



UDC Máster en Neurociencia

Trabajo Final de Máster

Estudio del efecto de la microperfusión de ACPT-1 en crisis epilépticas inducidas por picrotoxina en el hipocampo de la rata

Study of the effect of ACPT-1 microperfusion in epileptic seizures induced by
picrotoxin in the rat hippocampus

Olalla Paz Coira

Director: Germán Sierra Paredes

Julio 2016



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR
Facultade de Medicina e Odontoloxía
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Germán Sierra Paredes, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, en calidad de Tutor:

Autoriza la defensa del Trabajo de Fin de Máster de la alumna del Máster en Neurociencia **Olalla Paz Coira** titulado:

“Estudio del efecto de la microperfusión de ACPT-1 en las crisis epilépticas inducidas por picrotoxina en el hipocampo de la rata”

“Estudo do efecto da microperfusión de ACPT-1 nas crisis epilépticas inducidas por picrotoxina no hipocampo da rata”

“ Effect of ACPT-1 microperfussion on epileptic seizures induced by picrotoxin in the rat hippocampus”

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'G' followed by several loops and a long horizontal stroke.

Germán Sierra Paredes,
Santiago de Compostela, 5 de Julio de 2016

Resumen

La epilepsia es un trastorno neurológico en el que la función normal del cerebro se interrumpe como consecuencia de la sincronización neuronal. Su prevalencia a nivel mundial y el alto porcentaje de individuos que no responde al tratamiento farmacológico disponible, hacen de vital importancia el desarrollo de nuevas terapias. El estudio de diferentes modelos de crisis se hace atractivo para el descubrimiento de nuevas sustancias antiepileptogénicas. En el presente trabajo se escoge, como modelo de crisis agudas, la microperfusión de picrotoxina en el hipocampo ventral de la rata con el fin de estudiar el posible efecto antiepiléptico del agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos ACPT-1, basándonos en su efectividad testada por otros métodos en ensayos previos. Nuestros resultados apoyan estos datos al comprobar que el ACPT-1 no sólo disminuye el patrón de descarga, sino que logra evitar la aparición de crisis de ausencia e incluso del estatus epiléptico.

Palabras clave: epilepsia, microperfusión, picrotoxina, mGluR tipo III, ACPT-1, neuroprotección.

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| Epilepsia | 1 |
| Crisis parciales..... | 2 |
| Crisis generalizadas | 2 |
| Tratamiento de las epilepsias..... | 3 |
| Receptores de glutamato..... | 4 |
| Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) | 4 |
| Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR)..... | 4 |
| Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III..... | 6 |
| Molécula de estudio: ACPT-1 | 7 |
| Objetivo | 9 |
| Material y métodos | 10 |
| Instrumentación y equipos..... | 10 |
| Reactivos | 10 |
| Animales modelo..... | 10 |
| Preparación quirúrgica..... | 11 |
| Técnica de microdiálisis y procedimiento de perfusión | 13 |
| Registro electroencefalográfico | 14 |
| Agente inductor de crisis, picrotoxina..... | 16 |
| Resultados..... | 18 |
| Discusión | 23 |
| Conclusión..... | 25 |
| Bibliografía/ referencias: | 26 |

Introducción

Las epilepsias son desórdenes neurológicos crónicos caracterizados por crisis que involucran tanto sistemas cerebrales específicos, como ataques que comienzan en una región concreta pero que acaban involucrando a múltiples circuitos corticales y subcorticales (Alexander & Godwin, 2006).

El tratamiento actual es sintomático, y si bien los fármacos disponibles inhiben las convulsiones, no se cuenta con una profilaxia eficaz y mucho menos con métodos de curación.

Por otro lado, no se conoce bien la base neuroquímica de la descarga anormal asociada a la epilepsia y dado que en los pacientes epilépticos es difícil realizar estudios detallados, se han desarrollado múltiples modelos, tanto *in vitro* como animales, para tratar de esclarecer el origen de la epilepsia así como para el desarrollo de un tratamiento eficaz.

Para el presente trabajo se ha escogido la microperfusión de picrotoxina en el hipocampo ventral de la rata con el fin de estudiar el posible efecto antiepiléptico del agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos ACPT-1.

Epilepsia

Las epilepsias son trastornos neurológicos frecuentes en los que la función normal del cerebro se ve interrumpida por la actividad intensa y sincronizada de grupos de neuronas (Engel & Pedley, 2008). Lo que comienza como una descarga anormal local puede propagarse a otras regiones del encéfalo, determinando los síntomas, que pueden variar desde un breve lapso de atención hasta un episodio convulsivo completo de varios minutos de duración (Alexander & Godwin, 2006).

Habitualmente, se caracterizan por la aparición de crisis, definiendo a estas como breves cambios comportamentales debidos a la sincronización anormal y al disparo neuronal rítmico (Sierra-Paredes & Sierra Marcuño, 2007).

En general, la excitación se propaga a través de una red de neuronas interconectadas y, en condiciones normales, puede modularse a través de mecanismos inhibidores pero ciertos cambios plásticos de larga duración en el cerebro, afectan a la liberación de neurotransmisores, las propiedades de los receptores y canales, provocando una reorganización sináptica y un cambio en la actividad de los astrocitos. Es decir, la

epileptogénesis puede aparecer cuando se facilita la transmisión excitadora o se reduce la inhibitoria (Sierra-Paredes *et al.*, 2000; Rang *et al.*, 2008).

Este tipo de trastornos afectan al 0,5-1% de la población y a menudo no hay una causa identificable, aunque pueden surgir después de una lesión cerebral u otros tipos de enfermedades neurológicas, entre las cuales se encuentran varios síndromes hereditarios.

El tratamiento fundamental es farmacológico (en casos graves se recurre a la cirugía) y aunque los antiepilépticos actuales controlan eficazmente las crisis en el 50 a 80% de los pacientes, la abundancia de efectos secundarios adversos suele causar que se limite su uso (Rang *et al.* 2008).

La clasificación clínica de la epilepsia en base a registros electroencefalográficos (EEG) distingue entre dos categorías de crisis: las parciales y las generalizadas.

Crisis parciales

Las crisis parciales son aquellas en las que las descargas comienzan de forma local y permanecen de esa forma. En este tipo de crisis la descarga EEG suele limitarse a un hemisferio. Suelen atribuirse a lesiones cerebrales locales (Rang *et al.* 2008).

Crisis generalizadas

Afectan a todo el encéfalo, con una actividad eléctrica anormal de los dos hemisferios. Existen dos grupos importantes, las crisis tónicoclónicas y las ausencias (Rang *et al.* 2008).

Crisis tónicoclónicas

Consisten en una fuerte contracción inicial de la totalidad de la musculatura que produce un espasmo rígido en extensión y un grito involuntario. De forma posterior a la fase tónica aparecen una serie de sacudidas violentas y sincrónicas que ceden de forma gradual en unos minutos. Durante el episodio convulsivo pueden producirse lesiones. El EEG muestra una actividad continua y generalizada de alta frecuencia durante la fase tónica que pasa a descargas intermitentes en la fase clónica (Rang *et al.* 2008).

Crisis de ausencia

Las crisis de ausencia son una forma de crisis generalizada no convulsiva, afecta a ambos hemisferios, y se caracterizan por una detención del comportamiento y la pérdida de consciencia. Los niños son los más afectados por estas crisis de ausencia, constituyendo alrededor de un 10% de las epilepsias infantiles. Durante este tipo de ataques, tanto en

humanos como en modelos animales, el tálamo y el córtex oscila conjuntamente en una descarga de “punta-onda” de 3 Hz característica que se puede observar realizando un electroencefalograma (Alexander & Godwin, 2006; Rang *et al.*, 2008).

El hecho de que se involucre a una neurotransmisión glutamatérgica anormal en el inicio de este tipo de crisis enfatiza la importancia de las sinapsis glutamatérgicas como objetivo farmacológico. Se ha visto que los receptores de glutamato, especialmente los grupos II y III, reducen la liberación presináptica de neurotransmisor en varias áreas del sistema nervioso central y se ha demostrado que modulan la neurotransmisión glutamatérgica córtico-talámica, lo que hace de ellos un objetivo atractivo (Alexander & Godwin, 2006).

Estatus epiléptico

El estatus epiléptico se considera como la forma de crisis más extrema. Corresponde a la aparición de una crisis epiléptica que es lo suficientemente prolongada o repetida, a intervalos muy breves, que produce una condición epiléptica invariable y duradera.

Es una condición que puede tener consecuencias a largo plazo si no se trata de forma inmediata, incluyendo el daño, la muerte neuronal y la alteración de las redes neurales dependiendo del tipo y la duración de la crisis (Trinka *et al.* 2015).

Tratamiento de las epilepsias

Los fármacos antiepilépticos que se utilizan actualmente en clínica actúan inactivando los canales de Na⁺ voltaje-dependientes, aumentando la neurotransmisión gabaérgica, o por bloqueo de los canales de Ca²⁺. Sin embargo, todos ellos presentan importantes efectos secundarios, tales como sedación, ataxia, pérdida o ganancia de peso, problemas cardiovasculares, etc.

Los antiepilépticos empleados de forma clásica incluyen a la fenitoína, carbamacepina, ácido valproico y fenobarbital. Por otro lado, las Benzodiacepinas son algunos de los fármacos más efectivos en el tratamiento de las crisis agudas y el estatus epiléptico. Las Benzodiacepinas más comúnmente usadas son el diazepam (Valium), lorazepam (Ativan) y midozalam (Versed). Los tres compuestos potencian la inhibición del GABA mediante su unión gaba-benzodiacepina y al complejo receptor-barbitúrico. Algunos de los efectos secundarios más destacados incluyen la supresión respiratoria, la hipotensión, la sedación y la irritación de tejidos locales (Sirven & Waterhouse, 2003; Manno, 2011).

Otros fármacos más recientes son la vigabatrina, gabapentina, lamotrigina, felbamato, tiagabina, levetiracetan y zonisamida (Rang *et al.* 2008). Por lo general, estos medicamentos más recientes producen menos efectos secundarios pero su capacidad de control sobre las crisis no es mucho mejor que la de los anteriores y pone de manifiesto la necesidad del desarrollo y de la investigación de nuevos fármacos.

Receptores de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC, y actúa estimulando a dos grupos distintos de receptores: los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR), responsables de la transmisión sináptica rápida, y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), que modulan una transmisión más lenta dependiente de segundos mensajeros.

Se ha visto en modelos animales que ciertos cambios en la expresión de receptores o transportadores de glutamato afectan a las crisis epilépticas e independientemente de cual sea la causa primaria, parece que la liberación de glutamato juega un papel importante en la iniciación y propagación de las crisis (Sierra-Paredes & Sierra Marcuño, 2007; Hovelsø *et al.*, 2012).

Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR)

Los receptores ionotrópicos son proteínas integrales de membrana compuestas por cuatro subunidades que forman un canal con un poro central. (Traynelis *et al.* 2010).

Los receptores de glutamato ionotrópicos pueden diferenciarse farmacológicamente mediante la unión de agonistas específicos en: receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y kainato. Este tipo de receptores median la aparición de corrientes, tanto dependientes como independientes de voltaje, de Na^{+2} y K^{+} y en ocasiones de Ca^{2+} (Wolfgang, 1998).

Los antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato reducen las crisis epilépticas en muchos modelos animales. Sin embargo, estos compuestos fallan de forma temprana en los ensayos clínicos debido a los múltiples efectos secundarios que producen, incluyendo deterioro motor y cognitivo (Hovelsø *et al.*, 2012).

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR)

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se descubrieron a mediados de la década de 1980, siendo una familia de receptores acoplados a proteínas G que

proporcionan un control modulador importante en la transmisión glutamatérgica (Moldrich *et al.*, 2003; Alexander & Godwin, 2006).

La topología de este tipo de receptores metabotrópicos incluye un dominio N-terminal extracelular, tres bucles intracelulares y tres extracelulares y una cola C-terminal citoplasmática, que se encuentran separados por siete regiones hidrofóbicas transmembrana (Figura 1). La porción N-terminal del receptor contiene el lugar de unión a glutamato, donde los dominios intracelulares interactúan físicamente con las proteínas G para iniciar la cascada de transducción de señales.

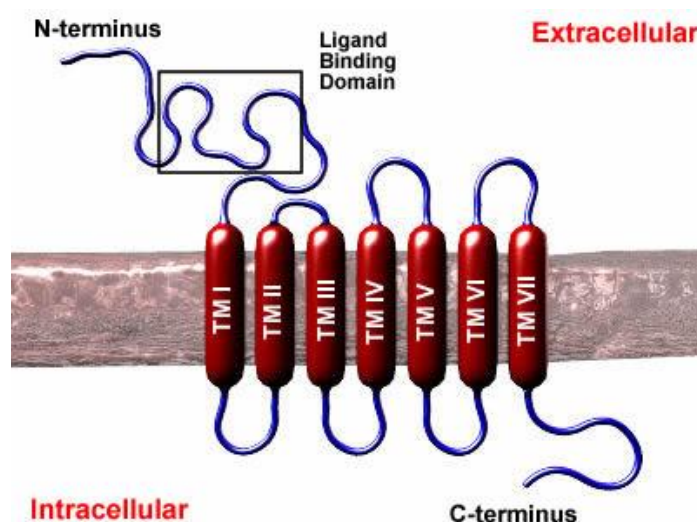


Figura 1: esquema de la estructura de un receptor metabotrópico de glutamato. Imagen tomada de <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/mglur/> (último acceso a 25/06/16).

Esta familia consta de ocho tipos de receptores molecularmente diferentes y que a su vez presentan múltiples variantes de “splice” (Ferraguti & Shigemoto, 2006; Mercier & Lodge, 2014). En base a su secuencia de homología, su perfil farmacológico y su vía de transducción, los receptores mGlu se clasifican en tres grupos (I-III) (Alexander & Godwin, 2006).

El grupo I (mGluR1 y mGluR5) se encuentra acoplado a fosfolipasa C vía proteína Gq, y su activación deriva en la hidrólisis de fosfoinosítido y movilización intracelular de calcio intracelular. Los receptores del grupo II (mGluR2 y mGluR3) y del grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados a G_i/G_o y su activación inhibe la formación de AMPc (Alexander & Godwin, 2006; Hovelsø *et al.*, 2012; Domin *et al.* 2016).

Este tipo de receptores se encuentran ampliamente distribuidos por todo el encéfalo y se han implicado en múltiples funciones en el Sistema Nervioso Central de mamíferos.

Algunas de estas funciones incluyen la mediación de las respuestas de excitación lenta y de inhibición, la regulación de canales de calcio, la inducción de potenciales a largo plazo, la regulación de los receptores de glutamato ionotrópicos, ... y están involucrados en múltiples enfermedades de entre las que destacamos, para este trabajo, las crisis epilépticas (Ferraguti & Shigemoto, 2006).

En esta memoria nos centraremos especialmente en los mGluR del grupo III ya que son la diana de la molécula de estudio ACPT-1.

Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III

Los receptores de glutamato del grupo III se localizan predominantemente en terminales presinápticos de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, donde se involucran en la regulación de la transmisión (Ferraguti & Shigemoto, 2006; Domin *et al.*, 2014; Domin *et al.* 2016).

Como es habitual en los mGluR de grupo III, los receptores mGlu4 se expresan predominantemente de forma presináptica, y se localizan en la zona activa de liberación de neurotransmisores. En el SNC, su expresión es mayor en el cerebelo y niveles moderadamente altos se encuentran también en el bulbo olfatorio y en el tálamo. Una expresión más débil se ha visto en el hipocampo y en los ganglios basales.

La expresión del receptor mGlu6 se encuentra restringida a la retina, donde se han diferenciado 3 variantes de splice. A diferencia de los otros receptores tipo III también se ha localizado en regiones postsinápticas.

Los mGlu7 son los receptores mGlu de tipo III que más se expresan en el SNC destacando en el bulbo olfatorio, el hipocampo, el hipotálamo y en las vías aferentes sensitivas.

Los niveles de expresión de mGlu8 en el SNC son menores que los descritos para mGlu4 o mGlu7. Este tipo de receptor aparece en el bulbo olfatorio, la corteza olfativa primaria, el tálamo, el puente y en los cuerpos mamilares (expresión dependiente de especie). El mGlu8 también se expresa en el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo, la amígdala y la retina (Mercier & Lodge, 2014)

Se ha demostrado que la activación de receptores presinápticos mGlu III localizados en terminales sinápticos glutamatérgicos provocan un descenso en la liberación de glutamato, inhibiendo así la transmisión glutamatérgica excitadora. De esta forma se ha sugerido que la activación de estos receptores podría poseer efectos neuroprotectores. De

hecho, esto se ha mostrado en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Otros estudios muestran efectos anticonvulsivos de los agonistas de los receptores glutamatérgicos del grupo III. De esta forma, estos datos proporcionan evidencias de que este grupo de receptores podrían ser un objetivo atractivo para la terapia neuroprotectora y anticonvulsiva (Domin *et al.*, 2014).

Molécula de estudio: ACPT-1

La molécula de interés para este trabajo es el agonista de receptores mGluR del grupo III ácido tricarboxílico (1S, 3R, 4S)-1-aminociclopentano-1,2,4 o ACPT-1 (Figura 2).

Esta molécula ha demostrado eficacia selectiva para los receptores mGlu de tipo III, concretamente mGlu 4,7 y 8, no afectando a otros receptores metabotrópicos (Goudet *et al.* 2008; Domain *et al.* 2014; Mercier & Lodge, 2014).

El ACPT-1 ha sido estudiado previamente como anticonvulsivo en crisis inducidas por sonido en roedores (Chapman *et al.* 2001; Moldrich *et al.* 2003) y se ha visto que mejoran la actividad anticonvulsiva de antagonistas de receptores AMPA y NMDA (Chapman *et al.* 2001; De Sarro *et al.* 2002). En el año 2014, Domin *et al.* demostraron los efectos neuroprotectores de esta molécula contra la excitotoxicidad inducida por el ácido kaínico, incluso siendo administrada después de haberse producido el daño.

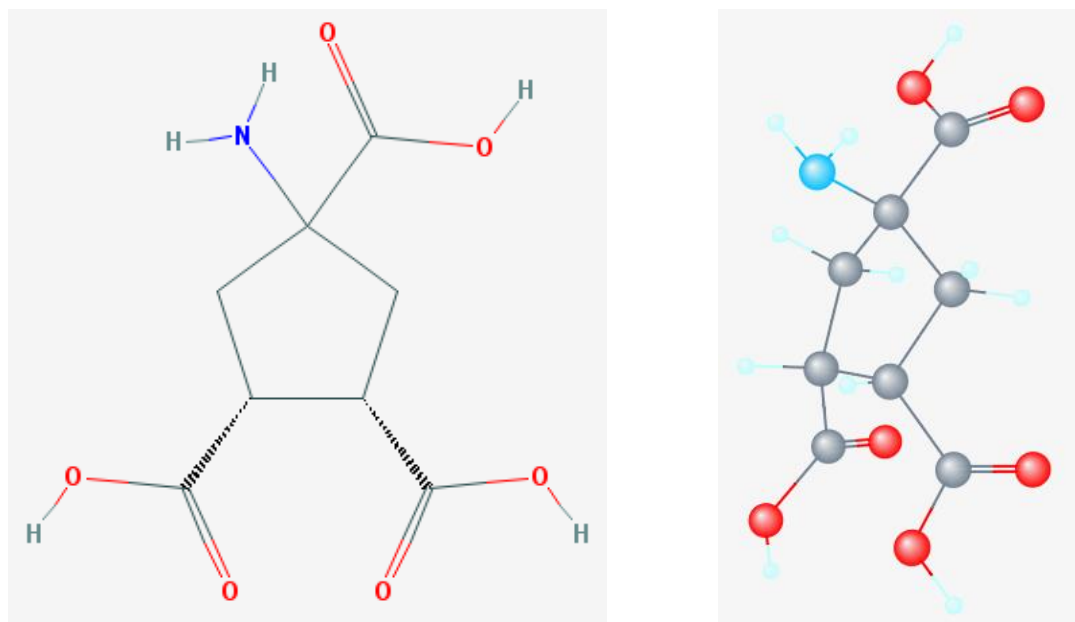


Figura 2: Estructura química del ACPT-1 esquematizada en dos modelos diferentes. Tomadas de *PubChem Compound Database* (último acceso 08/07/16).

Otros estudios muestran un efecto ansiolítico y antidepresivo después de su administración central (Pałucha *et al.* 2004; Stachowicz *et al.* 2006; Kłak *et al.* 2007), y lo mismo en administración periférica tanto en test *in vitro* como en animales modelo (Pałucha-Poniewiera *et al.* 2008; Stachowicz *et al.* 2009). Además, el ACPT-1 tiene efectos antiparkinsonianos en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (López *et al.* 2007, 2008, 2012) y reduce la hiperalgesia neuropática en modelos animales de dolor (Goudet *et al.* 2008). Recientemente se ha estudiado su eficacia en la neuroprotección frente a ataques isquémicos en modelos *in vitro* e *in vivo* (Domin *et al.* 2016).

Por todos estos antecedentes y por su solubilidad en agua, característica indispensable para el modelo de perfusión, se escoge al ACPT-1 como molécula de estudio.

Objetivo

El objetivo principal de este estudio experimental es probar el posible efecto antiepiléptico de ACPT-1 *in vivo*, basándonos en referencias previas que muestran un efecto anticonvulsivo si se administra de forma previa al agente inductor de la crisis, en nuestro caso la picrotoxina.

Para lograr dicho objetivo, se emplea la técnica de microdiálisis en ratas con libertad de movimiento. Esta técnica permite el acceso al hipocampo ventral de la rata sorteando la barrera hematoencefálica, pudiendo focalizar el efecto y no afectando a otras áreas cerebrales.

La microperfusión de picrotoxina permite la generación de crisis de forma repetida en diferentes días sin que haya modificaciones en los patrones de descarga, por ello permite trabajar con el mismo animal durante periodos largos y esto lo convierte en un buen modelo para estudiar el posible efecto terapéutico del agonista de receptores metabotrópicos de glutamato, ACPT-1.

Material y métodos

Instrumentación y equipos

- Unidad de cirugía estereotáxica para animales pequeños (D.Kopf, Tajunga, C.A. USA). Gracias a ella se pueden fijar los tornillos, con los que posteriormente se realiza el registro electroencefalográfico, y situar la guía intracerebral en el hipocampo del animal.
- Unidad de microdiálisis CMA/120 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden), donde se perfunden los diferentes compuestos a los animales en libertad de movimiento en un sistema de contención.
- Sondas de microdiálisis CMA/12 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden).
- Bomba de inyección CMA/100 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden).
- Selector de jeringas CMA/111 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden).
- Microconector (Cannon MD1-9SL1, USA), al que se sueldan los cables de los tornillos que actúan como electrodos.
- Microscopio SMZ-1, Nikon, empleado para comprobar el estado de la sonda de microdiálisis antes y después de su uso.
- Electroencefalógrafo (EEG) Minihuit (Alvar Electronic, Paris, France) mediante el cual se registra la actividad bioeléctrica cerebral de la rata.
- Unidad de video-EEG (MaxG, Zamora, España) que permite el registro digital del EEG y la observación de la conducta del animal durante todo el experimento.

Reactivos

- Solución Ringer-lactato (147,0 mM ClNa; 4,0 mM ClK; 2,4 mM Cl₂Ca). Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.
- Picrotoxina. Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.
- Ácido tricarboxílico (1S, 3R, 4S)-1-aminocyclopentane-1, 2, 4 (ACPT-1). Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.

Animales modelo

Se emplearon 4 ratas macho Sprague-Dawley (300-350g) proporcionadas por el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela.

Los individuos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y agua, tanto antes como después de la intervención. La temperatura y la humedad ambiental, así

como los ciclos de luz/oscuridad, se encuentran bajo condiciones controladas (temperatura ambiental $21 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad del 50–60%, ciclo luz/oscuridad 12/12 horas). Los ensayos tuvieron lugar a la misma hora de la mañana con el fin de evitar variaciones del ritmo circadiano.

Las pruebas se realizaron por completo en cada rata y de forma seriada con la intención de optimizar el sistema, ya que la probabilidad de que el montaje se desprenda aumenta con el paso del tiempo.

Los protocolos utilizados en el experimento de microdiálisis se desarrollaron de forma que el número de individuos empleados fuera el mínimo, siendo cada animal control de sí mismo y dejando un lapso de una semana entre ensayo y ensayo.

Tanto el cuidado como el trabajo con los animales se llevaron a cabo bajo el cumplimiento de la legislación española vigente sobre el uso de animales para la experimentación y otras finalidades científicas, de acuerdo con la regulación de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986).

Al término del estudio, los animales fueron sacrificados por decapitación, previa administración de CO_2 .

Preparación quirúrgica

Los animales se colocan en una unidad de estereotaxis, después de ser anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/Kg), lo que permite una mejor manipulación a la hora de realizar los orificios necesarios para colocar los tornillos y la guía intracerebral.

Los 6 orificios se realizan con un trépano de dentista bajo condiciones asépticas. Cinco de ellos permiten registrar la actividad bioeléctrica del cerebro de la rata en un EEG, después de la colocación de los microtornillos (4 de ellos actúan como electrodos y el quinto, como referencia) que se encuentran soldados a un microconector. Los microtornillos que actúan como electrodos se sitúan en las áreas frontal y occipital de ambos hemisferios del cráneo y el electrodo de referencia se ancla a la línea media 7-9 mm rostral a la sutura coronal. En el sexto orificio se implanta la guía para la sonda de microdiálisis cuya posición, hipocampo ventral, se localiza de acuerdo a los valores mostrados en el Atlas Cerebral de Paxinos y Watson (1997) que son: 5mm posteriores, 4.8mm laterales y 4mm ventrales desde la punta de la cánula y referenciados al punto Bregma (Figura 3).

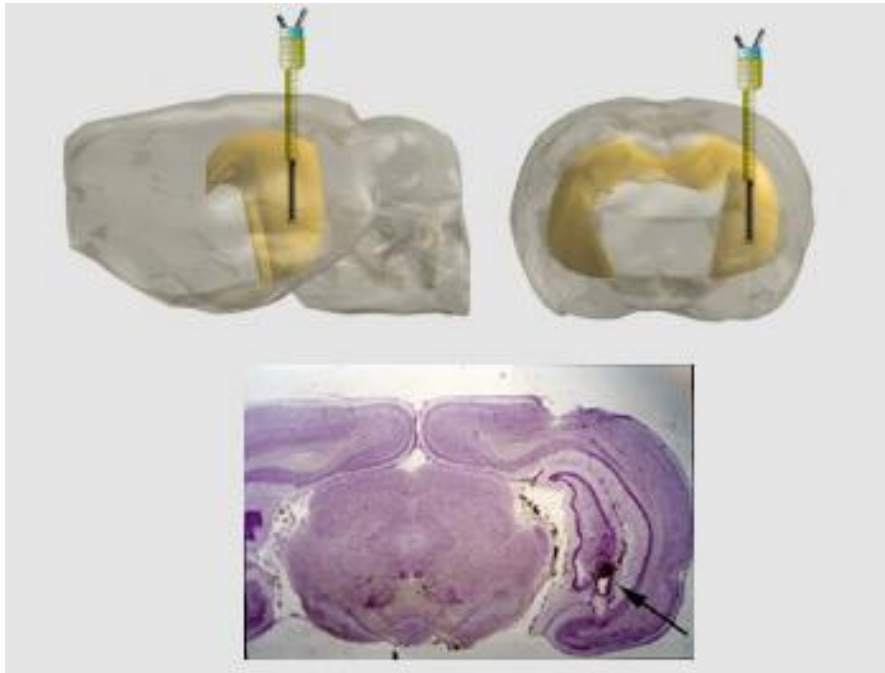


Figura 3: las imágenes superiores muestran un esquema de la colocación de la sonda de microdiálisis en el hipocampo ventral de la rata. La inferior es un corte del cerebro de rata con la zona de inserción de la sonda marcada con una flecha.

Para evitar que los electrodos o la guía se muevan, se fija el montaje al cráneo mediante el uso de cemento acrílico (Figura 4).

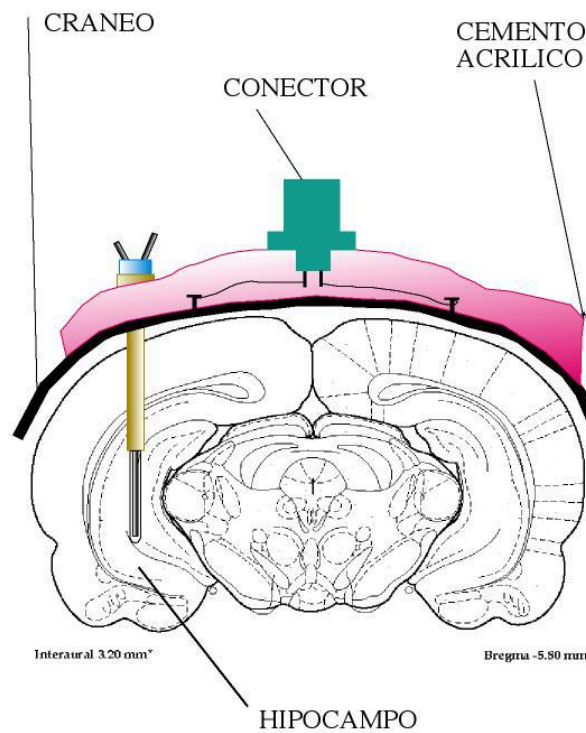


Figura 4: Esquema de la colocación del montaje en el cráneo de la rata. Se aprecia la localización de la sonda de microdiálisis y del conector para el registro de EEG.

Al finalizar la intervención, el animal regresa a su jaula individual y se deja para su recuperación como mínimo cinco días, antes de realizar ninguna prueba con él. Pasado este plazo de tiempo, se coloca al individuo durante periodos breves en el contenedor donde se realizan los experimentos posteriores, de forma que se habitúe al ambiente de trabajo y a los equipos del laboratorio.

Técnica de microdiálisis y procedimiento de perfusión

En la técnica de microdiálisis se introduce una sonda con una membrana semipermeable en el tejido cerebral de un sujeto y se perfunde con una solución (Ringer) que contiene las sustancias de interés. La membrana de la sonda permite la difusión del soluto pero no el transporte de proteínas u otras macromoléculas.

La sonda de microdiálisis (CMA/12), consta de una entrada (*inlet*) y una salida (*outlet*), como se aprecia en la figura 5. La entrada a la sonda se une a un selector de jeringas (CMA/111) mediante un tubo de polietileno, y éste a una jeringa de 1 ml montada en una bomba de microinyecciones (CMA/100). La zona de salida, irá acoplada también a un tubo de polietileno, que permite la recogida de muestras en caso de que se realice un análisis posterior.

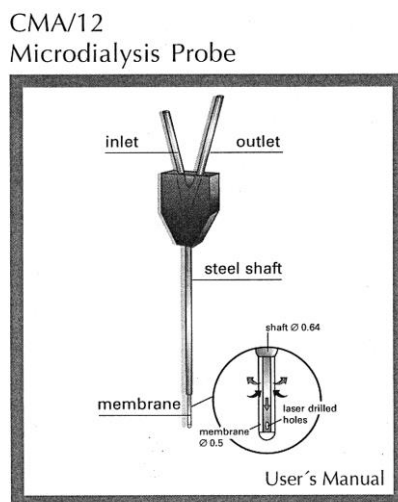


Figura 5: Microsonda CMA/12. Imagen tomada del manual de usuario

Antes de proceder con el experimento es necesario eliminar cualquier residuo o producto químico que pueda haber en la sonda o en los tubos para lo cual se perfunde primero con etanol y después con agua destilada. Esto permite, además, la comprobación del estado de la sonda, que se observa a través de un microscopio.

Las microsondas son reutilizadas, siempre y cuando la membrana de diálisis se compruebe intacta y sean esterilizadas previamente a su inserción en la guía intracerebral del animal.

Las sesiones experimentales realizadas fueron planteadas de la siguiente manera:

- Registro encefalográfico control de 1 hora, previo a la introducción de la toxina epileptogénica, en la que se perfunde la solución Ringer a una velocidad de flujo de 2 μ L/min.
- Perfusión de picrotoxina disuelta en solución Ringer, con la concentración convulsiva para cada animal, durante 5 minutos.
- Administración de solución Ringer durante otra hora, en la que se observará tanto el comportamiento del animal como las variaciones en el electroencefalograma con el fin de comprobar la efectividad de la molécula de estudio.

Los protocolos empleados están determinados por experiencias y estudios previos de Sierra-Paredes & Sierra-Marcuño (1996), Sierra-Paredes *et al.* (2000) Vázquez-López *et al.* (2005).

Registro electroencefalográfico

Un registro electroencefalográfico es una representación gráfica de la actividad eléctrica cerebral que refleja la diferencia de potencial entre dos zonas de la corteza cerebral.

Este tipo de registro es habitualmente empleado para el estudio de funciones cerebrales y para el trazado de conexiones entre áreas del SNC. Es de destacado valor en el diagnóstico de la epilepsia, de tumores cerebrales y otras enfermedades con daño cerebral.

Para este trabajo presenta un papel fundamental dado que permite la detección de patrones específicos de descarga que ocurren durante las crisis, como son los aumentos de frecuencia y amplitud, el fenómeno de punta onda, etc.

Durante el desarrollo del experimento, los sujetos son, además, monitorizados por vídeo pudiendo relacionar las alteraciones motoras con el EEG (figura 6) y de esta forma determinar la naturaleza de la crisis. Los posibles síntomas motores incluyen movimientos faciales y bucales, automatismos olfativos, sacudidas de cabeza, contracciones involuntarias y repetitivas de patas anteriores, y convulsiones.

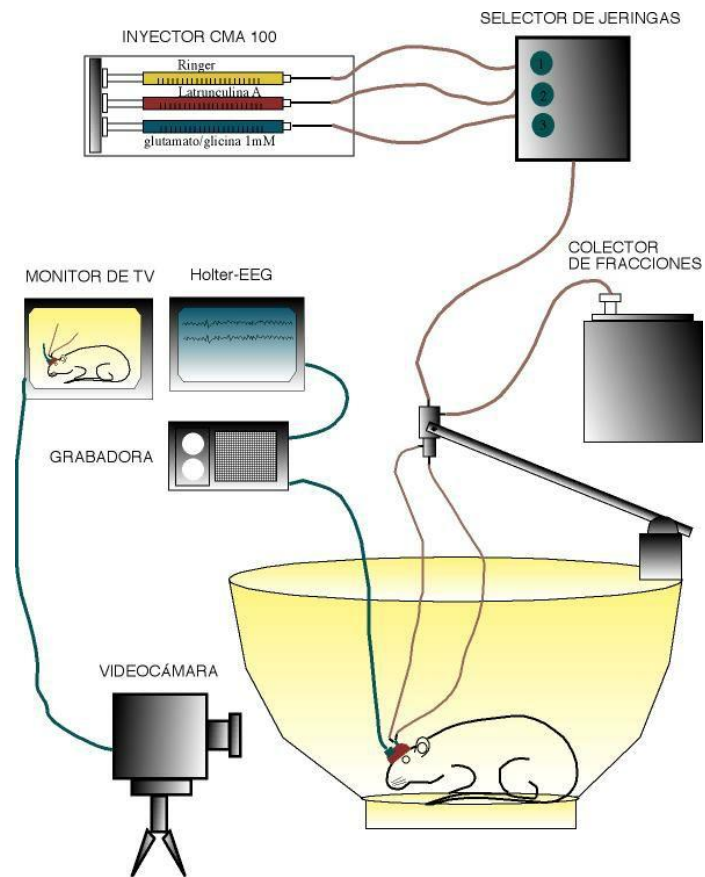


Figura 6: Esquema de la instrumentación y equipos.

La combinación del registro encefalográfico y de vídeo durante las pruebas permite la determinación del umbral mínimo convulsivo de cada animal tras la perfusión de picrotoxina y la evaluación del posible efecto anticonvulsivo del ACPT-1 tras dicha perfusión.



Imagen 1: rata en el contenedor de registro durante el desarrollo del ensayo.



Imagen 2: rata en el contenedor de registro durante el desarrollo del ensayo.

Agente inductor de crisis, picrotoxina

La picrotoxina es un compuesto químico que se extrae de las semillas de la planta trepadora *Anamirta cocculus* (Jarboe *et al.*, 1968). El efecto convulsivo que produce se relaciona con la alteración de la inhibición GABAérgica (Denisenko, 2015), es un antagonista no competitivo de los receptores de GABA_A. Esta toxina impide el flujo de iones Cl⁻ a través del canal de dicho receptor, reduce la frecuencia y tiempo de apertura del canal, de forma que también altera la conductancia (Sierra-Paredes, 1996).

Varios estudios han demostrado la efectividad de la picrotoxina como agente proconvulsionante tanto inyectado como mediante la técnica de microdiálisis. (Sierra-Paredes & Sierra-Marcuño, 1996; Sierra-Paredes *et al.*, 2000; Denisenko, 2015). Dado que no provoca cambios permanentes en los animales ni provoca crisis espontáneas fuera del marco experimental, se convierte en un modelo de estudio atractivo para el presente trabajo.

La actividad epileptiforme se induce mediante microperfusión de picrotoxina (Sigma, USA) en concentraciones crecientes, desde una concentración inicial de 0,10µg/ml en cada animal y sesión experimental. La concentración de partida, se toma de estudios previos que demuestran que concentraciones inferiores no presentan efectos en las ratas modelo.

Con un intervalo de 4-5 días se incrementa paulatinamente la concentración de picrotoxina hasta que se produce una crisis, siendo ese el umbral convulsivo mínimo del individuo.

Resultados

El intervalo de concentraciones de picrotoxina desde 0,15 a 0,35 $\mu\text{g/ml}$, permitió alcanzar el umbral convulsivo en el 100% de los animales, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1 y se detallan para cada rata en apartados posteriores. En el 75% de los animales las concentraciones umbrales convulsivas provocaron crisis leves de tipo ausencia, mientras que en el 25 % restante se llegó a la condición de estatus epiléptico (después de pasar por la ausencia, la crisis parcial y la crisis generalizada). En este último caso, y para evitar que el animal muriese se le inyectó Valium (4mg/kg) intraperitonealmente.

Es posible que el ACPT-1 tenga además cierto efecto sedante. En las pruebas con este compuesto los animales aparecían más tranquilos, con una conducta exploratoria reducida y en el registro electroencefalográfico aparecían ciertos patrones similares a los producidos por las benzodiazepinas (Figura 9 A).

| <i>Picrotoxina</i> <i>mg/ml</i> | <i>Rata 1</i> | <i>Rata 2</i> | <i>Rata 3</i> | <i>Rata 4</i> |
|--|-------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>0,15</i> | Descargas punta-onda | Ausencia | Descargas punta-onda | Descargas punta-onda |
| <i>0,20</i> | Ausencia | - | Status | Descargas punta-onda |
| <i>0,25</i> | - | - | - | Descargas punta-onda |
| <i>0,35</i> | - | - | - | Ausencia |
| <i>Dosis</i> <i>umbral+ACPT1</i> <i>200$\mu\text{l/ml}$</i> | No crisis | No crisis | No crisis | No crisis |

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos para cada rata.

Las concentraciones protectoras de ACPT-1 se extrapolaron de estudios previos que, aunque no mediante la técnica de microdiálisis, sirvieron como orientación.

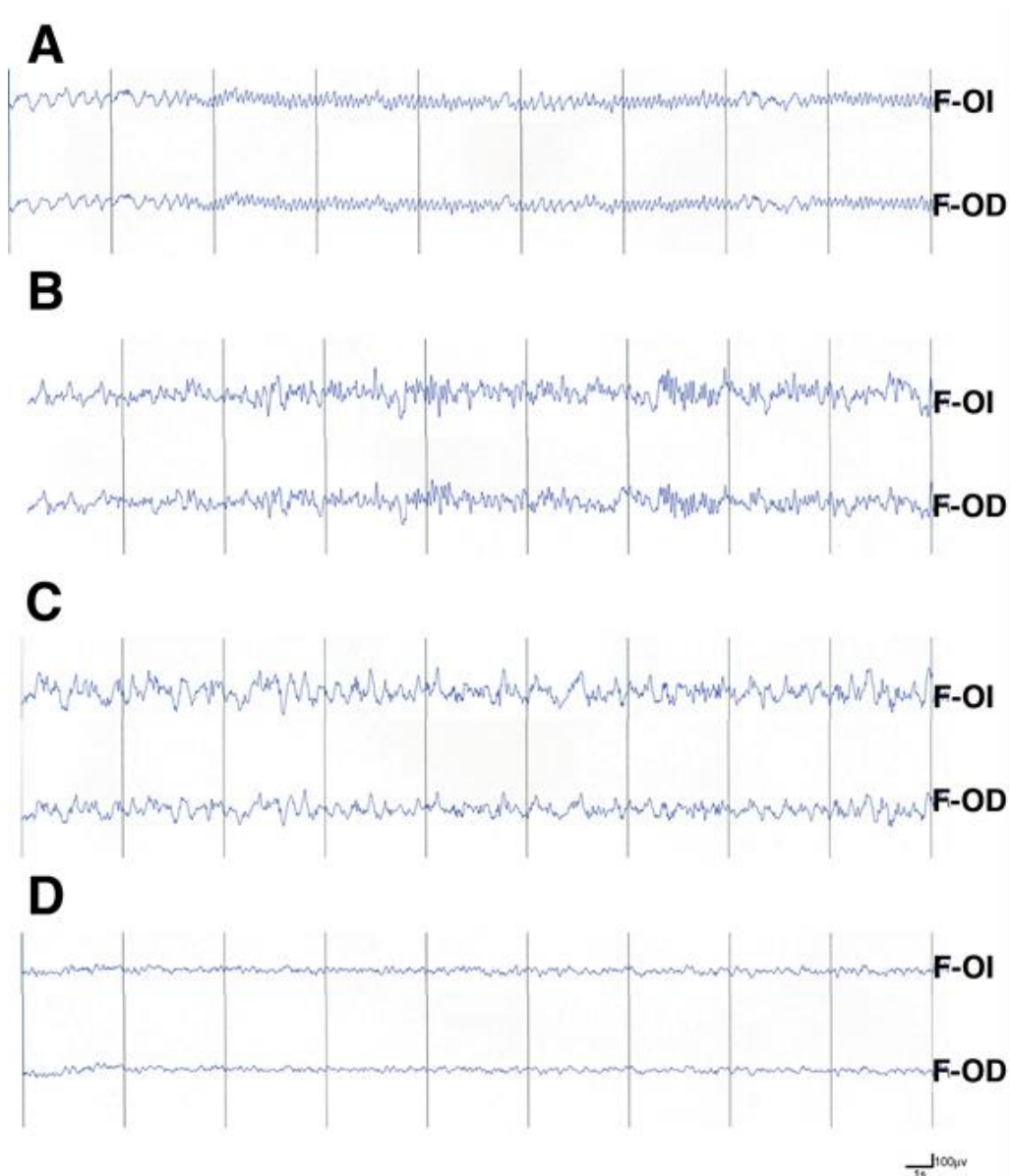


Figura 7: Patrones control de EEG mostrados por las ratas. F-OI: Frontal occipital izquierdo; F-OD: Frontal occipital derecho.

Rata 1

Después de haber realizado varias sesiones breves de reconocimiento del ambiente y una sesión control en la que sólo se perfundió solución Ringer (Figura 7), se procedió con la búsqueda del umbral de crisis. En la primera experiencia con picrotoxina, la concentración empleada fue de 0,15 mg/ml, y se observaron pequeñas descargas punta-onda, que, aunque características de una actividad epileptogénica, no representan una crisis. Tras una semana se repitió el mismo procedimiento (una hora de control con Ringer, cinco minutos con Ringer-picrotoxina, una hora de observación con Ringer) pero aumentando la concentración de picrotoxina hasta 0,20 mg/ml. En esta ocasión, se

observa un aumento paulatino de la frecuencia y amplitud de las descargas punta-onda y se alcanza una crisis de ausencia (Figura 8B), alrededor de media hora después de la perfusión de la toxina, siendo esta concentración la considerada como umbral de crisis para este sujeto.

Una vez obtenida la concentración umbral de crisis y de dejar una semana de recuperación al animal se llevó a cabo el ensayo para el estudio del efecto anticonvulsivante de la perfusión de ACPT-1. El experimento se realiza de la misma forma salvo que en esta ocasión a la solución de Ringer empleada tanto durante la hora de control como en la de observación, se le añade ACPT-1 en una concentración de 200 µg/ml.

Se observa que para la rata 1 el ACPT-1, a dicha concentración, actúa como anticonvulsivante, ya que las descargas punta-onda aparecen con una frecuencia muy reducida y con una amplitud menor que durante la prueba anterior (Figura 9). No se alcanza la crisis de ausencia.

Rata 2

En el sujeto número 2, el experimento se llevó a cabo exactamente igual que en la rata 1. En este caso, el umbral de crisis se alcanzó con la primera dosis probada, con 0,15 mg/ml de picrotoxina. El animal después de varias descargas punta-onda, sufrió dos crisis de ausencia (Figura 8B): la primera tuvo lugar pasados 15 minutos de la perfusión de picrotoxina; y la segunda después de la media hora. Tras esto, las descargas punta-onda fueron disminuyendo poco a poco hasta desaparecer y recuperar el EEG normal.

En la rata 2, la concentración de ACPT-1 empleada (200 µg/ml) también redujo la frecuencia de las descargas punta-onda y evitó la aparición de la crisis de ausencia.

Rata 3

El transcurrir del experimento es el mismo que con los animales anteriores. En el caso de la rata 3, la concentración de picrotoxina (0,15 mg/ml) de la primera sesión sólo derivó en descargas punta onda.

En la segunda sesión se aumenta la concentración a 0,20 mg/ml y las descargas punta onda aparecen en con una frecuencia muy elevada prontamente, en comparación con los sujetos anteriores. Antes de alcanzar los 15 minutos (después de la perfusión de picrotoxina) se llega a una crisis de ausencia (Figura 8B). El animal continúa con más descargas punta-onda y alrededor de los 20 minutos la rata alcanza una crisis parcial

(contracción de los miembros anteriores) (Figura 8C). Tras esto y antes de llegar a la media hora, sufre una crisis generalizada y entra en estatus epiléptico (Figura 8D), por lo que para evitar su muerte se le inyecta Valium (4mg/kg i.p.).

Tras una semana, con el animal totalmente recuperado, se procede con la prueba con ACPT-1. Las descargas punta-onda aparecen en esta ocasión con una frecuencia mucho menor que en la sesión anterior, no se alcanza ningún tipo de crisis epiléptica y no se llega al estatus epiléptico.

Rata 4

Con el cuarto sujeto fueron necesarias cuatro sesiones de aumento de concentración de picrotoxina antes de llegar al umbral de crisis. En las tres primeras se observaron descargas punta-onda, siendo necesaria una concentración de picrotoxina de 0,35mg/ml para alcanzar la crisis de ausencia (Figura 8B) a los 35 minutos post-perfusión de picrotoxina.

De nuevo el ACPT-1 perfundido muestra efecto neuroprotector, disminuye la frecuencia y amplitud de las descargas punta-onda y evita la aparición de la crisis de ausencia.

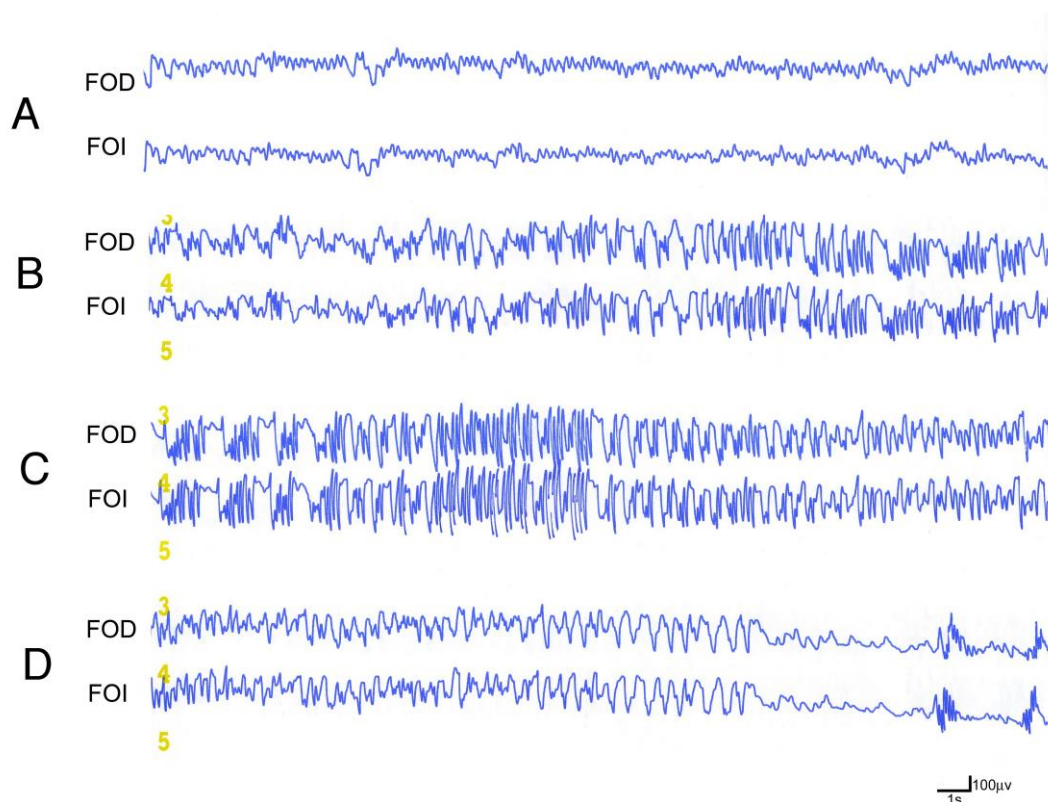


Figura 8: Registro EEG para los diferentes tipos de crisis. F-OI: Frontal occipital izquierdo; F-OD: Frontal occipital derecho. A: EEG control; B: ausencia; C: crisis motora y D: estatus epiléptico.

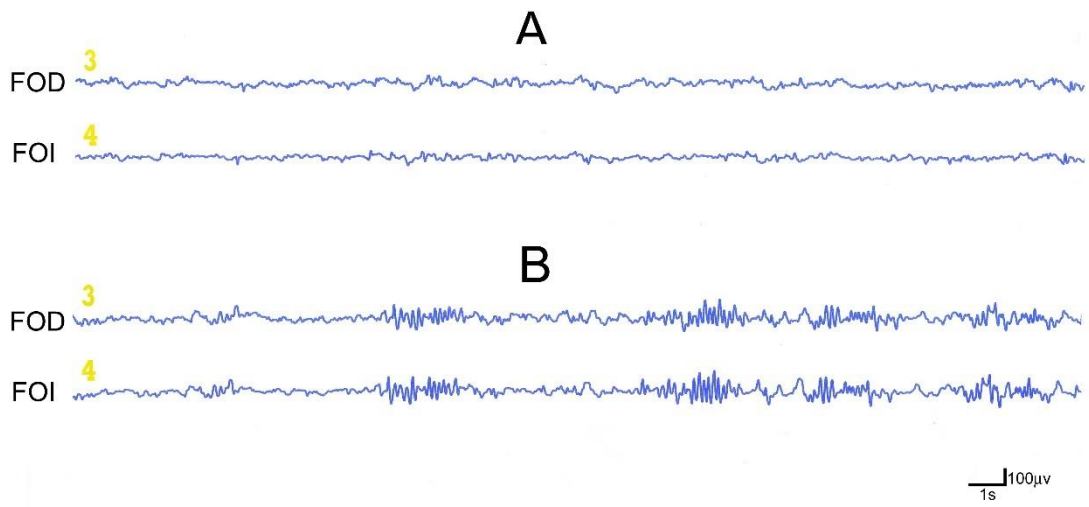


Figura 9: Comparación entre un EEG control (A) y con ACPT-1 (B).

Discusión

Como ya se ha mencionado en apartados previos, la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo III, al disminuir la liberación de glutamato, reduce la actividad epileptogénica. Es por ello que el uso de agonistas para estos receptores es un enfoque de estudio interesante para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio apoyan al ACPT-1 como una molécula de valor antiepiléptico y confirman resultados de otros estudios de su efecto neuroprotector, aunque ninguno de ellos emplea como modelo de epilepsia la perfusión de picrotoxina en el hipocampo ventral de la rata. De todas formas y al igual que en Chapman *et al.* (2001) y Moldrich *et al.* (2003), donde la molécula se inyectaba intracerebroventricularmente en crisis inducidas por sonido, las crisis disminuyen considerablemente o desaparecen. Es decir, no parece que la vía de administración de ACPT-1 utilizada determine o altere el efecto neuroprotector que la misma confiere.

En todos los animales ensayados por nosotros, el efecto anticonvulsivo de la molécula ACPT-1 fue evidente. En las ratas 1, 2 y 4 se eliminaron por completo las crisis de ausencia y las descargas esporádicas disminuyeron prácticamente de todo. En el sujeto 3, que tuvo una reacción mucho más marcada a la picrotoxina, todavía se observaron descargas punta-onda pero se evitaron tanto las diferentes crisis como la entrada en estatus epiléptico.

Del mismo modo que Chapman *et al.* (2001) tampoco detectamos actividad proconvulsiva, cosa que sí ocurre con otros agonistas como el L-AP4 o el L-SOP, con los que un exceso de dosis favorece la aparición de crisis como sí describió el mismo equipo en 1999.

En las cuatro ratas ensayadas se detectó un descenso en la conducta exploratoria con la administración de ACPT-1. Durante las pruebas con este compuesto los animales estaban más tranquilos que en los ensayos control y tenían más tendencia a quedarse dormidos. En el registro encefalográfico se pudo observar que aparecían ciertas ondas similares a las que produce la administración de Benzodiazepinas. Es por esto que sugerimos que este agonista de receptores mGlu de tipo III podría actuar como sedante además de como antiepiléptico. Este efecto también es detectado en el estudio realizado por Chapman y colaboradores en el 2001 en el modelo de epilepsia inducida por sonido.

Como demuestran Domin y colaboradores (2014) el efecto neuroprotector del ACPT-1 aparece incluso cuando su aplicación es posterior a que se produzca el daño ya sea tanto *in vivo* como *in vitro*, y disminuye la excitotoxicidad causada por el ácido kaínico.

Además De Sarro *et al.* (2002) demostraron que la combinación de ACPT-1 con antagonistas de AMPA o NMDA potencia el efecto antiepiléptico de estos últimos.

La hipótesis de neuroprotección para el ACPT-1 se refuerza con los resultados de múltiples estudios para otras enfermedades neurológicas. López y colaboradores (2007, 2008, 2012) lo demuestran en sus estudios en modelos de Párkinson. De igual manera los efectos sobre depresión y ansiedad (Pałucha *et al.* 2004; Stachowicz *et al.* 2006; Kłak *et al.* 2007; Pałucha-Poniewiera *et al.* 2008; Stachowicz *et al.* 2009) y la protección en modelos de dolor crónico (Goudet *et al.* 2008), así como la neuroprotección frente a ataques isquémicos en modelos *in vitro* e *in vivo* (Domin *et al.* 2016) no hacen más que reafirmar el ya dicho elevado potencial para el desarrollo de nuevas terapias de neuroprotección mediante el estudio de no sólo este compuesto sino también de otros agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo III.

El modelo de estudio crónico escogido permite que con un tamaño muestral reducido los resultados obtenidos sean significativos, un 100 % de eficacia en la evitación de las crisis. Aunque esta memoria no refleja más que un estudio previo, y a falta de más pruebas, el ACPT-1 aparece como una molécula prometedora en el desarrollo de nuevas terapias anticonvulsivas.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el efecto antiepiléptico del agonista de mGluR tipo III ACPT-1 *in vivo*. Un efecto que deriva posiblemente de la inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica excitadora.

La efectividad que muestra en todos los individuos analizados es esperanzadora para un potencial uso terapéutico ya que, administrado de forma previa, consigue no sólo disminuir las descargas epilépticas, si no que evita las crisis y la aparición del estatus epiléptico. Todo esto sumado a estudios anteriores, hace pensar que podría ser un elemento clave en el desarrollo de nuevas terapias de prevención de crisis epilépticas.

Bibliografía/ referencias:

- Alexander, G.M. & Godwin, D.W. 2006. Metabotropic glutamate receptors as strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy research* 71, 1-22 Doi: 10.1016/j.eplepsyres.2006.05.012
- Chapman, A.G.; Nanan, K.; Yip, P.; Meldrum, B.S. 1999 Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist, (R,S)-4 phosphonophenylglycine. *European Journal of Pharmacology*. 383, 23–27. Doi: 10.1016/S0014-2999(99)00615-9
- Chapman, A.G.; Talebi, A.; Yip, P.K. & Meldrum, B.S. 2001. Anticonvulsant activity of a mGlu_{4α} receptor selective agonist, (1S, 3R, 4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *European Journal of Pharmacology*. 424, 107–113
- Denisenko, O.V. & Shandra, O.A. 2015. Two types of Epileptiform Activity Induced in Rats by Repeated Injections of Subconvulsive Picrotoxin Doses. *Neurophysiology*. 47(2). Doi: 10.1007/s11062-015-9513-2
- De Sarro, G.; Chimirri, A.; Meldrum, B.S. 2002. Group III mGlu receptor agonists potentiate the anticonvulsant effect of AMPA and NMDA receptor block. *European Journal of Pharmacology*. 451(1), 55–61. Doi: 10.1016/S0014-2999(02)02004-6
- Domin, H.; Golembiowska, K.; Jantas, D.; Kaminska, K.; Zieba, B.; Smialowska, M. 2014. Group III mGlu Receptor Agonist, ACPT-1, Exerts Potential Neuroprotective Effects In Vitro and In Vivo. *Neurotoxicity Research*, 26, 99-113. Doi: 10.1007/s12640-013-9455-7
- Domin, H.; Przykaza, L.; Jantas, D.; Kozniewska, E.; Boguszewski P.M & Smialowska, M. (2016) Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-1 in animal models of ischemic stroke: *In vitro* and *in vivo* studies. *Neuropharmacology*. 102, 276-294. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.025
- Engel, J.; Pedley, T.A. 2008. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2^a Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA
- Ferraguti, F. & Shigemoto, R. 2006. Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Research*. 326 (2), 483-504. Doi: 10.1007/s00441-006-0266-5

- Goudet, C.; Chapuy, E.; Alloui, A.; Acher, F.; Pin, J.P.; Eschalier, A. 2008 Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. *Pain*. 137,112–124. Doi: 10.1016/j.pain.2007.08.020
- Hovelsø, N.; Sotty, F.; Montezinho, L.P.; Pinheiro, P.S.; Herrik, K.F.; Mørk, A. 2012 Therapeutic Potential of Metabotropic Glutamate Receptor Modulators. *Current Neuropharmacology*. 10(1), 12–48. Doi: 10.2174/157015912799362805
- Jarboe, C. H.; Porter, L.A.; Buckler, R.T. 1968. Structural aspects of picrotoxinin action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 4, 729-31. Doi: 10.1021/jm00310a020
- Kłak, K.; Pałucha, A.; Brański, P.; Sowa, M.; Pilc, A. 2007. Combined administration of PHCCC, a positive allosteric modulator of mGlu4 receptors and ACPT-I, mGlu III receptor agonist evokes antidepressant-like effects in rats. *Amino Acids*. 32(2), 169-72. Doi: 10.1007/s00726-006-0316-z
- Lopez, S.; Turle-Lorenzo, N.; Acher, F.; De Leonibus, E.; Mele, A.; Amalric, M. 2007 Targeting group III metabotropic glutamate receptors produces complex behavioral effects in rodent models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience* 27(25), 6701–6711. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0299-07.2007
- Lopez, S.; Turle-Lorenzo, N.; Acher, F.; De Leonibus, E.; Mele, A.; Amalric, M. 2008. Functional interaction between adenosine A2A and group III metabotropic glutamate receptors to reduce parkinsonian symptoms in rats. *Neuropharmacology*. 55(4), 483-90. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.038
- Lopez, S.; Turle-Lorenzo, N.; Acher, F.; De Leonibus, E.; Mele, A.; Amalric, M. 2012. Antiparkinsonian action of a selective group III mGlu receptor agonist is associated with reversal of subthalamonigral overactivity. *Neurobiology of Disease*. 46(1), 69-77. Doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.045
- Manno, E.M. 2011. Status Epilepticus. *Neurohospitalist*. 1(1), 23–31. Doi: 10.1177/1941875210383176
- Mercier, M.S & Lodge, D. 2014. Group III Metabotropic Glutamate Receptors: Pharmacology, Physiology and Therapeutic Potential. *Neurochemical Research*. 39, 1876–1894. Doi: 10.1007/s11064-014-1415-y

Moldrich, R.X.; Chapman, A.G.; De Sarro, G.; Meldrum, B.S. 2003. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *European Journal of Pharmacology*. 476, 3-16. Doi: 10.1016/S0014-2999(03)02149-6

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6604820, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6604820> (último acceso el 8 de Julio, 2016): Imagen estructural del ACPT-1.

Pałucha, A.; Tatarczyńska, E.; Brański, P.; Szewczyk, B.; Wierońska, J.M.; Kłak, K.; Chojnacka-Wójcik, E.; Nowak, G.; Pilc, A. 2004 Group III mGlu receptor agonists produce anxiolytic- and antidepressantlike effects after central administration in rats. *Neuropharmacology*. 46 (2), 151–159. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2003.09.006

Pałucha-Poniewiera, A.; Kłodzin´ska, A.; Stachowicz, K.; Tokarski, K.; Hess, G.; Schann, S.; Frauli, M.; Neuville, P.; Pilc, A. 2008 Peripheral administration of group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts potential antipsychotic effects in rodents. *Neuropharmacology*. 55, 517–524. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.033

Paxinos G.; Watson C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd Ed. Academic Press. San Diego, California.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J. 2008. *Farmacología*. 6ªEd. Elsevier. Barcelona, España.

Sierra-Paredes, G.; Galán-Valiente, J.; Vazquez-Illanes, M.D.; Aguilar-Veiga, E.; Sierra-Marcuño, G. 2000. Effect of ionotropic glutamate receptors antagonists on the modifications in extracellular glutamate and aspartate levels during picrotoxin seizures: a microdialysis study in freely moving rats. *Neurochemistry International*. 37(4), 377-386. Doi: 10.1016/S0197-0186(00)00038-3

Sierra-Paredes, G. & Sierra-Marcuño, G. 1996. Microperfusion of picrotoxin in the hippocampus of chronic freely moving rats through microdialysis probes: a new method of induce partial and secondary generalized seizures. *Journal of neuroscience methods*. 67(2), 113-120. Doi: 10.1016/0165-0270(96)00040-4

Sierra-Paredes, G. & Sierra-Marcuño, G. 2007. Extrasynaptic GABA and Glutamate Receptors in Epilepsy. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 6, 288-300. Doi: 10.2174/187152707781387251

Sirven, J.I. & Waterhouse, E. 2003. Management of Status Epilepticus. *American Family Physician*. 68(3),469-476. PMID: 12924830

Stachowicz, K.; Chojnacka-Wójcik, E.; Kłak, K.; Pilc, A. 2006. Anxiolytic-like effects of group III mGlu receptor ligands in the hippocampus involve GABAA signaling. *Pharmacological Reports*. 58(6),820-6. PMID: 17220539

Stachowicz, K.; Kłodzińska, A.; Palucha-Poniewiera, A.; Schann, S.; Neuville, P.; Pilc, A. 2009. The group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts anxiolytic-like but not antidepressant-like effects, mediated by the serotonergic and GABA-ergic systems. *Neuropharmacology*. 57(3), 227-34. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.005

Traynelis, S.F.; Wollmuth, L.P.; McBain, C.J.; Menniti, F.S.; Vance, K.M.; Ogden, K.K.; Hansen, K.B.; Yuan H.; Myers, S.J.; Dingledine, R. 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*. 62(3), 405–496. Doi: 10.1124/pr.109.002451

Trinka E.; Cock, H.; Hesdorffer, D.; Rossetti, A.O.; Scheffer, I.E.; Shinnar, S.; Shorvon, S. & Daniel H. Lowenstein, D.H. 2015. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 56 (10), 1515–1523. Doi: 10.1111/epi.13121

Vázquez-López, A.; Sierra-Paredes, G.; Sierra-Maruña, G. 2005 Role of cAMP-Dependent Protein Kinase on Acute Picrotoxin-Induced Seizures. *Neurochemical Research*. 30 (5), 613–618 Doi: 10.1007/s11064-005-2748-3

Wolfgang, L. (1998) Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Progress in Neurobiology*. 54, 721-741. Doi: 10.1007/978-1-4615-5375-5_31