61], but have failed to reveal a generally accepted mechanism of action and usually show no affinity for the major receptors. LEV binds to the SV2A vesicle receptor in the cortex and hippocampus, increasing GABA [62] in addition to reducing the Ca^{2+} N type current [44, 62, 63]. In our study, the effect of LEV was not clear at any of the doses; indeed, at all doses there were animals that presented seizures. LEV is devoid of protective effects in acute seizure models [64] but exhibits anticonvulsant activity in a dose-dependent manner in chronic treatment AS animal models [65] and in kindling models [66]. Therefore, it would be useful to observe the effects of LEV in a chronic condition model to determine if LEV has anticonvulsant effects on the GASH:Sal strain. Moreover, LEV was the only AED that induced sedation with ataxia, which is not a surprising result as sedation and somnolence are commonly reported side effects for this AED [67, 68].

To completely determine the antiepileptic effect of the AEDs studied in these experiments, all the neuroethological data must be associated to electroencephalographic analysis. In the case of LEV, an EEG study could help us to understand the fluctuating effect of the drug at different doses. This would help to determine if the GASH:Sal hamster would be a good model for developing drugs with similar mechanisms of action.

Acknowledgements

Work supported by the Spanish JCyL (#SA023A12-2), Thematic Project FAPESP (2007/50261-4), CAPES Brazil-Spain (DGU 334/2010), PROEX-CAPES and CNPq and the USP/USAL Program for the Promotion of the Bilateral Cooperation in the Field

of Research (#2011-6) (2011.1.23386.1.3). NGC holds a Research Fellowship from CNPq-Brazil.

References

1. Fisher, R.S., et al., Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 2005. **46**(4): p. 470-2.
2. Berg, A.T., et al., Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 2010. **51**(4): p. 676-85.
3. Pitkanen, A. and K. Lukasiuk, Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2009. **14 Suppl 1**: p. 16-25.
4. Kaneko, S., et al., Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res*, 2002. **44**(1): p. 11-30.
5. Sgado, P., et al., Behavioral, neurochemical, and electrophysiological changes in an early spontaneous mouse model of nigrostriatal degeneration. *Neurotox Res*, 2011. **20**(2): p. 170-81.
6. Fuentes-Santamaria, V., et al., Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res*, 2008. **79**(2-3): p. 224-7.
7. Gjerstad, L. and E. Tauboll, [Epilepsy and genetics]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2003. **123**(19): p. 2731-4.
8. Steinlein, O.K., Channelopathies can cause epilepsy in man. *Eur J Pain*, 2002. **6 Suppl A**: p. 27-34.
9. Guerrini, R., G. Casari, and C. Marini, The genetic and molecular basis of epilepsy. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(7): p. 300-6.
10. Gurnett, C.A. and P. Hedera, New ideas in epilepsy genetics: novel epilepsy genes, copy number alterations, and gene regulation. *Arch Neurol*, 2007. **64**(3): p. 324-8.
11. Baraban, S.C., Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Curr Opin Neurol*, 2007. **20**(2): p. 164-8.
12. Schauwecker, P.E., The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res*, 2011. **97**(1-2): p. 1-11.
13. Fuentes-Santamaria, V., et al., Morphologic and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsia*, 2005. **46**(7): p. 1027-45.
14. Ross, K.C. and J.R. Coleman, Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(6): p. 639-53.
15. Faingold, C.L., Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv Neurol*, 1999. **79**: p. 311-21.
16. Fuentes-Santamaria, V., et al., Morphologic and neurochemical alterations in the superior colliculus of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res*, 2007. **75**(2-3): p. 206-19.
17. Garcia-Cairasco, N., et al., Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy & behavior : E&B*, 2004. **5**(4): p. 455-63.

18. Garcia-Cairasco, N., et al., Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research*, 1996. **26**(1): p. 177-92.
19. Garcia-Cairasco, N., et al., Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 1996. **53**(3): p. 503-10.
20. Furtado, M.A., et al., Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*, 2002. **43 Suppl 5**: p. 37-9.
21. Castro, O.W., et al., Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res*, 2011. **1374**: p. 43-55.
22. Etholm, L., et al., Seizure logging: A new approach to synchronized cable-free EEG and video recordings of seizure activity in mice. *Journal of neuroscience methods*, 2010. **192**(2): p. 254-60.
23. Dal-Cól, M.L.C., et al., Neuroethology application for the study of human temporal lobe epilepsy: From basic to applied sciences. *Epilepsy & Behavior*, 2006. **8**(1): p. 149-160.
24. Bertti, P., et al., The neurobiological substrates of behavioral manifestations during temporal lobe seizures: a neuroethological and ictal SPECT correlation study. *Epilepsy & behavior : E&B*, 2010. **17**(3): p. 344-53.
25. Picazo, M.G., P.J. Benito, and D.C. García-Olmo, Efficiency and safety of a technique for drawing blood from the hamster cranial vena cava. *Lab animal*, 2009. **38**(6): p. 211-216.
26. Contin, M., et al., Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(3-4): p. 461-5.
27. Moriyama, M., et al., Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999. **723**(1-2): p. 301-5.
28. Tang, M., C.E. Lau, and J.L. Falk, Serum phenobarbital and barbital concentrations in rats on a limited food regimen. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 1979. **11**(3): p. 359-61.
29. Cheng, H., et al., Quantification of valproic acid and its metabolite 2-propyl-4-pentenoic acid in human plasma using HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. **850**(1-2): p. 206-12.
30. Doheny, H.C., et al., Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy Res*, 1999. **34**(2-3): p. 161-8.
31. Chapman, A., et al., Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol*, 1982. **19**(4): p. 315-59.
32. Litchfield, J.T., Jr. and F. Wilcoxon, A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, 1949. **96**(2): p. 99-113.
33. Rossetti, F., et al., EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Research*, 2006. **72**(2-3): p. 192-208.

34. Löscher, W. and D. Hönack, Comparison of the anticonvulsant efficacy of primidone and phenobarbital during chronic treatment of amygdala-kindled rats. *Eur J Pharmacol*, 1989. **162**(2): p. 309-22.
35. Conover, W.J., Practical nonparametric statistics. 1971, 1980, New York.: Wiley.
36. Muñoz de la Pascua, L., & López, D.E., 2005. Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Ed. Muñoz de la Pascua, Luis. Salamanca, ISBN 13: 978-84-609-5027-1
37. Carballosa-González, M.M., Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH:sal, in Instituto de Neurociencias Castilla y León (INCyL). 2008, Universidad de Salamanca: Salamanca.
38. Nef, P., Key animal models for the identification and validation of drug targets. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2001. **6**(15 (Suppl.)): p. 91-96.
39. 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**(1-2): p. 105-23.
40. Silva Brum, L.F. and E. Elisabetsky, Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2000. **67**(3): p. 411-6.
41. Salvador, N., J. Guillén, and J.M. Peralta, Biología general y mantenimiento de las especies más utilizadas, in Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio, J.M. Zuñiga, J.M. Orellana, and J.A. Tur, Editors. 2008, Universidad de Alcalá, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL): Alcalá. p. 95-150.
42. Czuczwar, S.J., L. Turski, and Z. Kleinrok, Anticonvulsant action of phenobarbital, diazepam, carbamazepine, and diphenylhydantoin in the electroshock test in mice after lesion of hippocampal pyramidal cells with intracerebroventricular kainic acid. *Epilepsia*, 1982. **23**(4): p. 377-82.
43. Gilbert, T.H., S.M. Corley, and G.C. Teskey, Conventional anticonvulsant drugs in the guinea pig kindling model of partial seizures: effects of acute phenobarbital, valproate, and ethosuximide. *Exp Brain Res*, 2002. **146**(3): p. 336-44.
44. Werner, F.M. and R. Covenas, Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy: a focus on antiepileptic drugs. *Curr Med Chem*, 2011. **18**(32): p. 4933-48.
45. Gay, M.H., et al., Phenobarbital tolerance and physical dependence: chronically equivalent dosing model. *Eur J Pharmacol*, 1983. **95**(1-2): p. 21-9.
46. Munoz-Garcia, D., et al., Truncal ataxia in chronic anticonvulsant treatment. *Association with drug-induced folate deficiency and Neurotoxic effects*. 1982, **55**(3): p. 305-11.
47. Barco, J.A., et al., Anticonvulsant and neurotoxic effects of intracerebroventricular injection of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine in an amygdala-kindling model of epilepsy in the rat. *Epilepsy Res*, 1999. **33**(2-3): p. 159-67.
48. Whishaw, I.Q. and B. Kolb, eds. *The Behavior of the Laboratory Rat*. 2005, Oxford University Press: New York.
49. Kalueff, A.V., J.L. LaPorte, and C.L. Bergner, eds. *Neurobiology of Grooming Behavior*. 2010, Cambridge University Press: New York.

50. Godin, Y., et al., Effects of DI-n-propylacetate, and anticonvulsive compound, on GABA metabolism. *J Neurochem*, 1969. **16**(3): p. 869-73.
51. Simler, S., et al., Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain -aminobutyric acid level. *Biochem Pharmacol*, 1973. **22**(14): p. 1701-8.
52. Kerwin, R.W. and P.V. Taberner, The mechanism of action of sodium valproate. *Gen Pharmacol*, 1981. **12**(2): p. 71-5.
53. Anlezark, G., et al., Anticonvulsant action of ethanolamine-O-sulphate and di-n-propylacetate and the metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in mice with audiogenic seizures. *Biochem Pharmacol*, 1976. **25**(4): p. 413-7.
54. Kerwin, R.W., H.R. Olpe, and M. Schmutz, The effect of sodium-n-dipropyl acetate on gamma-aminobutyric acid-dependent inhibition in the rat cortex and substantia nigra in relation to its anticonvulsant activity. *Br J Pharmacol*, 1980. **71**(2): p. 545-51.
55. Leviel, V. and R. Naquet, A study of the action of valproic acid on the kindling effect. *Epilepsia*, 1977. **18**(2): p. 229-34.
56. Meinardi, H., et al., Absorption and distribution of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 1975. **16**(2): p. 353-65.
57. Schobben, A.F.A.M., Pharmacokinetics and therapeutics in epilepsy (Dissertation).1979, University of Nijmegen: Nijmegen the Netherlands.
58. Abbott, F.S. and A.A. Acheampong, Quantitative structure-anticonvulsant activity relationships of valproic acid, related carboxylic acids and tetrazoles. *Neuropharmacology*, 1988. **27**(3): p. 287-94.
59. Loscher, W., et al., Comparative evaluation of anticonvulsant and toxic potencies of valproic acid and 2-en-valproic acid in different animal models of epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 1984. **99**(2-3): p. 211-8.
60. Lim, L.L. and A. Ahmed, Limited efficacy of levetiracetam on myoclonus of different etiologies. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. **11**(2): p. 135-7.
61. Gualtieri, F., et al., Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs. *Curr Pharm Des*, 2002. **8**(2): p. 125-38.
62. Boido, D., et al., Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. *Neuroscience*, 2010. **171**(1): p. 268-83.
63. Luszczki, J.J., Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. 2009.
64. Loscher, W. and D. Schmidt, Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*, 1988. **2**(3): p. 145-81.
65. Loscher, W., D. Honack, and C. Rundfeldt, Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **284**(2): p. 474-9.
66. Silver, J.M., C. Shin, and J.O. McNamara, Antiepileptogenic effects of conventional anticonvulsants in the kindling model of epilepsy. *Ann Neurol*, 1991. **29**(4): p. 356-63.
67. Gower, A.J., et al., ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol*, 1992. **222**(2-3): p. 193-203.
68. Gower, A.J., et al., Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy. *Epilepsy Res*, 1995. **22**(3): p. 207-13.

Table 1. Seizure Index (SI), according to Garcia-Cairasco et al. [18] using the behavioral descriptions and categorized Severity Index (cSI) transformed into discreet variables for statistical purposes. Taken from Rossetti *et al.* [33].

SI	Seizure behaviors	cSI
0.00	No seizures	0
0.11	One wild running	1
0.23	One wild running (running plus jumping plus atonic fall)	2
0.38	Two wild runnings	3
0.61	Tonic convulsion (<i>opisthotonus</i>)	4
0.85	Tonic seizures plus generalized clonic convulsions	5
0.90	Head ventral flexion plus cSI5	6
0.95	Forelimb extension plus cSI6 ^a	7
1.00	Hindlimb extension plus cSI6 ^a	8

^aCategories, which are generally followed by hindlimb clonic convulsions (CCV2).

Table 2. Ataxia Index (AI) scores according to Löscher and Hönack [34]. Taken from Rosetti *et al.*[33].

Score	Behaviors
1	Slight ataxia in hindleg (tottering of hind quarters), no decrease in abdominal muscle tone
2	More pronounced ataxia with dragging of hind legs and slight decrease of muscle tone
3	Further increase in ataxia and more pronounced dragging of hindlegs and decrease in muscle tone
4	Marked ataxia, animals lose balance during forward locomotion, total loss of abdominal muscle tone
5	Very marked ataxia with frequent loss of balance during locomotion, loss of abdominal muscle tone

Accepted

Table 3. Sedation Index (SdI) scores according to Lösher and Hönack [34]. Taken from Rosetti *et al.* [33].

Score	Behaviors
1	Slightly reduced forward locomotion
2	Reduced locomotion with rest periods in between (partly with closed eyes)
3	Reduced locomotion with more frequent rest periods
4	No forward locomotion, animal sits quietly with closed eyes

Accepted

Table 4. Behavioral Dictionary

Acronym	Behavior	Acronym	Behavior
AF	Atonic Fall	GRH	Grooming of Head
ATF*	Ataxic Fall	GRHL	Grooming of Head, Left
BE	Blinking Eyes	GRL	Grooming of Body, Left
BRL	Barrel Rolling, Left	GRN	Grooming of Neck
BRR	Barrel Rolling, Right	GRR	Grooming of Body, Right
CCV1	Clonic Convulsions (forelegs)	HFL	Head Ventral Flexion
CCV2	Clonic Convulsions (hindlegs)	HP ₁	Forelimb Extensions
CCVg	Clonic Convulsions (generalized)	HP ₂	Hindlimb extensions
CVL1	Clonic Convulsions (forelegs - left)	IM	Immobility
CVL2	Clonic Convulsions (hindlegs - left)	JP	Jumping
DYS	Dyspnea	LI	Licking
ER	Erect Posture	LIC	Licking of Claws
EXC	Excretion of Feces and Urine	MT	Masticatory Movements
EXT	Extended Posture	PIM	Postictal Immobility
FR	Freezing Posture	RU	Running
GL	Gyrating, Left	SC	Scanning
GN	Gnawing	SN	Sniffing
GR	Gyrating, Right	TCP	Tachypnea
GRB	Grooming	WA	Walking
GRF	Grooming of Face	WDS	Wet Dog Shaking
GRG	Grooming of Genitals		

***Observation:** The behavioral item Ataxic Fall (ATF) was created to show the presence of the toxic effect of drugs on motor behavior.

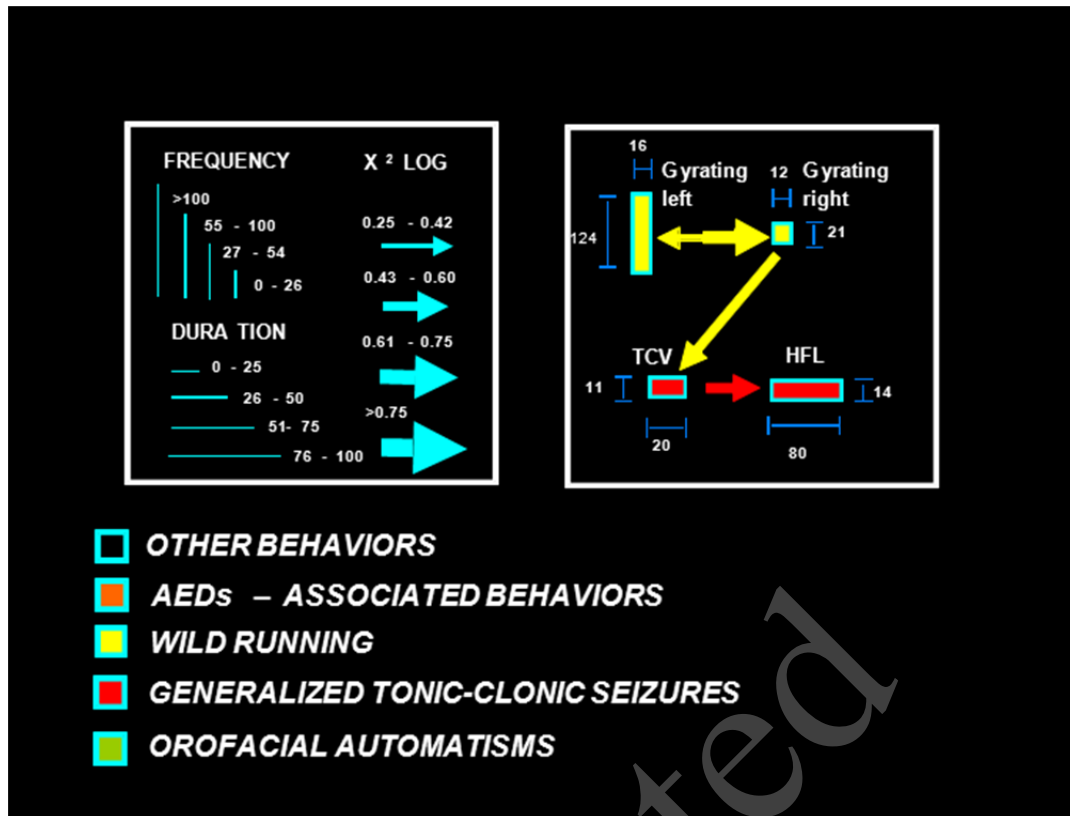


Figure 1. Flow-charts illustrating the graphical and statistical aspects of the observed behaviors. The frequency and time spent performing each behavior are proportional to the height and width of the rectangle, respectively. The arrow width and direction indicate the statistical intensity and preference association between two items.

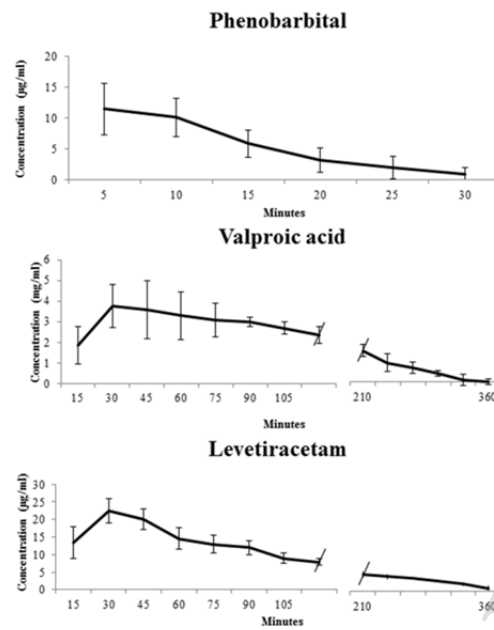


Figure 2. Serum concentration levels at various extraction times following the intraperitoneal injection of the AEDs (A) PB (10 mg/kg), (B) VPA (500 mg/kg) and (C) LEV (100 mg/kg). Each point is the mean (\pm S.E.M.) of 5 animals.

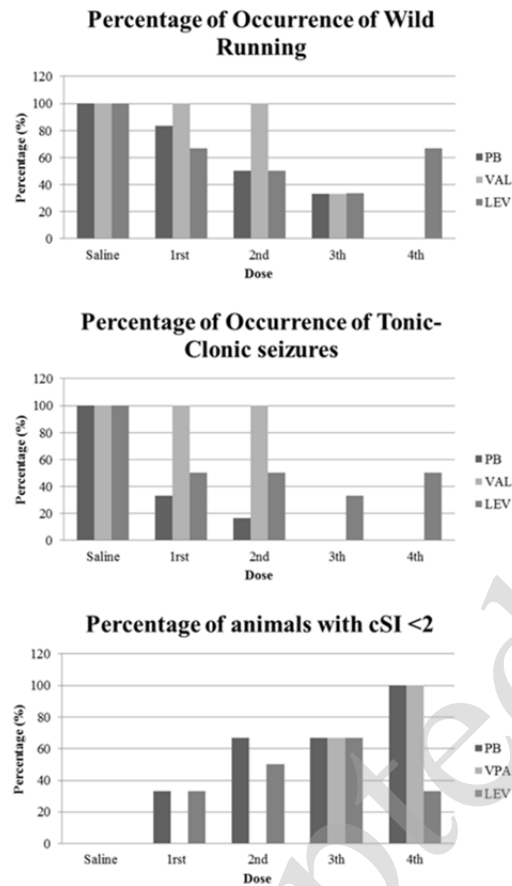


Figure 3. Percentage of animals that exhibited (A) wild running and (B) tonic-clonic convulsions under the effects of the AEDs. (C) The percentage of animals lacking seizures at the different doses (n=6). PB (5, 10, 15, and 20 mg/kg), VPA (100, 150, 300, and 500 mg/kg) and LEV (30, 50, 80, and 100 mg/kg).

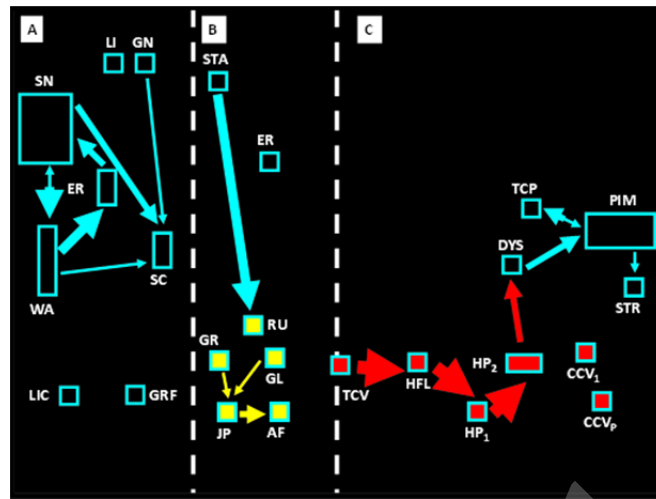


Figure 4. Characteristic flowchart of the behavioral sequences of the first seizure with no AEDs in GASH:Sal hamsters (n=24). (A) Pre-sound window, (B) sound window, and (C) post-sound window. See behavioral descriptions in Table 4.

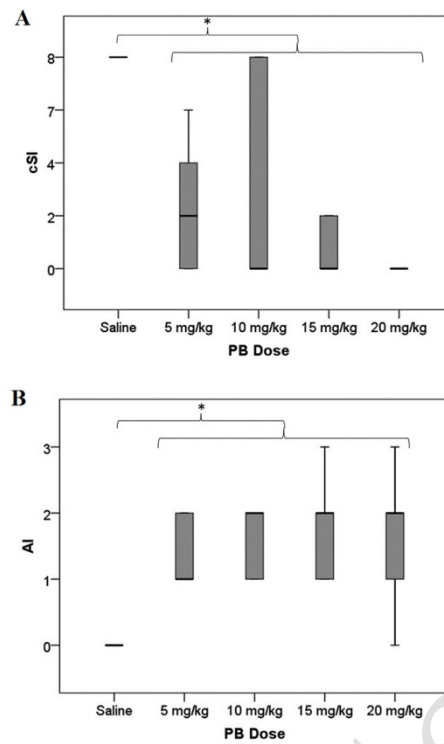


Figure 6. Box plots with A) the categorized seizure severity index (cSI), and B) the ataxic index (AI) at the different doses of Phenobarbital (PB).

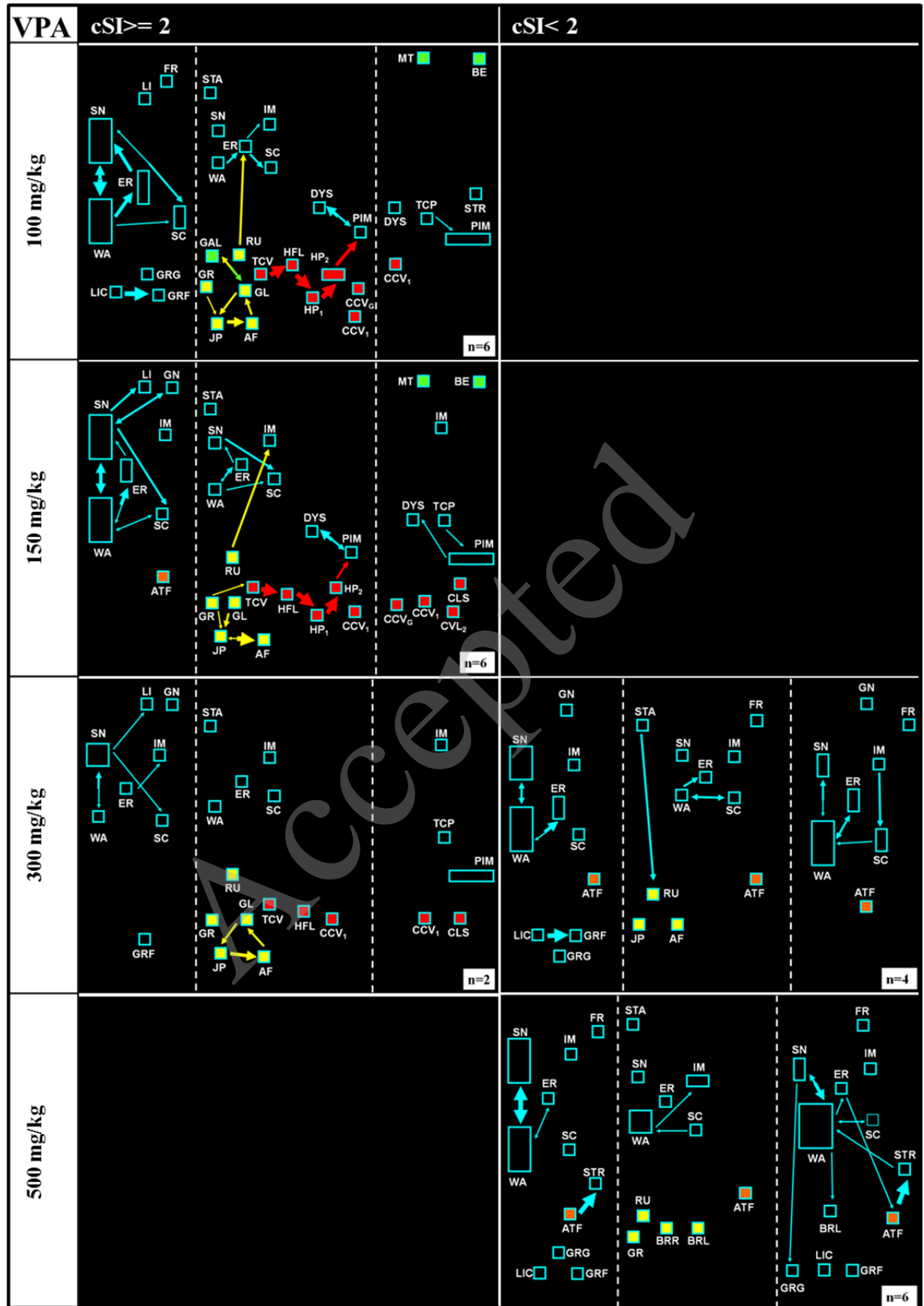


Figure 7. Flowchart of the behavior of the GASH:Sal hamsters injected with different doses of VPA.

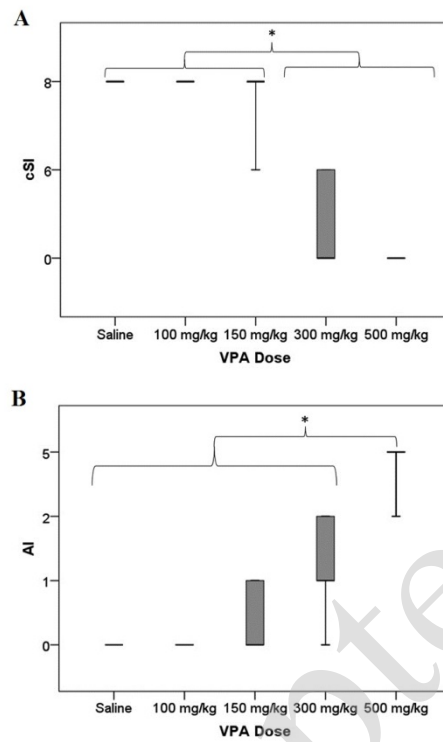


Figure 8. Box plots showing: A) the categorized seizure severity (cSI), and B) the ataxic index (AI) at the different doses of VPA.

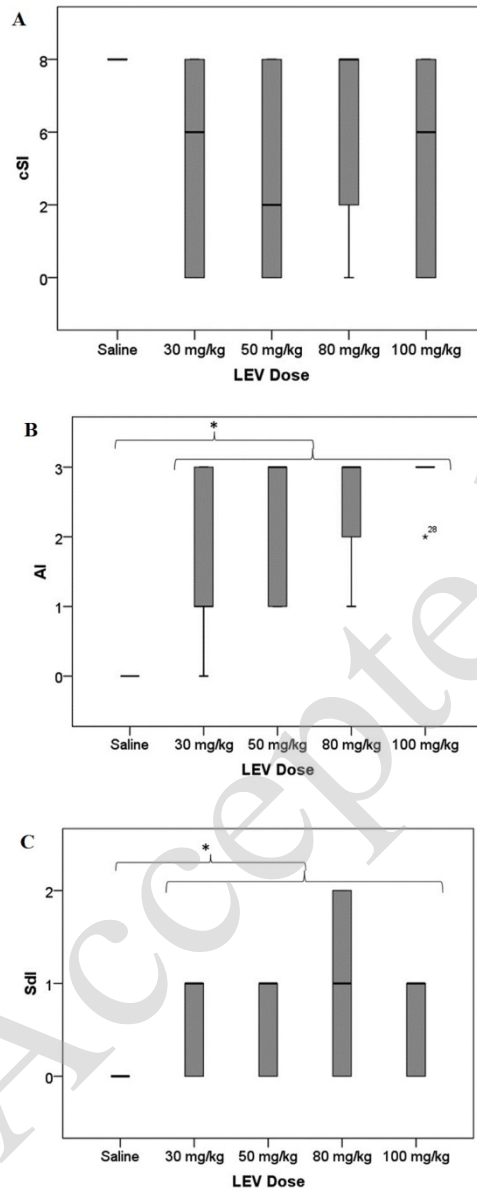


Figure 10. Box plots of A) the categorized seizure severity (cSI), B) ataxic (AI), and C) sedation (SdI) indexes of the different doses of LEV.

CHRONIC ADMINISTRATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS INTO THE GENETIC AUDIOGENIC SEIZURE HAMSTER (GASH:SAL): A PHARMACOLOGICAL AND NEUROETHOLOGICAL STUDY

B. Barrera-Bailón¹, J.A.C. Oliveira², D.E. López^{1,3}, L.J. Muñoz⁴, N. Garcia-Cairasco², C. Sancho^{1,5}

(1) Institute of Neurosciences of Castilla and León/IBSAL. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

(2) Physiology Department. Ribeirão Preto School of Medicine. University of São Paulo. Ribeirão Preto (Brazil)

(3) Department of Cell Biology and Pathology. School of Medicine. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

(4) Animal Research Service. University of Salamanca, Salamanca (Spain).

(5) Department of Physiology and Pharmacology. School of Medicine. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

Corresponding author:

Consuelo Sancho Sánchez : sanchoc@usal.es

CHRONIC ADMINISTRATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS INTO THE GENETIC AUDIOGENIC SEIZURE HAMSTER (GASH:SAL): A PHARMACOLOGICAL AND NEUROETHOLOGICAL STUDY

Abstract

Animal models of seizures and epilepsy have played a crucial role in our understanding of the physiological and behavioral disturbances associated with human epilepsy but most of the studies of antiepileptic drugs before clinic trials are made in models of epileptic seizures in which seizures are inflicted and do not had a basis dysfunction prone to epilepsy. In this study we characterize the possible antiepileptic action of PB, VPA and LEV on chronic treatment in the hamster GASH:Sal, by determining the anticonvulsant protection and by characterized the neuroethology of epileptic crisis under the influence of the used AEDs. No anticonvulsive effects were seen on Levetiracetam and Valproico Acid after 30 days of treatment, but in the case of Phenobarbital was seen at 60 mg/kg/day. Ataxia and sedation were observed in all three treatments, exerting the highest adverse effect the Levetiracetam, follow by the Valproic Acid.

Keywords:, antiepileptic drugs, audiogenic epilepsy, Levetiracetam, neuroethology, pharmacokinetics, Phenobarbital, Valproic acid,

Running Title: Chronic study of AED in a model of epilepsy

1. Introduction

Epilepsy is a complex chronic neurological disorder characterized by persistent predisposition to suffer recurrent epileptic seizures (Berg et al., 2010; Fisher et al., 2005). After stroke, epilepsy is the most common serious neurological disorder worldwide, affecting approximately 1 to 3% of the world population (Kaneko et al., 2002; Pitkanen and Lukasiuk, 2009). The acute audiogenic seizures (AS) are a type of generalized seizures that belong to the group of reflex epilepsies, which affects 4-7% of patients with epilepsy. They are characterized by being triggered by an unexpected stimulus (auditory, visual or somatosensory) (Fernandez et al., 2011; Panayiotopoulos, 2005; Striano et al., 2012). AS require activation of brainstem auditory pathways, in which seizures are initiated largely at the level of the midbrain inferior colliculus (Ross and Coleman, 2000).

One of the newest approaches to study epilepsy is neuroethology (Tejada et al., 2013). Neuroethological studies combine ethology, comparative behavior studies, and neurophysiology or neurobiology (Berti et al., 2010), and these are based on the principle that evaluation of behavioral sequences is more consistent than studies of isolated behaviors (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004). Neuroethology has been used to characterize epilepsy models such as acute and chronic audiogenic seizures in rats (Garcia-Cairasco et al., 1996a), models of systemically and intra-hipocampal applied pilocarpine (Castro et al., 2011; Furtado et al., 2002), knockout mice for synapsin (Etholm et al., 2010), and also in temporal lobe epilepsy patients (Berti et al., 2010; Dal-Cól et al., 2006).

Animal models of seizures and epilepsy have played a crucial role in our understanding of the physiological and behavioral disturbances associated with human epilepsy. Most of the studies of antiepileptic drugs (AEDs) before clinic trials are made in model of epileptic seizures (maximum electric shock, pentylenetetrazole (White 1997), not on models of epilepsy, which implied that the anticonvulsive effects of AEDs are not seen in a brain that has a basis dysfunction prone to epilepsy (genetic models and kindling models), which would change the efficacy and toxicity of the drugs. Similarly, chronic studies of AEDs in epilepsy models are important and necessary because they help to characterize the anticonvulsant potential and spectrum of activity of the AED (Löscher, 2011). The chronic models are extensive used to understating the processes leading to epilepsy by facilitating the identification of the cellular and molecular mechanisms of progressive consequences of epilepsy, which will offer new targets for new AEDs (Löscher, 2002).

The strain GASH:Sal is a rodent model that exhibits generalized tonic-clonic seizures of genetic origin in response to sound stimulation (Carballosa-González, 2008; Fuentes-Santamaria et al., 2005; Fuentes-Santamaria et al., 2007; Muñoz de la Pascua and López, 2005; Prieto-Martin et al., 2012). As a part of the validation process of this strain, we performed a screening of the anticonvulsant activity of two classic AEDs Phenobarbital (PB) and Valproic acid (VPA), and, a second generation of AED, Levetiracetam (LEV). The goal of this study is to characterize the possible antiepileptic action of PB, VPA and LEV on chronic treatment in the hamster GASH:Sal, by determining the anticonvulsant protection and by describing the neuroethology of epileptic crisis under the influence of the used AEDs.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Two months old male GASH:Sal hamsters were obtained from the inbred strain of the Animal Experimentation Service of the University of Salamanca (USAL, Spain) and kept during the experiments in the animal house from the Institute of Neuroscience of Castilla and León (INCYL) of the USAL. We use 5 males for each drug and 6 animals untreated for the control group. The experimental animals were handled and cared according to the Guidelines of the European Communities Council Directive (2010/63/UE) and the current Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (RD 53/2013, BOE 8/02/2013), under the supervision of the corresponding Institutional Animal Care and Use Committee. All efforts were made to avoid unnecessary animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Acoustic stimuli

The stimuli application was made in a cylindrical acrylic arena (height: 50 cm; diameter: 37 cm). The sound of shaking keys was recorded with a high pass filter (>500 Hz; microphone Bruel & Kjaer #4134 and preamplifier Bruel & Kjaer #2619), digitalized above 4 KHz, and reproduced by a computer coupled to an amplifier (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) and a tweeter (Beyma T2010, Valencia, Spain) in the upper side of the cage. The final sound was a semi-random sound of 0-18 kHz with an intensity of 115 to 120 dB.

2.3. Antiepileptic drug used

Three AEDs were used for these experiments: PB (Luminal®, Kern Pharma), VPA (Depakine®, Sanofi Aventis) and LEV (Kepra®, UCB Pharma).

2.4. Chronic treatment

For chronic treatment, two-separated group of animals was used for each AED, successively. Each treatment had duration of 30 days. The starting dose was calculated from the ED50 (Barrera-Bailón et al., 2013) determined in our model and the estimated oral bioavailability from other rodent species of each AED. On the first group, the AED were administrated on the drinking water with 1% sucrose; the dose was calculated according with the weight and by the quantity of daily water intake, which were measured every three days. On the second group, the AED were dissolved in diluted honey in distilled water, and was administrated directly in the mouth twice a day with a pipetman, according with the weight of each animal. In both groups, the doses used were increased every two weeks, according to the response of the animals to the drug, given the efficiency in annulling the seizure and the toxic effects. In the first group, the doses used were PB: 20 and 40 mg/kg/day; VPA: 150 and 300 mg/kg/day; LEV: 50 and 100 mg/kg/day. In the second group, the doses used were: PB: 40 and 60 mg/kg/day; VPA: 300 and 600 mg/kg/day; LEV: 100 and 150 mg/kg/day.

Before start the treatment, all animal were stimulated once to observe the crisis without influence of the AEDs; then, the audiogenic seizures were recorded every week to see the effect of the AEDs. To discard any hypothetic new behavior due to kindling, a fourth control group was added to the study. The results showed in the flow charts belong to the second group of the chronic treatment. The results of the first treatment group are not shown, since there was no response

2.4.1. Behavioral observation

Each stimulus consisted on three behavioral observation windows: 1 minute pre- sound, one minute of sound or until opisthotonus occur, and 3 minutes post- sound in the case of seizure occurrence or 1 minute in the case that no seizure occurs. All observation windows were recorded for further analysis (Figure1).

2.4.2. Behavior indexes and neuroethological analysis

Three behavioral evaluations were used. The severity index (Table 1) was used to determine the severity of the seizures (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004; Rossetti et al., 2006). The ataxia (Table 2) and sedation (Table 3) indexes were used to measure

the toxic effects of the drugs on normal behavior (Löscher and Honack, 1989; Rossetti et al., 2006).

Table 1. Severity Index (SI) (Garcia-Cairasco et al., 1996b) using the behavioral descriptions and categorized Severity Index (cSI) transformed into discreet variables for statistical purposes. Taken from Rosetti *et al.* (2006)

SI	Seizure behaviors	cSI
0.00	No seizures	0
0.11	One wild running	1
0.23	One wild running (running plus jumping plus atonic fall)	2
0.38	Two wild runnings	3
0.61	Tonic convulsion (<i>opisthotonus</i>)	4
0.85	Tonic seizures plus generalized clonic convulsions	5
0.90	Head ventral flexion plus cSI5	6
0.95	Forelimb extension plus cSI6 ^a	7
1.00	Hindlimb extension plus cSI6 ^a	8

^aCategories are generally followed by hindlimb clonic convulsions (CCV2).

Table 2. Ataxia Index (AI) scores according to Löscher and Hönack (Löscher and Hönack, 1989). Taken from Rosetti *et al.* (2006)

Score	Behaviors
1	Slight ataxia in hindleg (tottering of hind quarters), no decrease in abdominal muscle tone
2	More pronounced ataxia with dragging of hind legs and slight decrease of muscle tone
3	Further increase in ataxia and more pronounced dragging of hindlegs and decrease in muscle tone
4	Marked ataxia, animals lose balance during forward locomotion, total loss of abdominal muscle tone
5	Very marked ataxia with frequent loss of balance during locomotion, loss of abdominal muscle tone

Table 3. Sedation Index (SdI) scores according to Löscher and Hönack (Löscher and Honack, 1989). Taken from Rosetti *et al.* (2006)

Score	Behaviors
1	Slightly reduced forward locomotion
2	Reduced locomotion with rest periods in between (partly with closed eyes)
3	Reduced locomotion with more frequent rest periods
4	No forward locomotion, animal sits quietly with closed eyes

After scoring each animal using the cSI, we divided the animals into two groups for further analysis. Those with a cSI greater than or equal to 2 (SI=0.23), were considered as animals that maintained a seizure, and those with a cSI lower than 2 were considered as animals in which the seizure was blocked. The behavioral sequences observed during the different stimuli were assessed using neuroethological methods. Every behavior presented in a given time window was recorded, second by second, according to a dictionary of behavioral items (Table 4) described by Garcia-Cairasco (Garcia-Cairasco et al., 1996b).

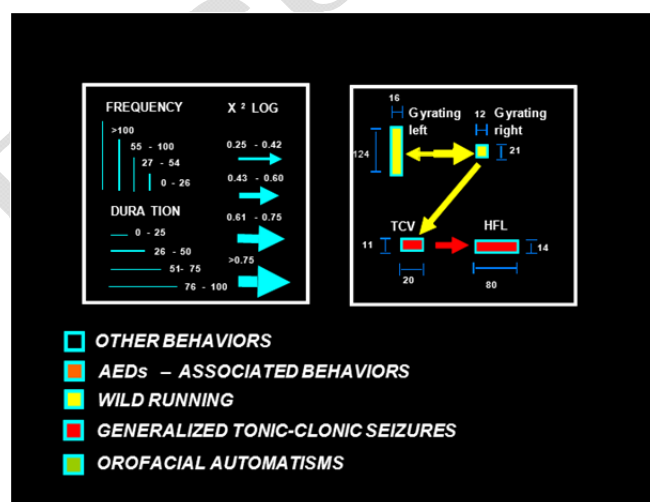


Figure 1. Flow-charts illustrating the graphical and statistical aspects of the observed behaviors. The frequency and time spent performing each behavior are proportional to the height and width of the rectangle, respectively. The arrow width and direction indicate the statistical intensity and preference association between two items.

Table 4. Behavioral Dictionary

Acronym	Behavior	Acronym	Behavior
AF	Atonic Fall	GRH	Grooming of Head
ATF*	Ataxic Fall	GRHL	Grooming of Head, Left
BE	Blinking Eyes	GRL	Grooming of Body, Left
BRL	Barrel Rolling, Left	GRN	Grooming of Neck
BRR	Barrel Rolling, Right	GRR	Grooming of Body, Right
CCV1	Clonic Convulsions (forelegs)	HFL	Head Ventral Flexions
CCV2	Clonic Convulsions (hindlegs)	HP1	Forelimb Extensions
CCVg	Clonic Convulsions (generalized)	HP2	Hindlimb extensions
CVL1	Clonic Convulsions (forelegs - left)	IM	Immobility
CVL2	Clonic Convulsions (hindlegs - left)	JP	Jumping
DYS	Dyspnea	LI	Licking
ER	Erect Posture	LIC	Licking of Claws
EXC	Excretion of Feces and Urine	MT	Masticatory Movements
STR	Straighten	PIM	Postictal Immobility
FR	Freezing Posture	RU	Running
GL	Gyrating, Left	SN	Sniffing
GN	Gnawing	TCP	Tachypnea
GR	Gyrating, Right	WA	Walking
GRB	Grooming	WDS	Wet Dog Shaking
GRF	Grooming of Face	NOD	Nodding
GRG	Grooming of Genitals	TCV	Tonic Clonic Convulsions
STA	Startle		

***Observation:** The behavioral item ataxic fall (ATF) was created to show the presence of the toxic effect of drugs on motor behavior.

Once the data were obtained, the ETHOMATIC (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004) program for statistical analysis was used to analyze the data. This program displays the mean frequency and mean duration of each behavioral item in the given observation window. The program also performs statistical analysis, verifying significant associations between pairs of behavioral items and calculating X^2 values. Flowcharts representing all of the statistically significant data were constructed using Microsoft Power Point 2011 (see Figure 1 for flowchart calibration).

2.5.3. Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using SPSS PASW Statistical 18 (IBM) software. For comparisons between different the AEDs doses, we used the non-parametric Friedman test with Conover post-hoc comparisons (Conover, 1971, 1980).

2.5. Pharmacology of the AEDs

2.5.1. Brain extraction and sample preparation

The right hemisphere of two animals with AED chronic treatment was collected after euthanasia with overdose of Pentobarbital. The sample was frozen with liquid nitrogen and store until used. The tissue was weight before been mechanical sonicated by Politron® with 2 ml of Perchloric acid 0.1 M, and then centrifuged at 13000g for 15 minutes. The supernatant was collected, placed in a new tube and to it the internal standard (in known concentration), 50 mg of alumina, 100 µl of 5 mM sodium metabisulfite and 800 µl of 10 mM Tris-1mM EDTA pH 8 were added. Once vortex and agitated during 10 min, the mix was centrifuged at 11,000 g for 5 min. The supernatant was discarded in the case of PB, and in the case of LEV and VPA was analyzed by HPLC. For PB the pellet (alumina) was washed twice with MilliQ water, and centrifuged at 11000 for 1:30 minutes after each wash. 200 µl of methanol were added to elute the amines, vortex and centrifuge at 11000 for 1:30 min. The final supernatant was analyzed by HPLC. All reagents for the HPLC were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.5.2. Blood extraction and sample preparation

Blood samples were extracted at the first and fourth week. Blood was extracted from the cranial vena cava according to the procedure described by Picazo et al., (2009) under anesthesia by inhalation (induction: 4% isoflurane and 1 l/min O₂, maintenance: 3% isoflurane and 0.4 l/min O₂). At each time point, 100 µl of blood was extracted and the animal was rehydrated with 150

µl of 0.9% saline. The serum analysis for HPLC/MS was realized according with procedure of Barrera-Bailón et al., (2013) The IS used were: 25 µg/ml acetanilide (Merck, Darmstadt, Germany) for PB, 50 µg/ml octanoic acid (Panreac) for VPA and 4 µg/ml caffeine (LiChro test standard, Merck) for LEV.

2.5.3. Drug concentration HPLC analysis

The drug concentrations were determined using HPLC/MS at the General Service of Mass Spectrometry of the USAL. The equipment used for analysis of the samples included an Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) for the HPLC assay and an Agilent trap XCT (Agilent Technologies) for the mass spectrophotometric assay. The mobile phase consisted of A (water containing 0.1% formic acid) and B (acetonitrile). The mobile phase was delivered at a flow rate of 0.2 ml/min to a X-Bridge C-18 column (particle size: 3.5 µm; diameter: 2.1 mm; length: 10 cm) (Waters Corporation, Milford MA, USA). The isocratic methods used for the HPLC/M analysis are described in Barrera-Bailón et al., (2013).

3. Results

3.1. Blood and brain concentrations of AEDs in chronic treatment

Blood samples and brain tissue were analyzed by HPLC to determine the concentration of AED in two different weeks after the beginning of the treatment, the first and the fourth week. In the case of PB blood concentration in the first week was 8.83 ng/ml (+/- 2.76 S.E.M) and in the fourth week was 0.013 ng/ml (+/- 0.014 S.E.M). PB brain concentration at the end of treatment was 0,15 (+/- 0.05 S.E.M) ng/ml. In the case of VPA in the first week blood concentration was 2956.81 ng/ml (915.29 S.E.M), and in the fourth, the concentration was 9209.12 ng/ml (+/- 5236.01 S.E.M), VPA brain concentration: 2.2 ng/ml (+/- 0.75 S.E.M). LEV show in the first week a blood concentration of 7.92 ng/ml (+/- 1.36 S.E.M), and 25.90 ng/ml (+/- 9.27 S.E.M) on the fourth week, LEV brain concentration was not possible to detect in the preformed assays.

3.2. Neuroethology

We analyze the behavior of the hamster after sound stimulation, in the control group (n=6) (figure 4). On the first stimulus, exploratory behavior is observed in the pre- stimulus window, mainly walking and sniffing. In the stimulus window it can be clearly seen the sequence of the seizure, starting with the startle, follow with wild running behaviors, trough tonic-clonic

convulsions, which mark the beginning of the third window (post-stimulus). The seizure continues with hyperextensions of head and limbs and the clonic phase, finishing with long post-ictal immobility period, only interrupted by the straighten reflex. Although Control animals did not show significant differences between the 5 successive sound-stimuli, some variations can be observed. On the pre-stimulus window some grooming behaviors increase, and the items licking and gnawing decrease. In the stimulus window, from the second stimulus, exploratory behaviors begin to appear, that increase with successive stimuli, but the seizure stereotype is of seizure keep intact. The duration of the components of the seizure (pre-seizure latency, wild running, tonic clonic convulsions, hyperextensions and post- ictal immobility till straighten) remain with no important differences (figure 3).

Characteristic flowchart of the behavioral sequences of the first seizure (with no AEDs), in the animals who will receive the drug (n=15), is identical to that of the control animals (figure 4)

PB was the only AED that shown any anticonvulsive action in chronic treatment in the GASH:Sal, in the fourth week of treatment, with the higher dose (figure 5). On the first week of treatment the animals had low toxicity and decreased in the severity index (figure 7), in the flowcharts it can be notice how the interaction on the convulsive behavior is lower and the limbs hyperextensions are annulled, also some exploratory behavior are present during the stimulus. As the time past the exploratory behaviors reduced in frequency and duration, as the interaction between those items, which is correlated with the increment of ataxia and sedation. On the third week, the dose was increased to 60 mg/kg/day, some animals lack of seizure and all that can be seen is exploration items, but in a low frequency and duration, On the fourth week none of the animals had seizures, maintaining the same level of toxicity that the lower doses. We can estimate an oral ED50 of PB around 60 mg/kg/day.

With the doses used for VPA and LEV the seizures were not annulled and the severity index (figure 7) maintain at the maximum value (cSI=8). On the case of VPA, the exploratory behaviors in the pre-stimulus windows (figure 6A) do not vary in duration and frequency, but as weeks past the grooming behavior increased. Even though, ataxia and sedation increased to really reduced locomotion and pronounce loss of muscle tone in hind legs, mostly seen from the second week (figure 7). In the stimulus window no variation was seen till the third week went after the startle there is no direct correlation to the wild running, but the wild running cluster has a more intricate and strong correlation between it items.

LEV also fails in decreasing the convulsive behavior (figure 6B). The pre- stimulus window evolve from a very active exploratory and grooming behaviors (in frequency and correlation) to a just exploratory cluster, were the main behavior, sniffing, increased in duration, nonetheless the correlation between behavioral items is highly reduced. From the first week to the end the seizure do not vary, some exploratory items are seen in the stimulus window and both clusters, exploratory and wild running, interact diminishing the interaction between wild running behaviors. LEV was the AED that score the higher values of ataxia and sedation, increasing by each passing week (figure 7).

The three AED affect the natural weight growth of the GASH:Sal. As the growth of the animals treated with PB had a slightly decreased rate growth in comparison with the control group during the 30 days of the experiment, weight fluctuation was seen in the case of VPA and LEV (figure 8). Control animal growth 20g in average during the thirty days. PB treated animal star by losing weight during the first week and start a slow grow through the treatment duration, but they did not grow more than 10g in comparison with the first measure. VPA affect the growth, the animal did not increase more than 5g from the begging to the end of the treatment. In the case of LEV, no important grow was seen till 24 days after the treatment begging, went the most toxic effects were observed (figure 7), and in the last measurement an important decrease of weight was notice.

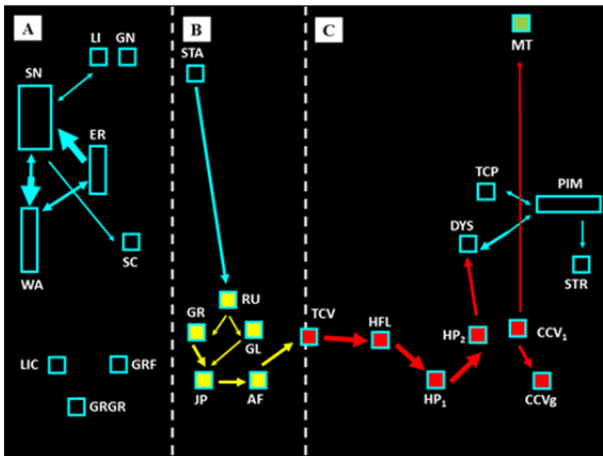


Figure 2. Characteristic flowchart of the behavioral sequences of the first seizure with no AEDs in GASH:Sal hamsters (n=21). (A) Pre-sound window, (B) sound window, and (C) post-sound window. See behavioral descriptions in Table 4.

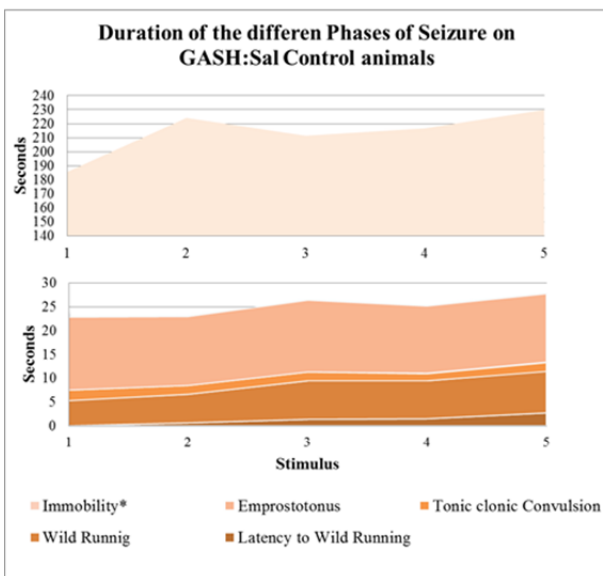
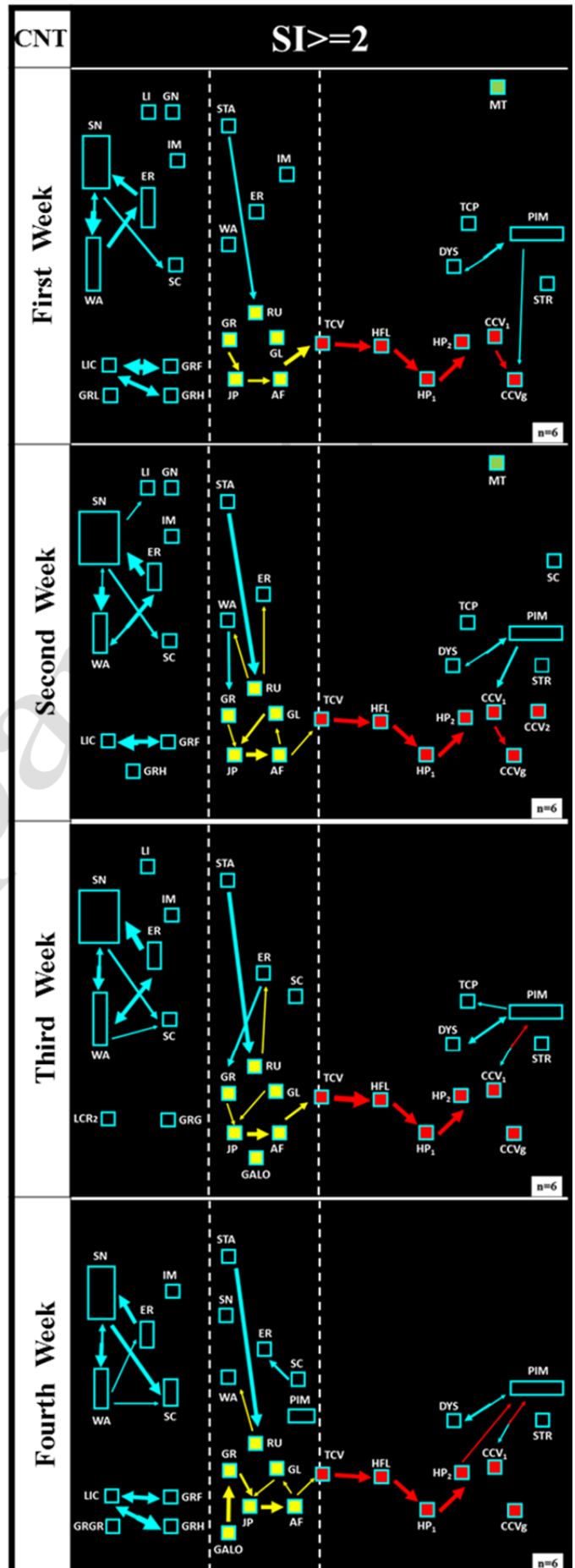


Figure 3. Duration of the different seizure phases in five consecutive stimulus with a time interval of a week in between (n=6). *Post-ictal Immobility till straighten.

Figure 4. Flowcharts of the behaviors of the GASH/Sal of control animals (n=6).



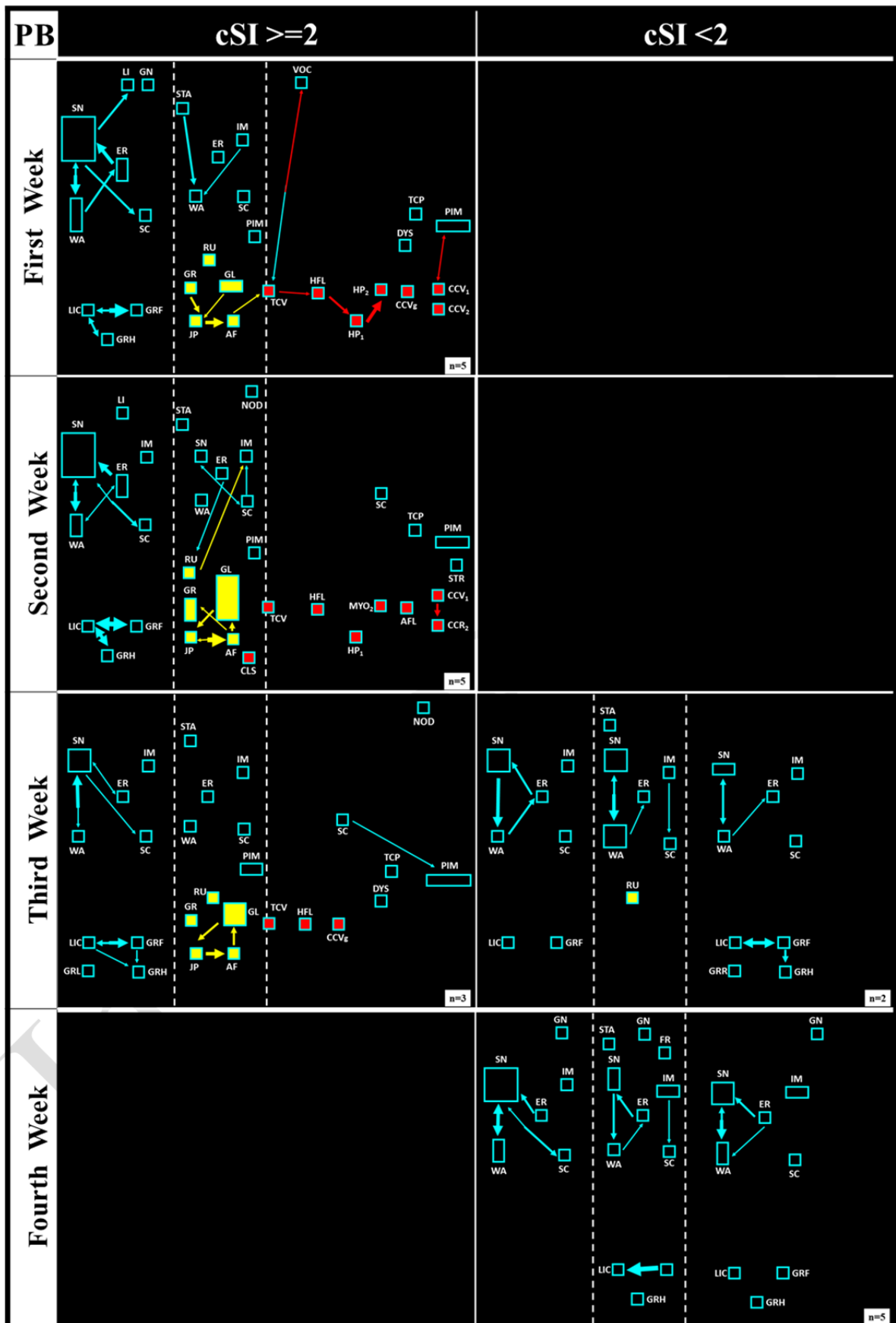


Figure 5. Flowcharts of the behaviors of the GASH/Sal of PB treated animals: 40 mg/kg/day during the first and the second week and 60 mg/kg/day during the 3rd and 4th week: (n=5).

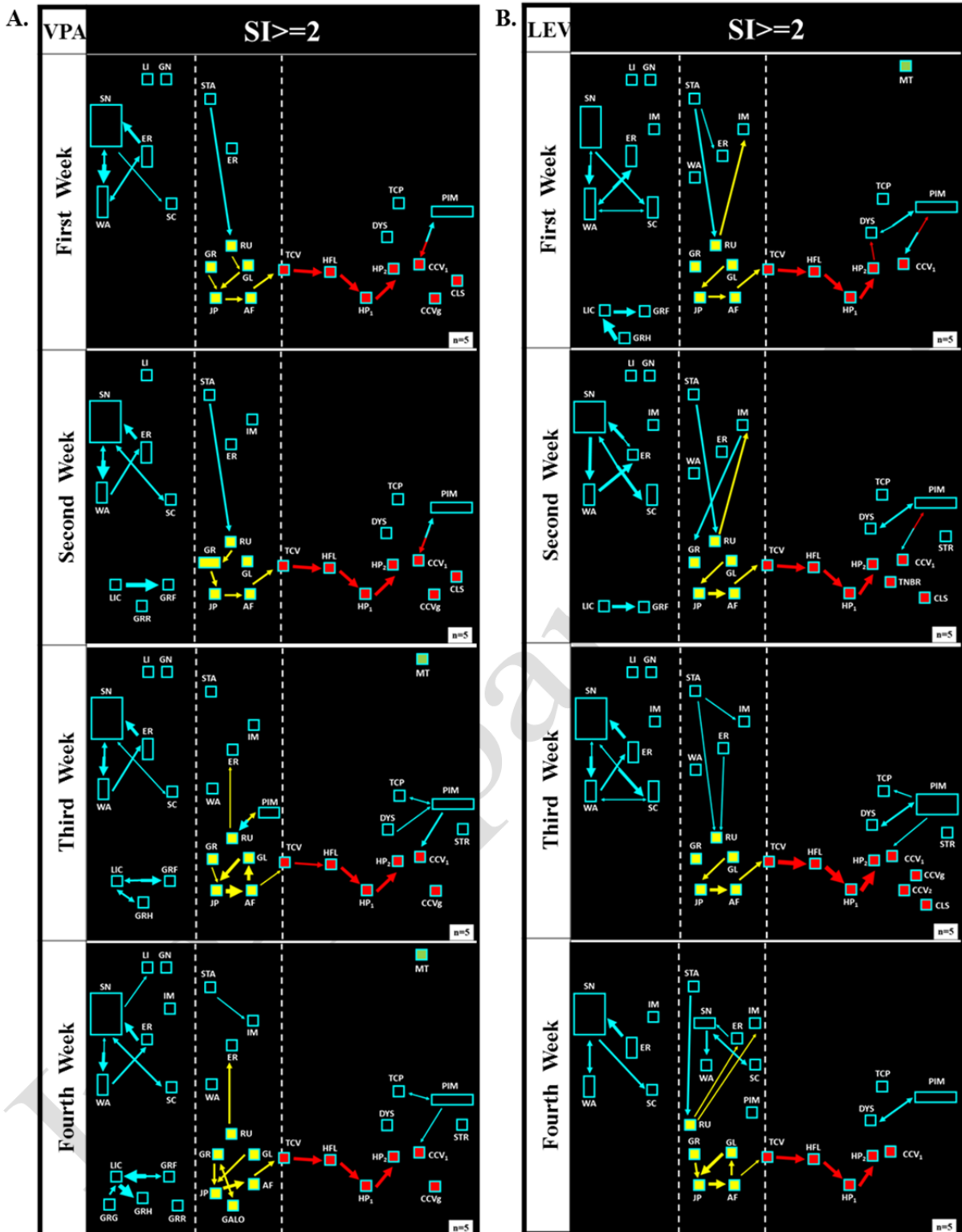


Figure 6. Flowcharts of the behaviors of the GASH/Sal A. VPA treated animals: 300mg/kg/day during the first and the second week and 600 mg/kg/day during the 3rd and 4th week: (n=5); B. LEV treated animals: 100 mg/kg/day during the first and the second week and 150 mg/kg/day during the 3rd and 4th week: (n=5),

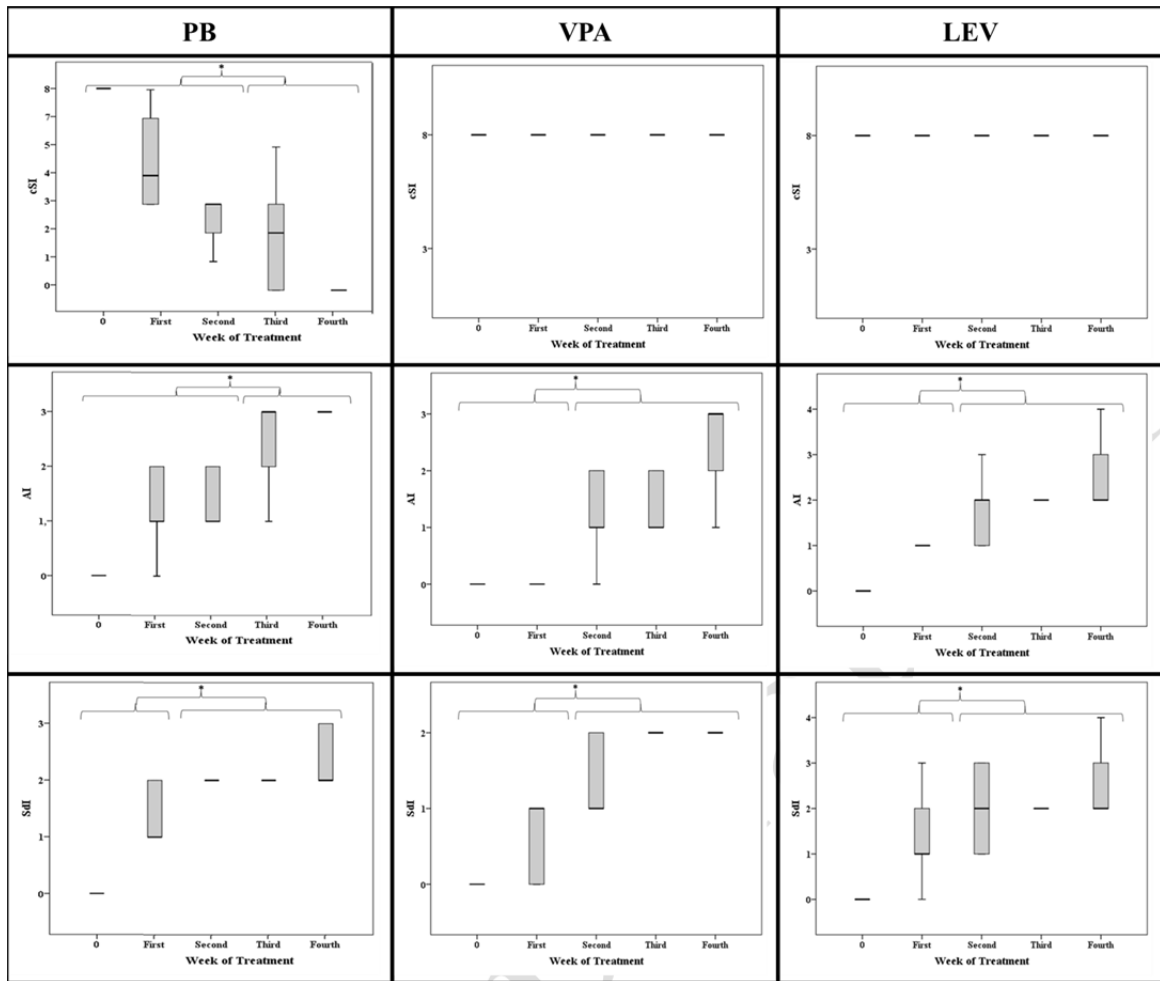


Figure 7. Box plots with the categorized seizure severity index (cSI), the ataxic index (AI), and sedation (SdI) index during 30 days treatment with AEDs.

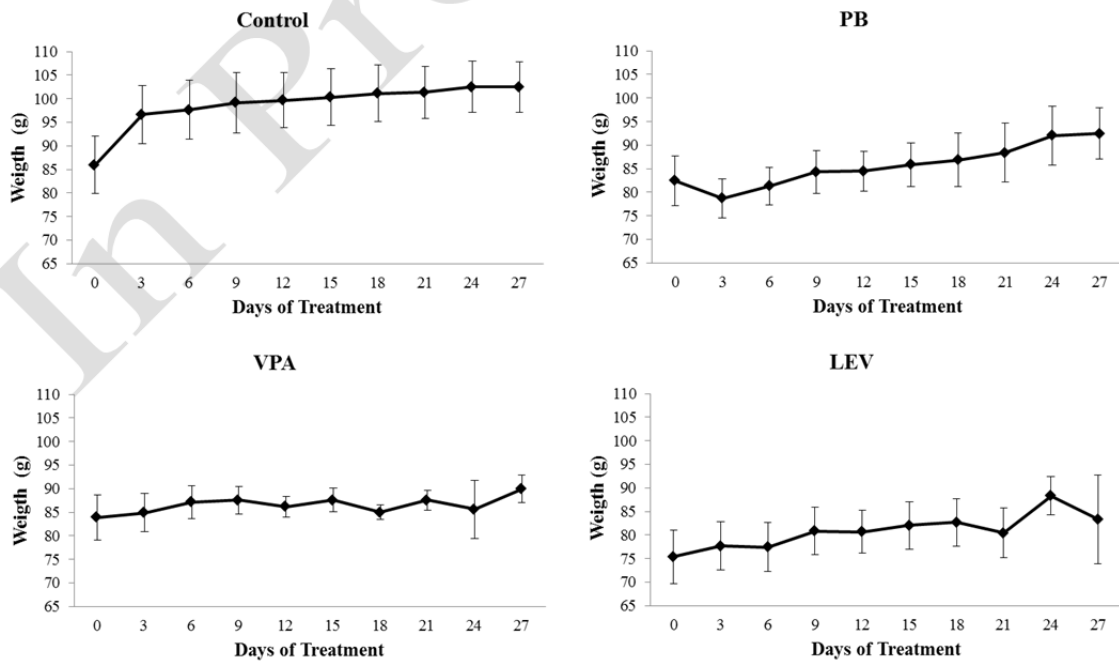


Figure 8. Weight mean values during treatment with AED and control group.

4. Discussion

The use of chronic models of epilepsy on the evaluation of AEDs is a crucial step on the right characterization of new anticonvulsive drugs. The determination of the efficacy of drugs varies in acute and chronic administration. The potency in acute administration may underestimate or overestimate the potency of such drugs after chronic administration. With some drugs the anticonvulsant efficacy increases during prolonged treatment (like vigabatrin due to accumulation of GABA, etc.). The deficiency of chronic research on literature maybe due to the time-consuming experiments since, due to a long post-ictal refractoriness, the animals can only be tested once a week, and some skill in handling is required when the drugs are to be administered in order to avoid induction of seizures. In our case, we want to characterize the GASH:Sal with know AEDs in chronic treatment, and at the same time characterize the AEDs action on chronic treatment in the GASH:Sal.

It is especially important for chronic efficacy testing of antiepileptic drugs to keep in account the pharmacokinetics of these drugs on the animal species used. Many antiepileptic drugs are eliminated faster in rodents than in man, including the hamster, which makes the maintenance of effective drug levels during chronic treatment difficult to conserve. So this requires that the drug is administered several times a day or the use of special administration techniques.

For the first group of animals we tested the drugs administration in drinking water, to minimize stress on the animals. Administration through drinking water is a good way of prolonged administration for drugs that are not removed too quickly, but is a disadvantageous way of administration for drugs with short elimination half-lives, as rodents drink little during the day, so drug levels may be too low. In the hamster, the administration of drugs in drinking water was ineffective, since we could not see any changes or in response anticonvulsant or neuroethological behaviors (results not shown).

With the second group we change the form of administration, the drugs were diluted in honey and administrated directly on the mouth, so the completed doses were administrated every time. Only in the case of PB the modification of administration show any results. None starting dose of the AEDs used, based in the intraperitoneal ED50 calculated for the effectivity on GASH:Sal, were effective, which emphasizes the differences between acute and chronic treatments, reinforcing the statement of the difference anticonvulsive potency between treatments. And also show the importance of making drug administration studies, now that the

main route of acute administration in rodents is intraperitoneal (i.p.) injection, a route of administration not used in humans.

Many compounds are not adequately absorbed from the gastrointestinal tract when orally administered in small animal species in aqueous solution or other simple vehicles (phenytoin in rats, Valproic acid in mice). Since such drugs the oral bioavailability may be negatively correlated with the dose administered, false conclusions with respect to anticonvulsant efficacy after oral administration may be drawn. False conclusions from such data can be circumvented by blood level determinations after i.p. and oral administration.

Throughout the period of administration with VPA and LEV, seizures occurred, probably due to the failure of the administered dose or to the development of tolerance. Experimental studies in rodents, have demonstrated a more rapid development of tolerance to AEDs (Honack and Löscher, 1989; Löscher and Honack, 2000).

The great difficulty in maintaining effective blood concentrations of drugs with short half-life (VPA) can be avoided with the use of special administrations techniques such as constant rate application via subcutaneously implanted osmotic minipumps. Long-term antiepileptic therapy in humans may lead to tolerance and the necessity for constantly increasing amounts of drugs in order to remain effective.

PB has a good oral absorption and high first-pass phenomenon, due to its effect of inductance is diminished plasma levels after chronic administration. PB produced sedation and muscle relaxation in the animals, and from the first week, and in the third and fourth week this effects reached higher values, clearly observed at 60 mg/kg/day at the same dose went the seizures were annulled. The drug blood concentration analysis shows in the last week of treatment low levels, contrasting with the anticonvulsive and toxic effects. The behavioral differences in the pre- stimuli windows are seen from the third week, were frequency, duration and correlation of the behavioral items, mainly sniffing and walking, are lower. Grooming is also reduced as the time past. The reduction of frequency and duration may be related to the ataxic and sedation state. The seizures diminish as the weeks passed. On the first week the seizure is completed, the correlation between behaviors diminishes in comparison with the control group and the first seizure (figure 4). On the second and third week the severity decreased, showing a more complex wild running and the tonic- clonic behaviors are not correlated. On the third and four week absence of seizure is present, showing mainly exploratory clusters in the three windows

reduce locomotion and several immobility periods. It is widely known that at prolonged treatment tolerance to Phenobarbital rapidly occurred (Elrod and Leslie, 1980; Kwan and Brodie, 2004), but in the case of GASH: Sal, this tolerance does not develop in the last 2 weeks of treatment.

VPA did not annulled seizures on chronic seizures, and the toxicity effects stop the increment of the dose. Particularly, VPA treated animals slow the natural augmentation of weight and the toxic effects are notorious from the second week, even though these effects are only reflected in the increment of grooming in the pre-stimulus window. In this case high blood levels values are correlated with the high toxic effects seen from the second to the fourth week, but not with its absence of anticonvulsant effect. Higher plasma concentrations of valproate in rats and mouse are usually required to test chronic anticonvulsant activity than necessary to test in acute management (Chapman et al., 1982). In fact, acute anticonvulsive potency in the GASH:Sal was not seen till i.p. 300 mg/kg (Barrera-Bailón et al., 2013). From this study, it is impossible to conclude whether the loss of anticonvulsant activity was due to metabolic or functional tolerance, or could result from not reach sufficient and maintained brain concentrations (2.2 µg/ml at the end of the treatment), despite having high plasma levels. These results differ from those obtained in several studies on rats and mouse (Chapman et al., 1982; Perry and Hansen, 1978; Simler et al., 1982).

LEV had anticonvulsant effect in our model in acute administration, although with unclear behavior, no dose-dependent (Barrera-Bailón et al., 2013), but did not show any anticonvulsive effect on chronic treatment, and the side effects are aggravated with increasing doses, which prevents us from the use of higher doses. This toxicity is comparable to the toxicity of the drug, dizziness and somnolence, reported by patients (Abou-Khalil, 2008; Gower et al., 1992; Gower et al., 1995; Lyseng-Williamson, 2011). LEV give positive results in anticonvulsant protection in several models as kindled rats (Dedeurwaerdere et al., 2005) and absent epileptic rats (Tokuda et al., 2010), but in our model of audiogenic seizure chronic seizure dose not present encouraging results.

The chronic study of AEDs has an incredible lack of basic research; most of the studies are based in acute treatments, also the chronic assays in animals are usually made after the drug is commercialized for clinic use. We started the present study with the assumption that a continuous treatment with AEDs which had proved to have anticonvulsive action in acute treatment would annulled the seizures went used chronically administrated. This is the same premise with which most of the AEDs are launch for clinic used. But as we observed these

may lead to false conclusions now that drugs have may have different absorption and metabolic rate which would influence its action. Also most of the studies are made in models of epileptic seizures and a few in epilepsy models which do not completely resemble the conditions in the cases of epilepsy with genetic etiology.

Acknowledgements

Work supported by the Spanish JCyL (#SA023A12-2) and the USP/USAL Program for the Promotion of the Bilateral Cooperation in the Field of Research (#2011.1.23386.1.3).

References

1. Abou-Khalil, B., 2008. Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4, 507-523.
2. Barrera- Bailón B, Oliveira JAC, López DE, Muñoz de la Pascua LJ, Garcia-Cairasco N, Sancho C. 2013. Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior* (submitted)
3. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 51, 676-685.
4. Bertti, P., Dal-Col, M.L., Wichert-Ana, L., Kato, M., Terra, V.C., de Oliveira, J.A., Velasco, T.R., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2010. The neurobiological substrates of behavioral manifestations during temporal lobe seizures: a neuroethological and ictal SPECT correlation study. *Epilepsy & behavior : E&B.* 17, 344-353.
5. Carballosa-González, M.M., 2008. Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH:Sal. In: Instituto de Neurociencias Castilla y León (INCyL). Vol. Doctoral thesis, eds. Universidad de Salamanca, Salamanca.
6. Castro, O.W., Furtado, M.A., Tilelli, C.Q., Fernandes, A., Pajolla, G.P., Garcia-Cairasco, N., 2011. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res.* 1374, 43-55.

7. Conover, W.J., 1980. Practical nonparametric statistics. Wiley, New York. ISBN: 0471028673
8. Contin, M., Mohamed, S., Candela, C., Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., 2010. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878, 461-465.
9. Chapman, A., Keane, P.E., Meldrum, B.S., Simiand, J., Vernieres, J.C., 1982. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol.* 19, 315-359.
10. Cheng, H., Liu, Z., Blum, W., Byrd, J.C., Klisovic, R., Grever, M.R., Marcucci, G., Chan, K.K., 2007. Quantification of Valproic acid and its metabolite 2-propyl-4-pentenoic acid in human plasma using HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850, 206-212.
11. Dal-Cól, M.L.C., Terra-Bustamante, V.C., Velasco, T.R., Oliveira, J.A.C., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2006. Neuroethology application for the study of human temporal lobe epilepsy: From basic to applied sciences. *Epilepsy & Behavior.* 8, 149-160.
12. Dedeurwaerdere, S., Boon, P., De Smedt, T., Claeys, P., Raedt, R., Bosman, T., Van Hese, P., Van Maele, G., Vonck, K., 2005. Chronic Levetiracetam treatment early in life decreases epileptiform events in young GAERS, but does not prevent the expression of spike and wave discharges during adulthood. *Seizure.* 14, 403-411.
13. Doheny, H.C., Ratnaraj, N., Whittington, M.A., Jefferys, J.G., Patsalos, P.N., 1999. Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant Levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy Res.* 34, 161-168.
14. Elrod, S.V., Leslie, S.W., 1980. Acute and chronic effects of barbiturates on depolarization-induced calcium influx into synaptosomes from rat brain regions. *J Pharmacol Exp Ther.* 212, 131-136.
15. Etholm, L., Arabadzisz, D., Lipp, H.P., Heggelund, P., 2010. Seizure logging: A new approach to synchronized cable-free EEG and video recordings of seizure activity in mice. *Journal of neuroscience methods.* 192, 254-260.
16. Fernandez, S., Donaire, A., Maestro, I., Seres, E., Setoain, X., Bargallo, N., Rumia, J., Boget, T., Falcon, C., Carreno, M., 2011. Functional neuroimaging in startle epilepsy: involvement of a mesial frontoparietal network. *Epilepsia.* 52, 1725-1732.
17. Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., Jr., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International

- League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 46, 470-472.
18. Fuentes-Santamaria, V., Cantos, R., Alvarado, J.C., Garcia-Atares, N., López, D.E., 2005. Morphologic and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsia*. 46, 1027-1945.
 19. Fuentes-Santamaria, V., Alvarado, J.C., Herranz, A.S., Garcia-Atares, N., López, D.E., 2007. Morphologic and neurochemical alterations in the superior colliculus of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* 75, 206-219.
 20. Furtado, M.A., Braga, G.K., Oliveira, J.A., Del Vecchio, F., Garcia-Cairasco, N., 2002. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*. 43 Suppl 5, 37-39.
 21. Garcia-Cairasco, N., Doretto, M.C., Ramalho, M.J., Antunes-Rodrigues, J., Nonaka, K.O., 1996a. Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 53, 503-510.
 22. Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J.A., Gomes, E.L., Del Bel, E.A., Mello, L.E., 1996b. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.* 26, 177-192.
 23. Garcia-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J.A., Furtado Mde, A., 2004. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy & Behavior* 5, 455-463.
 24. Gower, A.J., Noyer, M., Verloes, R., Gobert, J., Wulfert, E., 1992. ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol.* 222, 193-203.
 25. Gower, A.J., Hirsch, E., Boehrer, A., Noyer, M., Marescaux, C., 1995. Effects of Levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 22, 207-213.
 26. Hönack, D., Löscher, W., 1989. Amygdala-kindling as a model for chronic efficacy studies on antiepileptic drugs: experiments with carbamazepine. *Neuropharmacology*. 28, 599-610.
 27. Kaneko, S., Okada, M., Iwasa, H., Yamakawa, K., Hirose, S., 2002. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res.* 44, 11-30.
 28. Kwan, P., Brodie, M.J., 2004. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st

- century: a critical review. *Epilepsia*. 45, 1141-1149.
29. Löscher, W., 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 50, 105-123.
 30. Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 20, 359-368.
 31. Löscher, W., Hönack, D., 1989. Comparison of the anticonvulsant efficacy of primidone and Phenobarbital during chronic treatment of amygdala-kindled rats. *Eur J Pharmacol.* 162, 309-322.
 32. Löscher, W., Hönack, D., 2000. Development of tolerance during chronic treatment of kindled rats with the novel antiepileptic drug Levetiracetam. *Epilepsia*. 41, 1499-1506.
 33. Lyseng-Williamson, K.A., 2011. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs*. 71, 489-514.
 34. Moriyama, M., Yamashita, S., Domoto, H., Furuno, K., Araki, H., Gomita, Y., 1999. Determination of plasma Phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 723, 301-305.
 35. Muñoz de la Pascua, L., López, D.E., 2005. Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Ed. Muñoz de la Pascua, Luis. Salamanca, ISBN 13: 978-84-609-5027-1
 36. Panayiotopoulos, C.P., 2005. *The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management*. Bladon Medical Publishing, Oxfordshire (UK). ISBN 10: 1-904218-34-2
 37. Perry, T.L., Hansen, S., 1978. Biochemical effects in man and rat of three drugs which can increase brain GABA content. *J Neurochem.* 30, 679-684.
 38. Picazo, M.G., P.J. Benito, García-Olmo, D.C. 2009. Efficiency and safety of a technique for drawing blood from the hamster cranial vena cava. *Lab animal*, 38(6), 211-216.
 39. Pitkanen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 14 Suppl 1, 16-25.
 40. Prieto-Martin, A.I., Llorens, S., Pardal-Fernandez, J.M., Munoz, L.J., López, D.E., Escribano, J., Nava, E., de Cabo, C., 2012. Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sci.* 90, 531-537.
 41. Ross, K.C., Coleman, J.R., 2000. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 639-653.
 42. Rossetti, F., Rodrigues, M.C., de Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 2006. EEG

- wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 72, 192-208.
43. Simler, S., Ciesielski, L., Klein, M., Mandel, P., 1982. Anticonvulsant and antiaggressive properties of di-n-propyl acetate after repeated treatment. *Neuropharmacology.* 21, 133-140.
 44. Striano, S., Coppola, A., del Gaudio, L., Striano, P., 2012. Reflex seizures and reflex epilepsies: old models for understanding mechanisms of epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 100, 1-11.
 45. Tang, M., Lau, C.E., Falk, J.L., 1979. Serum Phenobarbital and barbital concentrations in rats on a limited food regimen. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 11, 359-361.
 46. Tejada, J., Costa, K.M., Berti, P., Garcia-Cairasco, N., 2013. The epilepsies: Complex challenges needing complex solutions. *Epilepsy & Behavior* 26, 212-228.
 47. Tokuda, S., Sofue, N., Ohno, Y., Sasa, M., Serikawa, T., 2010. Inhibitory effects of Levetiracetam on absence seizures in a novel absence-like epilepsy animal model, Groggy rat. *Brain Res.* 1359, 298-303.
 48. White, H.S., 1997. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 38: S9-S17.

**EFFECTS OF LAMOTRIGINE AND RETIGABINE ON THE AUDIOGENIC CRISES
OF THE GENETIC AUDIOGENIC SEIZURE HAMSTER (GASH:Sal)**

B. Barrera- Bailón¹, D.E. López^{1,2}, N. Garcia-Cairasco³, T. López-Alburquerque^{1,4}, L.J. Muñoz⁵, C. Sancho^{1,6}

(1) Institute of Neurosciences of Castilla and León/IBSAL. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

(2) Department of Cell Biology and Pathology. School of Medicine. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

(3) Physiology Department. Ribeirão Preto School of Medicine. University of São Paulo. Ribeirão Preto (Brazil)

(4) Neurology, University Hospital of Salamanca, Salamanca (Spain)

(5) Animal Research Service. University of Salamanca, Salamanca (Spain).

(6) Department of Physiology and Pharmacology. School of Medicine. University of Salamanca, Salamanca (Spain)

Consuelo Sancho Sánchez <sanchoc@usal.es>

EFFECTS OF LAMOTRIGINE AND RETIGABINE ON THE AUDIOGENIC CRISES OF THE GENETIC AUDIOGENIC SEIZURE HAMSTER (GASH:Sal)

Abstract

Animal models of epilepsy are essential for studying epileptic disorders. Audiogenic seizure (AGS) models, like the GASH:Sal, are some of several experimental models used to study epilepsy. Some of the main purposes epileptic models and seizures models are the screening studies to characterize the anticonvulsive effect and evaluated the efficiency in acute and chronic treatments of the new AEDs. Lamotrigine (LTG) and retigabine (RGB) are two new generation antiepileptic drugs (AEDs) that had been commercialized in the last 20 years. As a part of the validation process of the GASH-Sal strain we made the current pharmacological and neuroethological study with LTG and Retigabine RGB. We found that both drug have exert acute anticonvulsive effects from the lower doses, 5mg/kg for LTG and 0.5 mg/kg for RGB, but we only found anticonvulsive effective LTG in chronic treatment due to drug metabolic aspects by oral intake. LTG prove to have low secondary adverse effect I comparison with RGB, which produce high levels of sedation and ataxia in the higher doses (2.5 m/kg)

Keywords: antiepileptic drugs, audiogenic epilepsy, Lamotrigine, neuroethology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, Retigabine,

Running Title: effects of new antiepileptic drugs in the GASH: Sal

1. Introduction

Epilepsy is one of the neurological pathologies with the highest rate of incidence and with a significant number of negatives consequences. Epilepsy involve a variety of pathological conditions associated with its origin, and for such there is a reason to treated as complex systems problem, and one of the newest approaches to studied is the neuroethology (Tejada et al., 2013). Neuroethological studies combine ethology, comparative behavior studies, and neurophysiology or neurobiology (Berti et al., 2010), and are based on the principle that evaluation of behavioral sequences is more consistent than studies of isolated behaviors (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004). Neuroethological studies have been made in epilepsy models such as acute and chronic audiogenic seizures in rats (Garcia-Cairasco et al., 1996a) as well as in models of systemically and intra-hipocampal applied pilocarpine (Castro et al., 2011; Furtado et al., 2002), and knockout mice for synapsin (Etholm et al., 2010) and also in temporal lobe epilepsy patients (Berti et al., 2010; Dal-Cól et al., 2006). Animal models of epilepsy are essential for studying epileptic disorders as they provide valuable insights as to how epilepsy develops as well as its underlying mechanisms. As such, they may provide novel approaches to the prevention or management of epilepsy and to probe the current pharmacological treatments. The audiogenic seizure (AGS) model is one of several experimental models used to study epilepsy. The activation of reflex seizures by a specific sensory stimulation such as sound, in genetically susceptible animals may prove to be better adaptable and suitable to study the underlying cellular and electrical mechanisms of epilepsies associated with a genetic component, such as idiopathic generalized tonic-clonic seizures. Some of the main purposes epileptic models and seizures models related with antiepileptic drugs (AEDs) are: discover new AEDs, characterized the anticonvulsive effect of the new AEDs, evaluated the efficiency of the new AEDs in chronic treatments, and estimated the effective blood concentration of the new AEDs for the first clinical trials (Löscher, 2011).

The genetically developed audiogenic seizure-susceptible hamster (GASH:Sal), a strain of animal inbred at the University of Salamanca, exhibits generalized convulsive audiogenic seizures (AGS) in response to intense acoustic stimulation (AS) (Muñoz and López, 2005; Carballosa-González et al., 2008; Prieto-Martin et al., 2012). Audiogenic seizures are a model of tonic-clonic generalized seizures (Casaubon et al., 2003; Raisinghani and Faingold, 2003). In the GASH:Sal, seizure profiles are characterized by a sequence of a fit of wild running which culminates into severe tonic-clonic convulsions, and recesses into a catatonic post-ictal

depression (Muñoz and López, 2005). We strongly believe that this strain could be a reliable animal model of epilepsy as substantiated by electroencephalographic recordings (Carballosa-González et al., 2013) of a conspicuous progressive profile during seizures similar to those exhibited during human generalized tonic-clonic seizures, and to those of other animal models of epilepsy such the spontaneous seizures in the Noda epileptic rat (Noda et al., 1998; Iida et al., 1998) as well as those of GEPR-9 (Moraes et al., 2005). As a part of the validation process of the GASH-Sal strain we made the current pharmacological and neuroethological study with two third generation AEDs such as Lamotrigine (LTG) and Retigabine (RGB).

Lamotrigine (LTG) and retigabine (RGB) are two new generation antiepileptic drugs (AEDs) that had been commercialized in the last 20 years (LaRoche and Helmers, 2011; Loscher and Schmidt, 2006; Loscher, 2011). LTG inhibits high voltage activation Ca^{2+} channels (N- and P/Q-types) by reducing the release of glutamate under paroxysmal neuronal firing, and also on fast current sodium channels (I_{NaF}) (Bialer, 2002; Rogawski and Löscher, 2004). The neuroprotection apply by the AEDs, like LTG, is in part mediated by the modulation of the gating sodium channels of the brain. This action is made by blocking high-frequency repetitive spike firing, which is believed to occur during the spread of seizure activity, without affecting ordinary ongoing neural activity (Rogawski and Loscher, 2004). RGB is an M- type K channel enhancer developed from an analgesic, flupirtine, which has shown an anticonvulsive broad spectrum in animal testing and also has been efficient in partial seizures otherwise refractory (Brown and Passmore, 2009). RGB main target is the $KCNQ_{2-5}$ channels, but also has been proposed to possess other multiple mechanisms of action. At higher concentrations, RGB potentiate the action of GABA at the $GABA_A$ receptor, increase GABA synthesis and block calcium and sodium channels (Brown and Passmore, 2009; Loscher and Schmidt, 2006; Luszczyk, 2009; Schenzer et al., 2005; Sills et al., 2000). A very low amount of types of epilepsies can be endorsed to K_{v7} channel dysfunctions, but either been any particular dysfunction or not, RGB could exert an anticonvulsive effect by maintaining more open channels at the cell's resting potential (shifting the voltage) and this both increases resting membrane conductance and hyperpolarizes the neuron, thereby reducing excitability, and also RGB enhances the natural effectiveness of K_{v7} currents in suppressing repetitive firing because the accelerated channel opening during depolarization, consequence of the voltage shift (Brown and Passmore, 2009).

The goal of this study is to characterize the pharmacology of these AEDs in the hamster GASH:Sal, and also to characterize the neuroethology of the seizures under the influence of the used AEDs in an acute a chronic situations, to valorize the anticonvulsive action differences between both treatments.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Two months old male GASH:Sal hamsters were obtained from the inbred strain of the Animal Experimentation Service of the University of Salamanca (USAL, Spain) and kept during the experiments in the animal house from the Institute of Neuroscience of Castilla and León (INCYL) of the USAL. The experimental animals were handled and cared according to the Guidelines of the European Communities Council Directive (2010/63/UE) and the current Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (RD 53/2013, BOE 8/02/2013), under the supervision of the corresponding Institutional Animal Care and Use Committee. All efforts were made to avoid unnecessary animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Acoustic stimuli

The stimuli application was made in a cylindrical acrylic arena (height: 50 cm; diameter: 37 cm). The sound of shaking keys was recorded with a high pass filter (>500 Hz; microphone Bruel & Kjaer #4134 and preamplifier Bruel & Kjaer #2619), digitalized above 4 KHz, and reproduced by a computer coupled to an amplifier (FONESTAR MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) and a tweeter (Beyma T2010, Valencia, Spain) in the upper side of the cage. The final sound was a semi-random sound of 0-18 kHz with an intensity of 115 to 120 dB.

2.3. Antiepileptic drug used

The drugs used were Lamotrigine (LTG; GlaxoSmithKline, UK) and retigabine (RGB; GlaxoSmithKline, UK). Both drugs were provided by GlaxoSmithKline. LTG stock solution was made by dissolving first the LTG in propylene glycol (Merck, Madrid, Spain), vortex till dissolved, and then adding an equal volume of distilled water, making a solution of 50:50 (v:v). Stock solution of RGB was made by first dissolving the RGB in methanol, 20% of the final stock volume, vortex till dissolved, then propylene glycol was add in a 50 % of the final stock volume, vortex till properly mix, and finally distilled water was added to complete the solution.

2.4. Pharmacology of the AEDs

2.4.1. Brain extraction and sample preparation

The right hemisphere of two animals with AED chronic treatment was collected after euthanasia with overdose of Pentobarbital. The sample was frozen with liquid nitrogen and store until used. The tissue was weight before been mechanical sonicated by Politron® with 2 ml of Perchloric acid 0.1 M, and then centrifuged at 13000g for 15 minutes. The supernatant was collected, placed in a new tube and to it the internal standard (in known concentration), 50 mg of alumina, 100 µl of 5 mM sodium metabisulfite and 800 µl of 10 mM Tris-1mM EDTA pH 8 were added. Once vortex and agitated during 10 min, the mix was centrifuged at 11,000 g for 5 min. The supernatant acid was analyzed by HPLC. All reagents for the HPLC were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4.2. Blood extraction and sample preparation

Blood was extracted to five animals at different times (15, 30, 45, 60, 100, 180, 225 and 360 min) post- injection of AED. The doses used of the drugs were: 20 mg/kg of LTG and 2.5 mg/kg of RGB. The blood was extracted from the cranial vena cava according with the procedure described by Picazo et al., (2009) under anesthesia by inhalation (induction: 4 % isoflurane and 1 l/ min of O₂, maintenance: 3 % isoflurane and 0.4 l/min de O₂). 100 µl of blood was extracted at each time and the animal was rehydrated with 150 µl of saline 0.9%. . Serum was extracted in the case of LTG and plasma for RGB.

For the serum extraction we proceed as described by Barrera-Bailón et al., (2013). RGB blood samples were placed in a tube with 5 µl of EDTA 0.5M pH8 and placed in 4°C. The samples were centrifuged at 13000g for 10 minutes at 4° C to collect the supernatant (plasma) which was collected in 40 µl aliquots and frozen until used. 40 µl of 0.01M PBS, 420 µl chloroform on isopropyl alcohol (95:5) and internal standard (IS) was added to the 40 µl plasma aliquot, then vortex 30 seconds and agitated during 10 min. Subsequently the sample was centrifuge for 10 minutes at 1500g and the supernatant placed in a new tube and left to dry at room temperature.

After air dry the samples were suspended in 20 µl of 20% methanol in dH₂O. The IS used were: 10 µg/ml of Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for LTG and 10 µg/ml of flupirtine maleate (Metanor®, MEDA, Lisbon, Portugal) for RGB.

2.4.3. Blood and brain drug concentration

LTG and RGB blood levels determinations were carried out to adjust the timing interval for each AED. The blood drug concentrations were determined by HPLC/MS at the General Service of Mass Spectrophotometer of the USAL. The equipment used for the analysis of the samples was: Agilent 1100 (Agilent technologies, Santa Clara CA, USA) for the HPLC assay and Agilent trap XCT (Agilent technologies, Santa Clara CA, USA) for the mass spectrophotometry assay. The mobile phase used consisted of A, water containing 0.1% formic acid and B, acetonitrile. The mobile phase was delivered at a flow rate of 0.2 ml/min to a X-Bridge C-18 column (particle size: 3.5 μ m; diameter: 2,1mm; length: 10 cm) (Waters Corporation, Milford MA, USA). Different methods of elution were made for each drug. LTG isocratic method consists of 75% of A and 25% of B for 15 minutes, for the mass study pseudo-molecular ion transition was follow, from 304 to rupture at 258, and for LTG and its IS from 305 to 196. RGB isocratic method consists of 80% of A and 20% of B, for the mass pseudo-molecular ion-transition was follow 356 to rupture at 256 and for LTG, and its IS from 323 to 305 (Bu et al., 2007; Contin et al., 2005; Contin et al., 2010; Hempel et al., 1999; Knebel et al., 2000).

2.5. Anticonvulsant drug potency

2.5.1. Antiepileptic drugs doses and acute treatment

The dose of each AED was chosen based on their efficacy in suppressing seizures in other experimental models of epilepsy (Abelaira et al., 2011; Ahmad et al., 2004; Dencker et al., 2008; Rostock et al., 1996). The doses administrated of each drug were: LTG: 5, 10, 15 and 20 mg/kg and RGB: 0.5, 1, 1.5 and 2.5 mg/kg. Six animals per AED received different doses of the same AED, 30 minutes before stimuli. In the first week they received the vehicle (saline 0,9%, 0,001ml/g of animal weight) and in the following weeks the rest of the doses, one per week, five weeks total. A third group of animals was added as a control receiving saline instead of drug in all five stimuli. Drug potency comparisons were determined at the individual time of the peak anticonvulsant effect. The medium effective dose (ED_{50}) for the various treatment outcomes were calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon (Litchfield and Wilcoxon, 1949) in PSS PASW Statistical 18 (IBM).

2.5.2. Chronic treatment

LTG and RGB were administrated twice a day, during 30 days to five animals per AED. Previous assays (not show) were made to determine the starting dose, by calculating a dose from the combination of the parenteral ED50 and the oral bioavailability in other species for each AED. The dose was increased in time according to the response of the animals to the drug, which depends on the efficiency on annulling the seizure and the toxic effects. The doses used were: LTG: 20 mg/kg/day the first and the second week and 25 mg/kg/day on the last two weeks; RGB: the first two weeks 6 mg/kg/day, and 12 mg/kg/day on the last two weeks. The AED was administrated on the mouth with a pipetman according with the weight of each animal, which were weight every three days. The drugs were dissolved in honey diluted on distilled water to a convenient stock concentration. Before start the treatment all animal were stimulated once to observe the seizure without influence of the AEDs, then a stimuli was recorded every week to see the effect of the AEDs. A fourth control group of animals was added to the experiment to discard any doubt any possible new appearing behavior due to kindling.

2.6. Neuroethological study

2.6.1. Stimuli observation

The stimuli consist of three phases of behavioral observation: 1 minute pre- sound, one minute of sound or until opistotonus occur, and 3 minutes post- sound in the case of seizure occurrence or 1 minute in the case that no seizure occurs. All stimuli were recorded to its posterior analysis (Figure1).

2.6.2. Behavior indexes and neuroethological analysis

Three behavioral evaluations were used. The severity index (Table 1) was used to determine the severity of the seizures (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004; Rossetti et al., 2006). The ataxia (Table 2) and sedation (Table 3) indexes were used to measure the toxic effects of the drugs on normal behavior (Loscher and Honack, 1989; Rossetti et al., 2006).

Table 1. Severity Index (SI)(Garcia-Cairasco et al., 1996b) using the behavioral descriptions and categorized Severity Index (cSI) transformed into discreet variables for statistical purposes. Taken from Rossetti (Rossetti et al., 2006).

SI	Seizure behaviors	cSI
0.00	No seizures	0
0.11	One wild running	1
0.23	One wild running (running plus jumping plus atonic fall)	2
0.38	Two wild runnings	3
0.61	Tonic convulsion (<i>opisthotonus</i>)	4
0.85	Tonic seizures plus generalized clonic convulsions	5
0.90	Head ventral flexion plus cSI5	6
0.95	Forelimb extension plus cSI6 ^a	7
1.00	Hindlimb extension plus cSI6 ^a	8

^aCategories are generally followed by hindlimb clonic convulsions (CCV2).

Table 2. Ataxia Index (AI) scores according to Löscher and Hönack (Loscher and Honack, 1989). Taken from Rossetti *et al.* (2006). (Rossetti et al., 2006) (Rossetti et al., 2006) (Rossetti et al., 2006)

Score	Behaviors
1	Slight ataxia in hindleg (tottering of hind quarters), no decrease in abdominal muscle tone
2	More pronounced ataxia with dragging of hind legs and slight decrease of muscle tone
3	Further increase in ataxia and more pronounced dragging of hindlegs and decrease in muscle tone
4	Marked ataxia, animals lose balance during forward locomotion, total loss of abdominal muscle tone
5	Very marked ataxia with frequent loss of balance during locomotion, loss of abdominal muscle tone

Table 3. Sedation Index (SdI) scores according to Löscher and Hönack (Löscher and Hönack, 1989). Taken from Rosetti (Rossetti et al., 2006)

Score	Behaviors
1	Slightly reduced forward locomotion
2	Reduced locomotion with rest periods in between (partly with closed eyes)
3	Reduced locomotion with more frequent rest periods
4	No forward locomotion, animal sits quietly with closed eyes

After each animal was scored using the cSI, we divided the animals into two groups for further analysis. Those with a cSI greater than or equal to 2 (SI=0.23) were considered as animals that suffered a seizure, and those with a cSI lower than 2 were considered as animals in which the seizure was blocked.

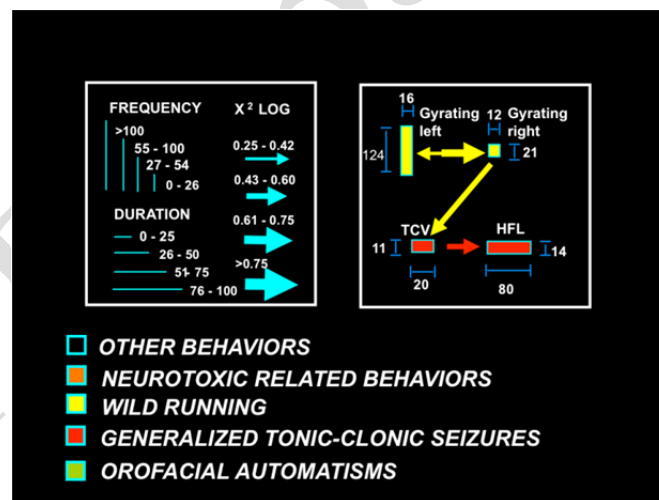


Figure 1. Flow-charts illustrating the graphical and statistical aspects of the observed behaviors. The frequency and time spent performing each behavior are proportional to the height and width of the rectangle, respectively. The arrow width and direction indicate the statistical intensity and preference association between two items.

Table 4. Behavioral Dictionary

Acronym	Behavior	Acronym	Behavior
AF	Atonic Fall	GRH	Grooming of Head
ATF*	Ataxic Fall	GRHL	Grooming of Head, Left
BE	Blinking Eyes	GRL	Grooming of Body, Left
BRL	Barrel Rolling, Left	GRN	Grooming of Neck
BRR	Barrel Rolling, Right	GRR	Grooming of Body, Right
CCV1	Clonic Convulsions (forelegs)	HFL	Head Ventral Flexions
CCV2	Clonic Convulsions (hindlegs)	HP ₁	Forelimb Extensions
CCVg	Clonic Convulsions (generalized)	HP ₂	Hindlimb extensions
CVL1	Clonic Convulsions (forelegs - left)	IM	Immobility
CVL2	Clonic Convulsions (hindlegs - left)	JP	Jumping
DYS	Dyspnea	LI	Licking
ER	Erect Posture	LIC	Licking of Claws
EXC	Excretion of Feces and Urine	MT	Masticatory Movements
STR	Straighten	PIM	Postictal Immobility
FR	Freezing Posture	RU	Running
GL	Gyrating, Left	SN	Sniffing
GN	Gnawing	TCP	Tachypnea
GR	Gyrating, Right	WA	Walking
GRB	Grooming	WDS	Wet Dog Shaking
GRF	Grooming of Face	NOD	Nodding
GRG	Grooming of Genitals	TCV	Tonic Clonic Convulsions
STA	Startle		

***Observation:** The behavioral item ataxic fall (ATF) was created to show the presence of the toxic effect of drugs on motor behavior.

The behavioral sequences observed during the different stimuli were assessed using neuroethological methods. Every behavior presented in a given time window was recorded, second by second, according to a dictionary of behavioral items (Table 4) described by Garcia-Cairasco (Garcia-Cairasco et al., 1996b). Once the data were obtained, the ETHOMATIC (Garcia-Cairasco et al., 1996b; Garcia-Cairasco et al., 2004) program for statistical analysis was used to analyze the data. This program displays the mean frequency and mean duration of each behavioral item in the given observation window. The program also performs statistical analysis, verifying significant associations between pairs of behavioral items and calculating X^2 values. Flowcharts representing all of the statistically significant data were constructed using Microsoft Power Point 2011 (see Figure 1 for flowchart calibration).

2.6.3. Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using SPSS PASW Statistical 18 (IBM) software. For comparisons between different the AEDs doses, we used the non-parametric Friedman test with Conover post-hoc comparisons (Conover, 1980).

3. Results

3.1. Pharmacology of LTG and RGB in hamster GASH:Sal

3.1.1. Blood Levels

To determine the timing of the maximal levels of the drugs, we measured blood levels after the intraperitoneal administration of an effective anticonvulsant dose. The results obtained from the LTG blood concentration analysis (Figure 2) show that in GASH:Sal hamsters is reached the highest serum levels (41.05 ng/ml) at 60 min post-injection, and then the levels decrease slowly showing levels 6 hours after administration of 13.37 ng/ml. In chronic treatment the levels of LTG (figure 3) maintain between 4 and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ the first week, and as the weeks pass decrease gently. No LTG brain levels were observed.

We could not detect plasma or tissue levels of RGB for lack of a suitable internal standard in HPLC testing.

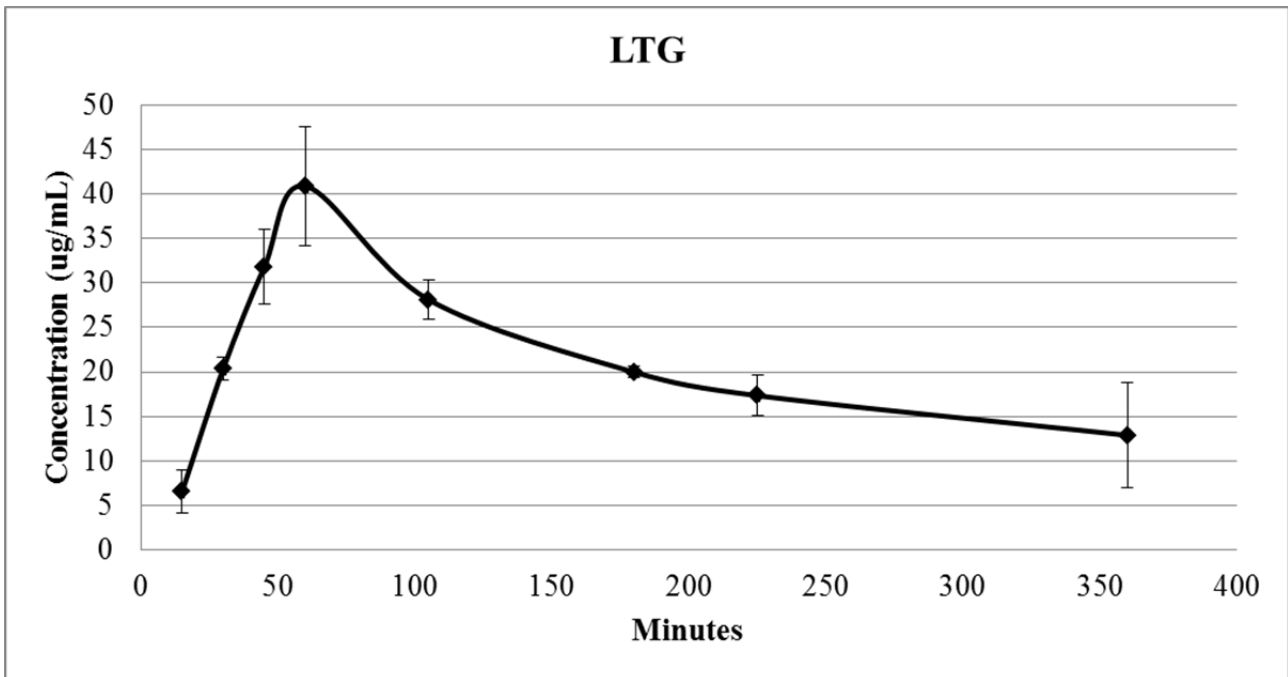


Figure 2. Serum concentration levels in different extraction times after intraperitoneal injection of (A) LTG (20 mg/kg). Each point is the mean (+/- S.E.M.) of 5 animals.

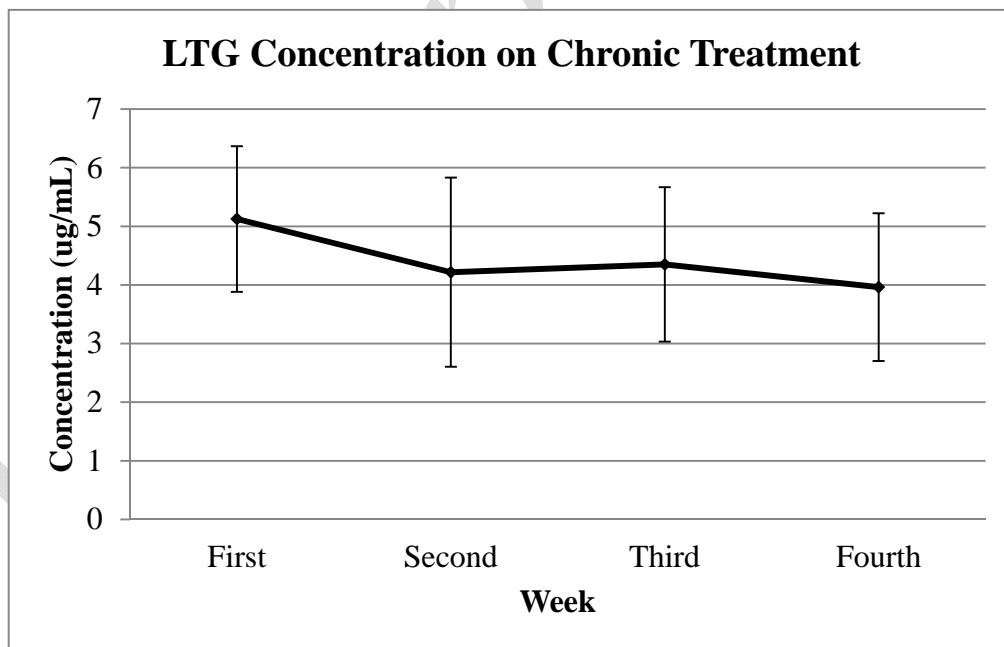


Figure 3. Serum concentration levels during chronic treatment with LTG. Each point is the mean (+/- S.E.M.) of 6 animals.

3.2. Acute treatment

3.2.1. Anticonvulsive effects

LTG and RGB were evaluated for anticonvulsant efficacy as measured by the ED₅₀, the dose that completely blocks seizures in 50% of animals after stimulation. The dose of LTG that produced 50% seizure blockade was 5 mg/kg. In the case of RGB, the calculated ED₅₀ was 0,5 mg/kg.

Both AEDs show anticonvulsive properties from the first dose.

LTG decrease the SI from 5mg/kg (figure 4 and 6), were 50% of animal's lack of seizure. Those animals that had seizure reduce it severity form a score of 8 to a maximum 6 (figure 6), lacking limbs hyperextensions, and prolonging the time of post-ictal immobility till straighten. In comparison with the behavior of the first stimulus (saline pre-treatment) in the pre-stimulus window the exploratory behavior low on frequency of the behaviors and correlation between them. Grooming behavior practically disappear in comparison with the saline injection. At doses equal and above 10 mg/kg, no seizure occurred, the three observatory windows were of exploratory behavior and as the dose increase the sniffing component increased its duration and grooming behavior reappear. Immobility periods are more prolonged in the last two doses. Correlation between behaviors also increased. In the last two doses, mainly at 20 mg/kg, the toxicity increased as it is reflected on the appearance of ataxic falls with an increment of the score of ataxic and sedation indexes. No differences are seen in the seizure behaviors went compare the pre and post- acute treatment saline stimuli.

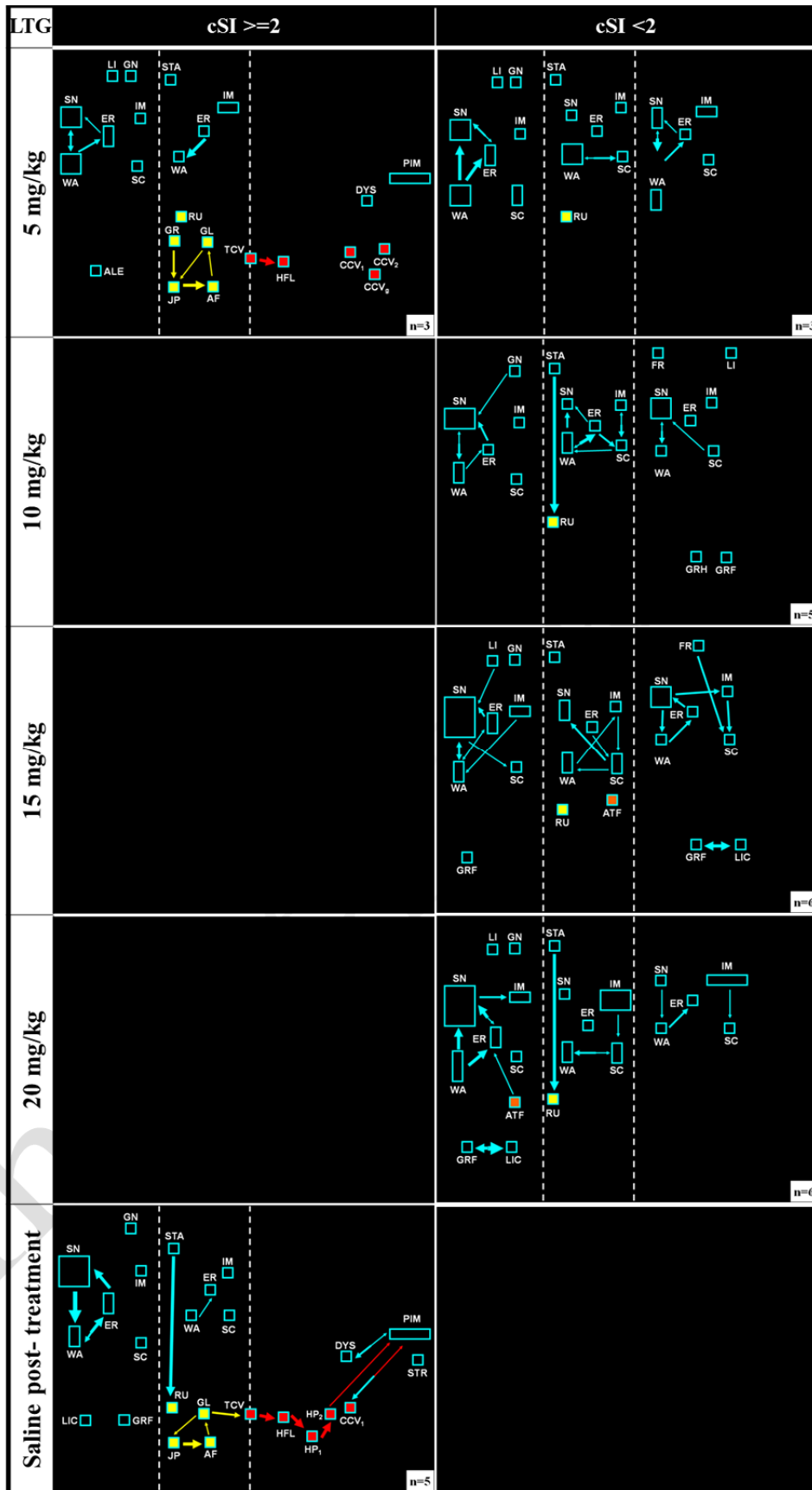


Figure 4. Flowchart of the sequences of behaviors of the GASH/Sal injected with different doses of LTG

RGB also show anticonvulsive effect from the first dose (0.5 mg/kg) were 50% of the animals did not have seizure, and in the second dose (1 mg/kg) 66.66% of animals lack of seizure too (figure 5). From 0.5 mg/kg, the frequency of the main exploratory behaviors, walking and sniffing, decrease, diminishing also the correlation between behaviors. In the 50% of animals affected by seizure no differences were seen in the seizure behavior items and the correlations between them are practically the same but weaker in comparison with the pre- acute saline stimulus. At 1 mg/kg dose, no hindlimp hyperextension was present and the correlation diminishes. The behavior of those animals in the exploratory items, grooming, and the correlation between behaviors present in all three windows appear to increase as the dose increased. Ataxic behavior is seen higher at 20 mg/kg were falls occurred and the AI is at the highest score (figure 6). 16.66 % of the animals remain seizure sensitive at 20 mg/kg. In the last stimulus post- acute treatment, with saline injection (figure 5), 66.66% of animals lack of seizure, the rest 33.33% had seizure behaviors with no correlation between them and the exploration was low.

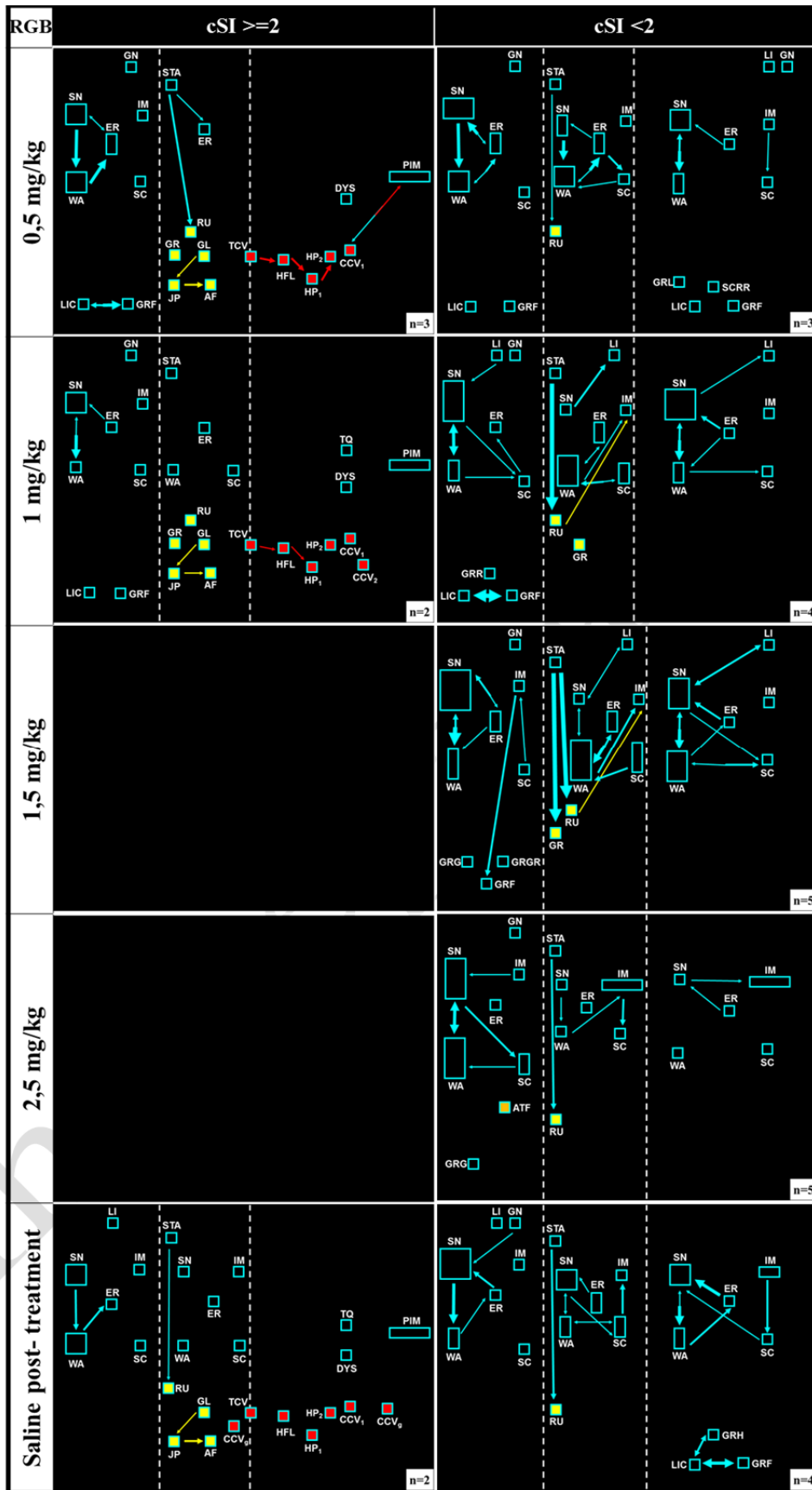


Figure 5. Flowcharts of the behaviors sequences of the GASH/Sal A. Control animals; B. Injected with different doses of RGB.

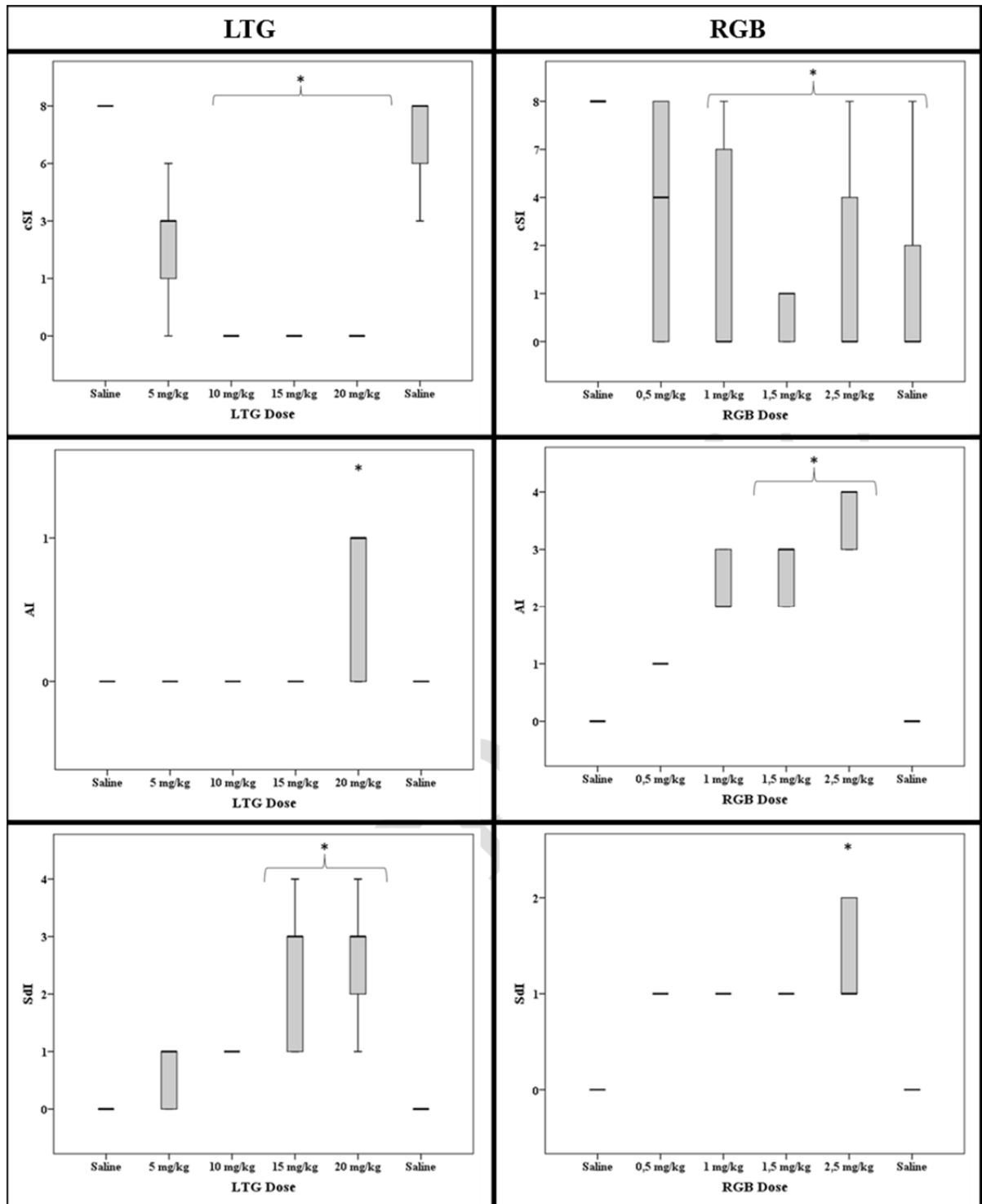


Figure 6. Box plots showing: the categorized severity (cSI), the ataxic index (AI) and the sedation Index (SdI) on the different doses of LTG and RGB

3.3. Chronic treatment

LTG show anticonvulsive action in chronic administration, but the RGB did not. LTG from the first week of treatment show anticonvulsive effect in 50% of animals. The animals affected by the seizure ($SI < 2$) show all the phase's components of the seizures (figure 8), but in the successive weeks the correlation between convulsive behaviors became weaker, while the correlation between wild running behaviors increased. The correlations between behaviors in the pre-stimulus behavior were affected, and the sniffing item is affected by increasing its duration. In the third week, with the increment of the dose from 20 to 25 mg/kg, fewer animals (33.33 %) were affected by seizures with a maximum SI value of 3 (figure 10). In the last week, the seizures were annulled in 83.33 % of the animals. From the first to the third week the animals lacking seizures had exploratory behaviors mainly, in the pre-stimulus window, sniffing and walking were the behavior most affected, primarily in the first two weeks and grooming behaviors increased. In the stimulus window the only behavior seizure related was running, and the rest of the window was full of exploratory behavior, been stronger at the third week by the number of correlation between behaviors. In the third and fourth weeks, ataxia is increased to a AI value of two and sedation behavior appear in a low level (figure 9), even though the pre-stimulus behavior resemble the control group (figure 7) behavior in frequency, duration and correlation of items behaviors.

RGB chronic administration did not show anticonvulsive behaviors (figure 9). It shows little toxic secondary effects from the second to the fourth week. No real differences were seen between RGB and control group in frequency, duration and correlation in any window.

3.3.2 Effect on body weight

In relation to body weight (figure 11), chronic administration of LTG and RGB does not affects the natural grow of animals in comparison with the control group. The grow average per week for each group was: LTG 0.73 g/week, RGB 0.95 g/week and Control 0.83 g/week.

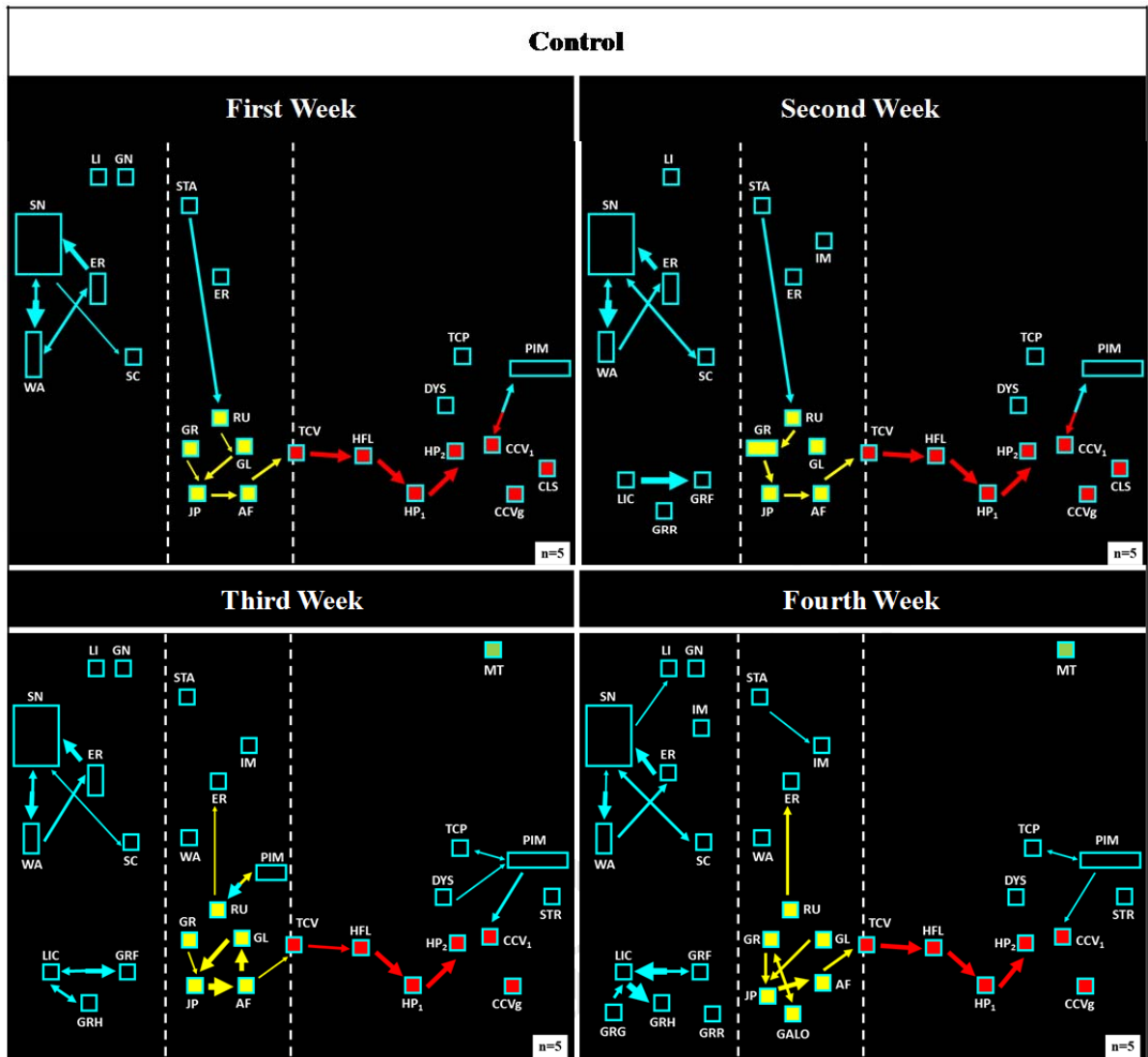


Figure 7. Flowchart of the behaviors sequences of the GASH/Sal. Control animals (n=6)

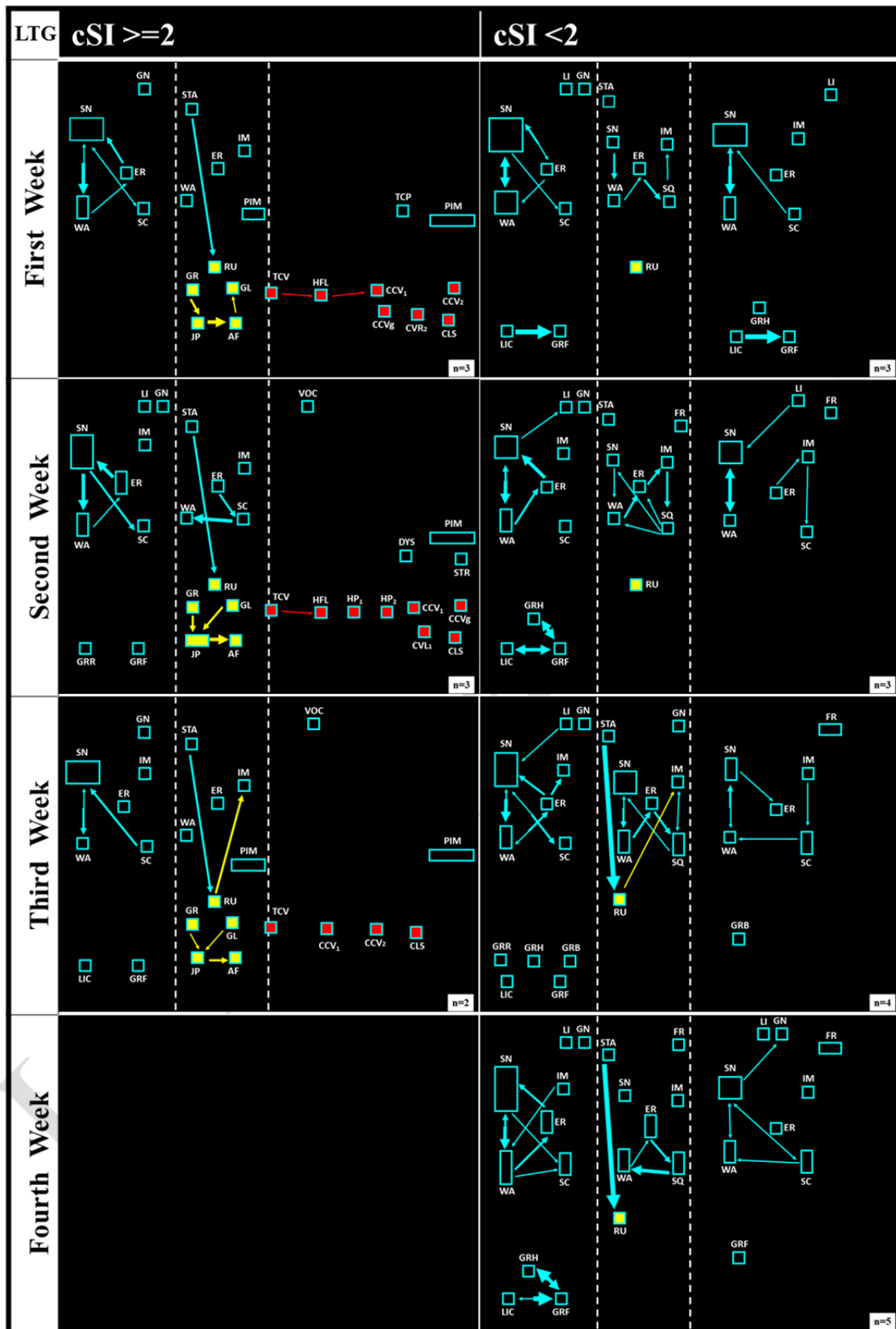


Figure 8. Flowchart of the behaviors sequences of the GASH/Sal treated with LTG. 20 mg/kg/day during the first and the second week and 25 mg/kg/day during the 3rd and 4th week: (n=6)

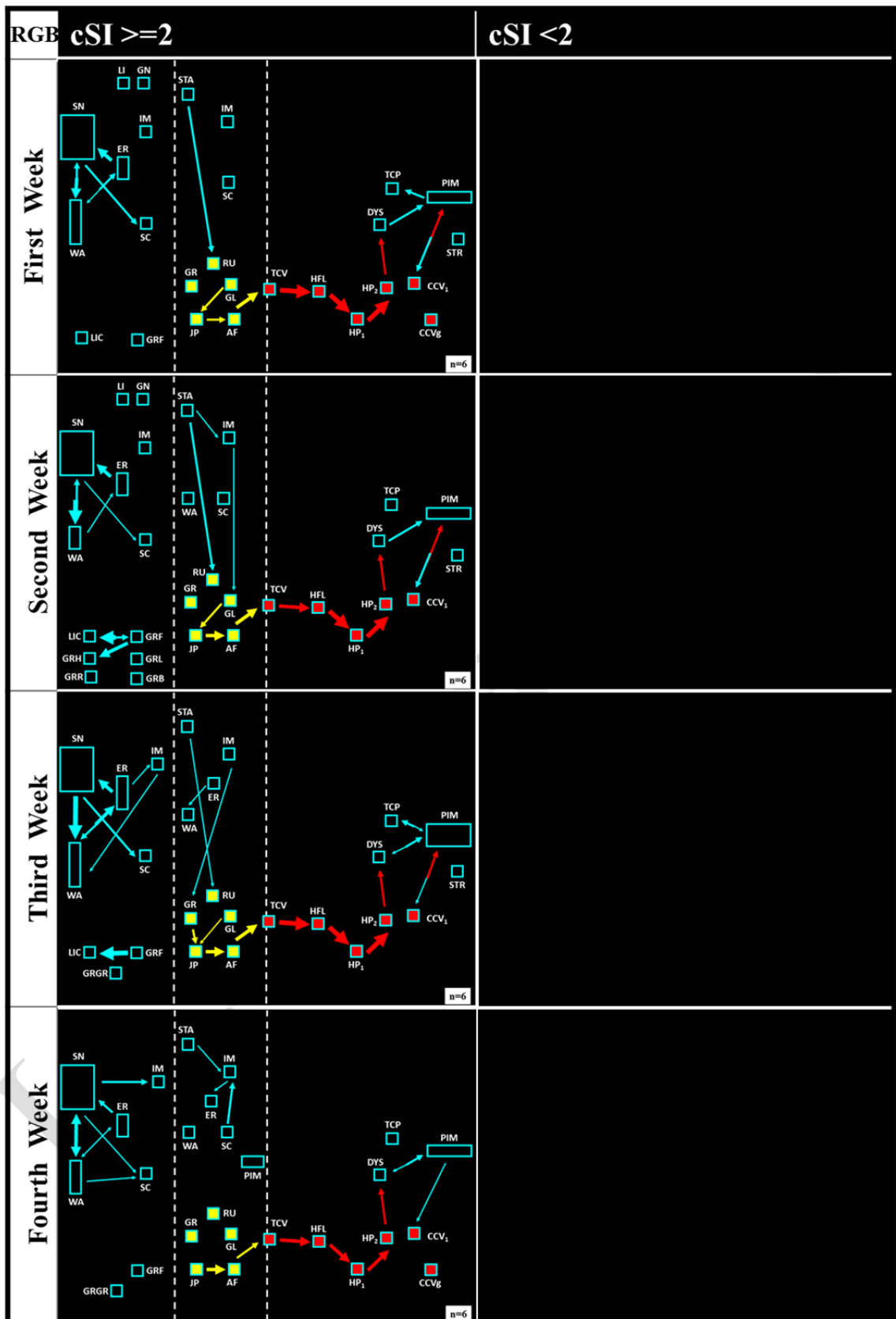


Figure 9. Flowchart of the behaviors sequences of the GASH/Sal animals treated with RGB: 6 mg/kg/day during the first and the second week and 8 mg/kg/day during the 3rd week and 12 mg/kg/day during the 4th week: (n=6)

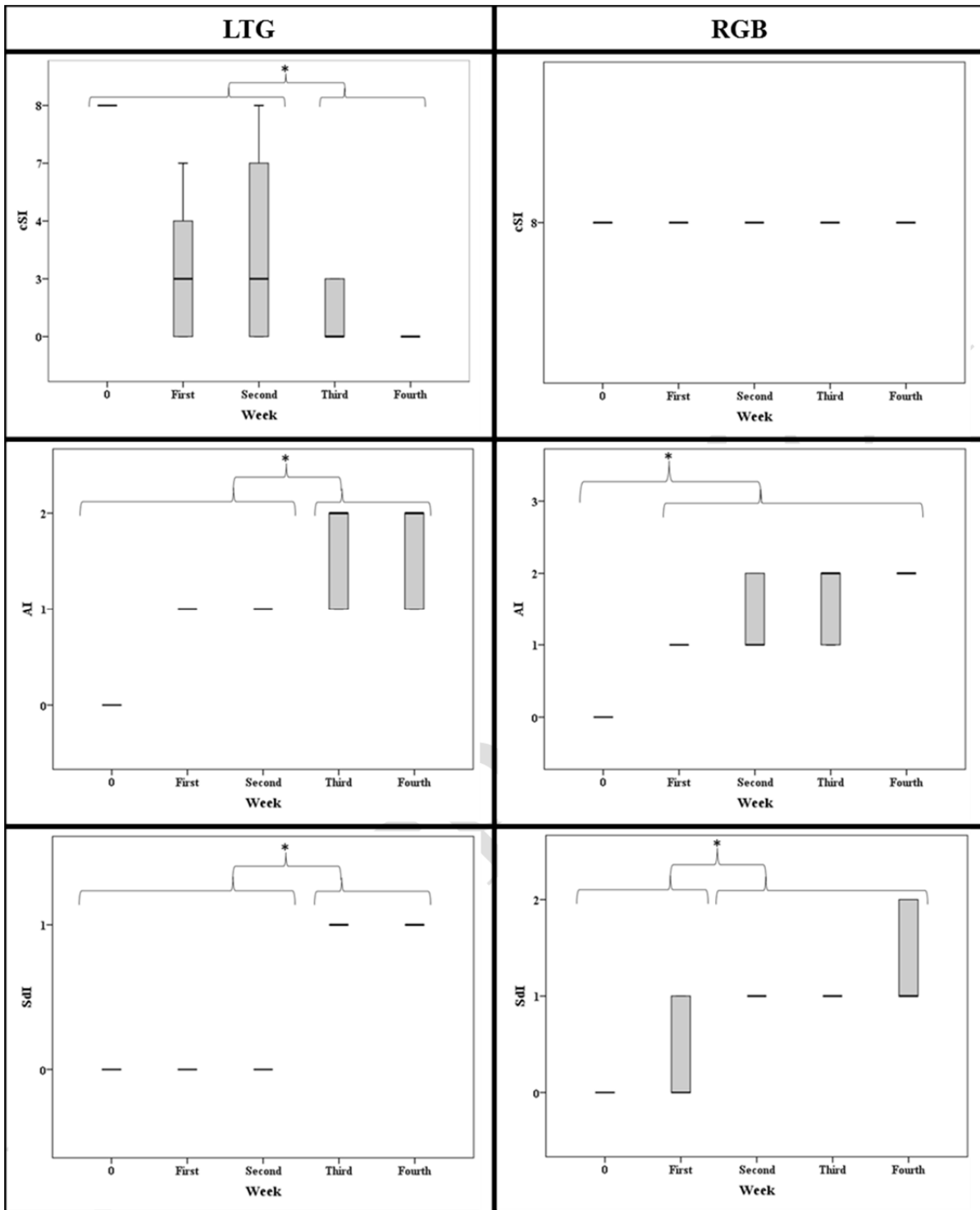


Figure 10. Box plots showing: the categorized severity (cSI), the ataxic index (AI) and the sedation Index (SdI) on the different weeks of treatment with LTG and RGB.

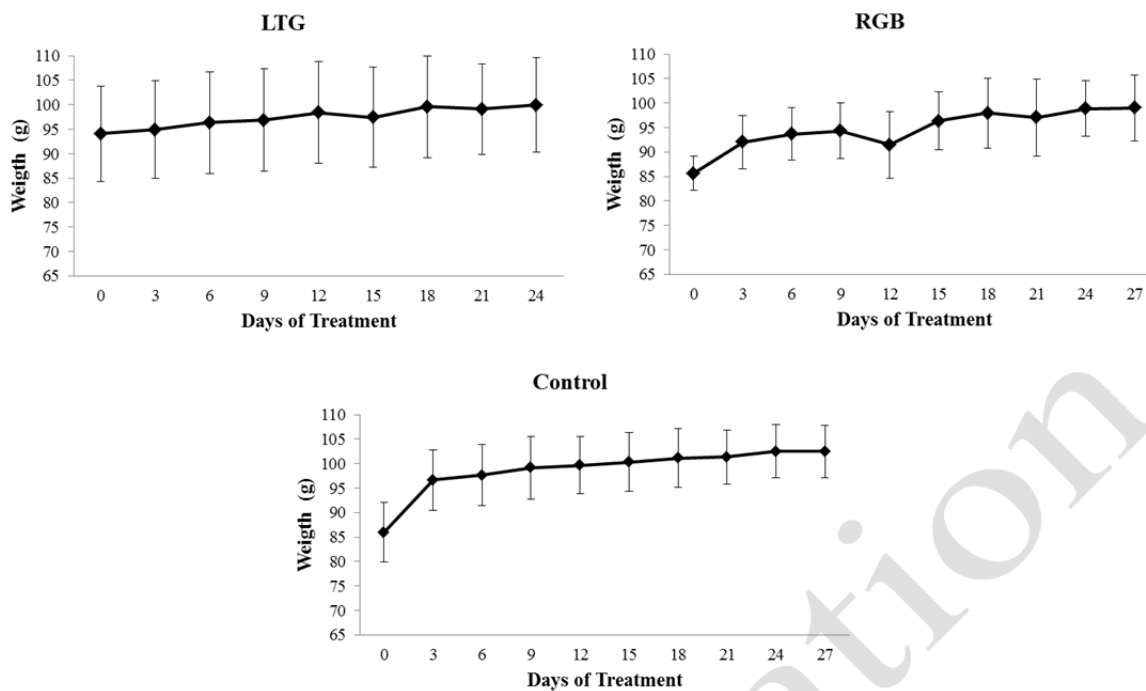


Figure 11. Weight mean values during treatment with LTG, RGB and control group.

4. Discussion

In this manuscript we contribute to the validation the GASH:Sal as a model of epilepsy by using two last generation AEDs. Chronic studies of AEDs in epilepsy models are important to characterize the anticonvulsant potential and spectrum of activity of the AED, because it has been reported that brains that has a basis dysfunction prone to epilepsy (genetic models and kindling models), are more susceptible to the behavioral and cognitive alterations following acute administration of certain established AEDs and investigational drugs (Löscher, 2011). The GASH:Sal is a model of epilepsy that has the advantage of repeatedly standard crises and presents a good tool for AEDs screening.

Lamotrigine shows a significant inhibition of the sodium currents voltage dependent, blocking high-frequency repetitive spike firing, which is believed to occur during the spread of seizure activity, without affecting ordinary ongoing neural activity (Rogawski and Löscher, 2004). Appears to work by blocking excitatory neurotransmitters through NMDA receptors, also. On the other side Retigabine acts primarily by opening neuronal potassium channels (KCNQ 2 and 3) (Schenzer et al., 2005; Tatulian et al., 2001)

Peak plasma concentrations of LTG occur about 60 min after parenteral drug administration,

and has an elimination half-life of 3 h, which is shorter of those obtained by Rempel and Sinz (1991) were they show that in guinea pig the LTG half-life was approximately of 11.5 hours. This drug shows a high anticonvulsive action on acute and chronic treatments in the GASH:Sal and also shows low toxic effects. The administration route show a significant difference, as the i.p. route display a anticonvulsive action at low doses (Rempel and Sinz, 1991), the oral route takes longer and needs higher doses, even though the bioavailability marks a 98% of absorption by oral route in humans. One major difficulty for chronic studies with these drugs is that rodents (mice, rats or hamster) eliminate most AEDs much more rapidly than humans (Löscher and Schmidt, 1988).

In chronic treatment the levels of LTG on the first week the values were around 5 µg/ml, and as the weeks pass decrease gently, despite the increase of the dose. Experimental studies in rodents, have demonstrated a more rapid development of tolerance to AEDs, and went seen on the blood concentration analysis (figure 3). Toxic properties are seen to affect forward locomotion in a really small way, is a characteristic that difference LTG from other AEDs, this low effects are seen in other studies with rats (Abelaira et al., 2011; Kaster et al., 2007).

RGB main target is the KCNQ₂₋₅ channels, but also has been proposed to possess other multiple mechanisms of action. No levels of RGB were seen in blood or brain tissue, been below the levels of detection (0.1 µg/ml). This may due to a fast metabolism of RGB as the drug gets in the system. RGB undergoes extensive and virtually exclusively phase II biotransformation and renal elimination, there is no indication of any role of oxidative metabolic pathways (Bialer M., 2002; Knebel et al., 2000). Its main metabolites are two distinct inactive N-glucuronides, which are seen in humans, rats and dogs in plasma urine (Hempel et al., 1999; Rostock et al., 1996). RGB show different responses acute and chronic treatments. At acute treatment RGB show anticonvulsive effect from 0.5 mg/kg by i.p. route. In other seizure models RGB has shown to have a very broad spectrum of activity. It blocked seizures in both the maximal electroshock model (MES) (tonic hindlimb extension) and pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure model suggesting effectivity against generalized tonic-clonic seizures and against generalized absence or myoclonic seizures (Porter et al., 2007). A surprising effect observed in the acute treatment was that once the assay were finish and the last stimulus with saline was inflicted 66.66% of the animals lack of seizure. It has been suggested that a systematic cleavage of N-glucuronides with following recycling of RGB, so a subsequent gradual release of free RGB drug from the N-glucuronide pool could be occurring, suggesting a mechanism of slow- release from

endogenous N-glucuronide (Luszczki, 2009) (Porter et al., 2007). On the other side chronic treatment of RGB on the GASH:Sal did not present any anticonvulsive action what so ever. There are a few studies of RGB in chronic models and in contradiction with other results in DBA mice and genetically epilepsy-prone (GEPR) rats RGB effectively suppressed sound-induced seizures, also was potently active in different kindling models, even though the doses were 10-20mg/kg in the case of GEPR and DBA mice (Dailey et al., 1995; Luszczki, 2009; Porter et al., 2007; Tober et al., 1996). In terms of secondary effects RGB present more ataxia in the higher doses in the acute treatment went in the chronic the values were lower. The lack of action of RGB in the GASH:Sal in chronic treatment may due to the absorption of the drug, in human RGB has a bioavailability of 60%, even though the doses of the chronic treatment were extremely high in comparison with the acute doses, the toxic effect were not as strong and no convulsive action was exert, and as the metabolism is so fast levels of active drug should be low impeding the neuroprotection against seizures.

Acknowledgements

Work supported by the Spanish JCyL (#SA023A12-2) and the USP/USAL Program for the Promotion of the Bilateral Cooperation in the Field of Research (#2011.1.23386.1.3).

References

1. Abelaira, H.M., Reus, G.Z., Ribeiro, K.F., Zappellini, G., Ferreira, G.K., Gomes, L.M., Carvalho-Silva, M., Luciano, T.F., Marques, S.O., Streck, E.L., Souza, C.T., Quevedo, J., 2011. Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochemistry international*. 59, 1163-174.
2. Ahmad, S., Fowler, L.J., Whitton, P.S., 2004. Effects of acute and chronic lamotrigine treatment on basal and stimulated extracellular amino acids in the hippocampus of freely moving rats. *Brain Res*. 1029, 41-47.
3. Berti, P., Dal-Col, M.L., Wichert-Ana, L., Kato, M., Terra, V.C., de Oliveira, J.A., Velasco, T.R., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2010. The neurobiological substrates of behavioral manifestations during temporal lobe seizures: a neuroethological and ictal SPECT correlation study. *Epilepsy & Behavior* 17, 344-353.
4. Bialer M., J.S.I., Kupferberg H.J., Levy R.H., Loiseau P., Perucca E., 2002.

- Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Res.* 51, 31-71.
5. Brown, D.A., Passmore, G.M., 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology.* 156, 1185–1195.
 6. Bu, W., Nguyen, M., Xu, C., Lin, C.C., Yeh, L.T., Borges, V., 2007. Determination of N-acetyl retigabine in dog plasma by LC/MS/MS following off-line microElution 96-well solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 852, 465-472.
 7. Casaubon L, Pohlmann-Eden B, Khosravani H, Carlen PL, Wennberg R. 2003. Video-EEG evidence of lateralized clinical features in primary generalized epilepsy with tonic-clonic seizures. *Epileptic Disord.* 5:149-156.
 8. Castro, O.W., Furtado, M.A., Tilelli, C.Q., Fernandes, A., Pajolla, G.P., Garcia-Cairasco, N., 2011. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res.* 1374, 43-55.
 9. Conover, W.J., 1980. *Practical nonparametric statistics.*, Wiley, New York. . ISBN: 0471028673
 10. Contin, M., Balboni, M., Callegati, E., Candela, C., Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., 2005. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 828, 113-117.
 11. Contin, M., Mohamed, S., Candela, C., Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., 2010. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878, 461-465.
 12. Dailey, J.W., Cheong, J.H., Ko, K.H., Adams-Curtis, L.E., Jobe, P.C., 1995. Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction of clinical response. *Neurosci Lett.* 195, 77-80.
 13. Dal-Cól, M.L.C., Terra-Bustamante, V.C., Velasco, T.R., Oliveira, J.A.C., Sakamoto, A.C., Garcia-Cairasco, N., 2006. Neuroethology application for the study of human temporal lobe epilepsy: From basic to applied sciences. *Epilepsy & Behavior* 8, 149-160.
 14. Dencker, D., Dias, R., Pedersen, M.L., Husum, H., 2008. Effect of the new

- antiepileptic drug retigabine in a rodent model of mania. *Epilepsy & Behavior* 12, 49-53.
15. Etholm, L., Arabadzisz, D., Lipp, H.P., Heggelund, P., 2010. Seizure logging: A new approach to synchronized cable-free EEG and video recordings of seizure activity in mice. *Journal of neuroscience methods*. 192, 254-260.
 16. Furtado, M.A., Braga, G.K., Oliveira, J.A., Del Vecchio, F., Garcia-Cairasco, N., 2002. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia* 43 Suppl 5, 37-39.
 17. Garcia-Cairasco, N., Doretto, M.C., Ramalho, M.J., Antunes-Rodrigues, J., Nonaka, K.O., 1996a. Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 53, 503-510.
 18. Garcia-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J.A., Furtado Mde, A., 2004. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy & Behavior* 5, 455-463.
 19. Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J.A., Gomes, E.L., Del Bel, E.A., Mello, L.E., 1996b. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.* 26, 177-192.
 20. Hempel, R., Schupke, H., McNeilly, P.J., Heinecke, K., Kronbach, C., Grunwald, C., Zimmermann, G., Griesinger, C., Engel, J., Kronbach, T., 1999. Metabolism of retigabine (D-23129), a novel anticonvulsant. *Drug Metab Dispos.* 27, 613-622.
 21. Iida K, Sasa M, Serikawa T, Noda A, Ishihara K, Akimitsu T, Hanaya R, Arita K, Kurisu K. 1998. Induction of convulsive seizures by acoustic priming in a new genetically defined model of epilepsy (Noda epileptic rat: NER). *Epilepsy Res.* 30:115-126.
 22. Kaster, M.P., Raupp, I., Binfare, R.W., Andreatini, R., Rodrigues, A.L., 2007. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur J Pharmacol.* 565, 119-124.
 23. Knebel, N.G., Grieb, S., Leisenheimer, S., Locher, M., 2000. Determination of retigabine and its acetyl metabolite in biological matrices by on-line solid-phase extraction (column switching) liquid chromatography with tandem mass

- spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 748, 97-111.
24. LaRoche, S.M., Helmers, S.L., 2011. The New Antiepileptic Drugs. *JAMA.* 291, 605-614.
 25. Litchfield, J.T., Jr., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther.* 96, 99-113.
 26. Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20, 359-368.
 27. Löscher, W., Hönack, D., 1989. Comparison of the anticonvulsant efficacy of primidone and phenobarbital during chronic treatment of amygdala-kindled rats. *Eur J Pharmacol.* 162, 309-322.
 28. Löscher, W., Schmidt, D., 2006. New Horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. *Epilepsy Res.* 69, 183-272.
 29. Luszczki, J.J., 2009. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep.* 61(2), 197-216.
 30. Moraes MF, Chavali M, Mishra PK, Jobe PC, Garcia-Cairasco N. 2005. A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s. *Brain Res.* 1033:1-12.
 31. Noda A, Hashizume R, Maihara T, Tomizawa Y, Ito Y, Inoue M, Kobayashi K, Asano Y, Sasa M, Serikawa T. (1998). NER rat strain: a new type of genetic model in epilepsy research. *Epilepsia* 39:99-107.
 32. Porter, R.J., Nohria, V., Rundfeldt, C., 2007. Retigabine. *Neurotherapeutics.* 4, 149-154.
 33. Raisinghani M, Faingold CL. 2003. Identification of the requisite brain sites in the neuronal network subserving generalized clonic audiogenic seizures. *Brain Res.* 967:113-122.
 34. Rempel, R.P., Sinz, M.W., 1991. A quaternary ammonium glucuronide is the major metabolite of lamotrigine in guinea pigs. In vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos.* 19, 630-636.
 35. Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 5, 553-564.
 36. Rossetti, F., Rodrigues, M.C., de Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 2006. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar

- audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 72, 192-208.
37. Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E.E., Kutscher, B., Loscher, W., Honack, D., White, H.S., Wolf, H.H., 1996. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 23, 211-223.
38. Schenzer, A., Friedrich, T., Pusch, M., Saftig, P., Jentsch, T.J., Grotzinger, J., Schwake, M., 2005. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci.* 25, 5051-5060.
39. Sills, G.J., Rundfeldt, C., Butler, E., Forrest, G., Thompson, G.G., Brodie, M.J., 2000. A neurochemical study of the novel antiepileptic drug retigabine in mouse brain. *Pharmacol Res.* 42, 553-557.
40. Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F.C., Brown, D.A., 2001. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci.* 21, 5535-5545.
41. Tejada, J., Costa, K.M., Berti, P., Garcia-Cairasco, N., 2013. The epilepsies: Complex challenges needing complex solutions. *Epilepsy & Behavior* 26, 212-228.
42. Tober, C., Rostock, A., Rundfeldt, C., Bartsch, R., 1996. D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur J Pharmacol.* 303, 163-169.