

Modelo PTZ: un *screening* primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante

FR. Ramos-Morales¹, J. Correa-Basurto², M. Saavedra-Vélez³, ME Acosta-Hernández¹, E. Gasca-Pérez¹, A. Pérez-Palacios¹, J. Trujillo-Ferrara²

RESUMEN

La epilepsia es una enfermedad crónica la cual se define por un conjunto de trastornos neurológicos que deja una elevada predisposición en el cerebro para generar convulsiones recurrentes. Si bien se carece de una cura para este desorden cerebral; sin embargo, para su tratamiento se emplean fármacos que inhiben los mecanismos bioquímicos que generan la sintomatología, llamados anticonvulsivantes. Lo cual destaca la necesidad del empleo de modelos animales para el estudio de esta patología, así como, el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos, que aportan los conocimientos básicos para el entendimiento de los mecanismos de la enfermedad y son apropiados para el estudio de mecanismos de inducción de convulsiones. Dentro de estos modelos destaca el de inducción química por pentilentetrazol, el cual, por su bajo costo y su fácil manejo el es ampliamente utilizado en el descubrimiento y desarrollo de fármacos anticonvulsivantes.

Palabras clave: epilepsia, modelos animales, pentilentetrazol.

Modelo PTZ: un *screening* primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic disease which is defined by a set of neurological disorders that leaves a high predisposition in the brain to recurrent seizures. While no cure for this brain disorder, however, are used for treatment drugs that inhibit the biochemical mechanisms called anticonvulsants. This make important the need to use animal models to study this disease, as well as, the development and discovery of new drugs, they provide the basics for understanding the mechanisms of disease and are suitable for studying mechanisms of induction of seizures. Within these models stands the model of chemically induced by pentylenetetrazole, which, of its low cost and easy handling is widely used in drug discovery and development of anticonvulsants.

Key words: epilepsy, animal models, pentylenetetrazole.

La epilepsia es una enfermedad tan antigua como la humanidad misma. La espectacularidad de sus manifestaciones clínicas, que en algunos casos, llegan a ser muy violentas, desencadenó la creencia de que era debida a causas sobrenaturales (Forcadad-Berdusán, 2003). En la actualidad la epilepsia se define como un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que tiene en común la permanente disposición a presentar una serie de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales

y sincrónicas de un grupo de células del sistema nervioso central (SNC), estudios epidemiológicos señalan que esta enfermedad afecta en promedio del 0.5 al 2 % de la población general (Conn, 2003; Uldall 2006).

El tratamiento farmacológico de la epilepsia está orientado a evitar las crisis convulsivas, tratando de no interferir con la función cerebral normal o producir efectos indeseables que afecten la calidad de vida del paciente (Schmidt y Löscher, 2005). Los fármacos empleados en el

tratamiento de las crisis convulsivas se denominan anticonvulsivantes, los cuales se seleccionan con base a diferentes criterios tales como el diagnóstico preciso del tipo de crisis, mecanismo de acción del fármaco, eficacia, tolerancia y efectos secundarios (Rubio y Reséndiz, 2001).

El *screening* preclínico tradicional de los fármacos se realiza en modelos animales, debido a que estos son simples de usar y permiten obtener resultados reproducibles, como los que se emplean para el estudio de la epilepsia (Hosford, 1997; Luszczycki, 2005). El primer estudio para observar el potencial terapéutico de un fármaco anticonvulsivante se realizó en la década de los 40's, evaluando la actividad anticonvulsivante de la fenitoína en gatos, comprobando que el fármaco incrementaba el umbral de la crisis de 12 a 50 mA (Merritt, 1938). En estos modelos debe de existir semejanza en los mecanismos neurobiológicos implicados tanto en el humano como en animales (Cryan, 2004).

El empleo de modelos animales, aporta conocimientos básicos necesarios para el entendimiento de mecanismos neuronales de la epilepsia en el hombre (Engel, 1989; Solís, 1997; Sarkisian, 2001). Estos pueden clasificarse en agudos y crónicos (Engel, 1989; Solís, 1997; Sarkisian, 2001).

Los modelos agudos implican la administración de agentes químicos, estimulación eléctrica y desajustes iónicos o metabólicos que producen una actividad epiléptica o convulsiones de manera transitoria (Engel, 1989; Fisher, 1989). En estos modelos las convulsiones se inducen en animales sanos, no epilépticos (Löscher, 2002) y juegan un papel importante en la búsqueda de mecanismos celulares o moleculares relacionados con generación y terminación de las crisis (Engel, 1989; Fisher, 1989). Estos modelos han sido ampliamente utilizados para el estudio y desarrollo de fármacos anticonvulsivantes (Löscher, 2002). Por otra parte, los modelos crónicos producen actividad epiléptica persistente, ya sea por, lesiones estructurales, estimulación eléctrica repetida de alguna estructura cerebral, o que ocurren espontáneamente en especies animales genéticamente propensas. Estos modelos se utilizan para entender los mecanismos de la epilepsia investigando anormalidades persistentes entre crisis, de los cuales se puede obtener información sobre mecanismos potencialmente importantes y clínicamente relevantes, incluyendo excitotoxicidad y reorganización sináptica, anormalidades en el funcionamiento de canales dependientes de voltaje, entre otros. Asimismo, existen modelos considerados como multifactoriales, donde principalmente se investiga la epilepsia secundaria a enfermedades por predisposición genética o daño específico (Engel, 1989; Engel, 1997; Fisher, 1989; Löscher, 2002; Pitkänen, 2006).

Crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol (PTZ)

El pentilentetrazol (metrazol o α,β -ciclopentametilentetrazol, PTZ) (figura 1) se utiliza como agente convulsivante desde 1926 (Hildebrandt, 1926).

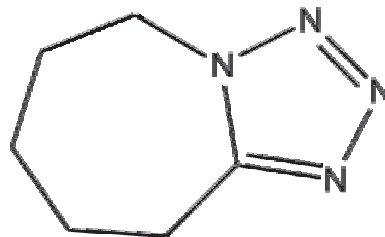


Figura 1. Estructura química del pentilentetrazol.

El PTZ es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A (Jarogniew, 2005; Pavlova, 2006; Ammon-Treiber, 2007; Xiaoqiong, 2007). El modelo de inducción química de convulsiones por pentilentetrazol es útil para evaluar las convulsiones clónico-tónicas, ya que son muy similares a las que se presentan en humanos, es ampliamente utilizado en la evaluación de la actividad anticonvulsivante de nuevas moléculas debido a que se busca que dichos compuestos funcionen como antagonistas al PTZ (Ariza, 2006; Mas-Bagà, 2006; Kupferberg y Sxhmutz, 1997; Löscher, 2002; Jarogniew, 2005; Pavlova, 2006; Ammon-Treiber, 2007; Xiaoqiong, 2007).

La mayoría de las evidencias indican que el PTZ interacciona con el sitio de unión a picrotoxina en el receptor GABA_A bloqueando el canal de Cl⁻ (Ramanjaneyulu, 1984; Dibás y Dillon, 2000; Jarogniew, 2005; Pavlova, 2006; Ammon-Treiber, 2007; Xiaoqiong, 2007). Aunque el efecto del PTZ en el cerebro es inespecífico, se sugiere que la expresión de las crisis inducidas por este fármaco, este mediada por estructuras cerebrales como la neocorteza (Ben-Ari, 1981; Browning, 1985; Gale, 1990), mientras que la extensión tónica se modula en regiones del diencefalo y el tallo cerebral, incluyendo la formación reticular, el bulbo

Recibido: XXXXXX. Aceptado: XXXXXX

¹Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana, Calle Luis Castelazo Ayala S/N, Col. Industrial Animas, 91020, Xalapa, Veracruz, México. E-mail: framos@uv.mx. ²Escuela Superior de Medicina, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Departamento de Bioquímica, Departamento de Farmacología, Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Miron s/n Col. Casco de Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, C.P. 11340 México D.F., México. ³Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n Zona Universitaria, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México.

y la sustancia gris central (Yonekawa, 1980; Browning, 1985; Miller, 1987; Gale, 1990).

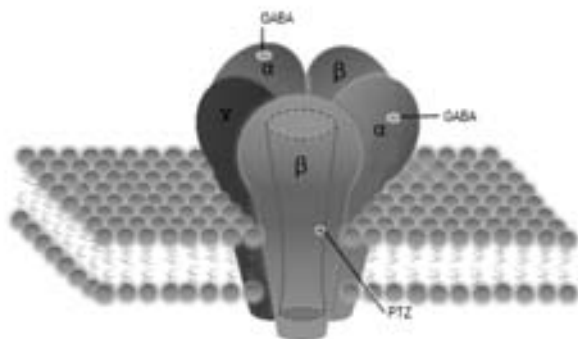


Figura 2. Modelo propuesto del sitio del unión de PTZ en el receptor GABA_A (Xiaoqiong, 2007).

La aplicación sistémica de dosis bajas de PTZ (20 mg/kg), producen crisis de ausencia (Marescaux, 1984; Snead, 1999), mientras que dosis mayores a 50 mg/kg producen crisis convulsivas del tipo clónico-tónicas generalizadas (Yonekawa, 1980; Fisher, 1989; Engel 1989). La administración sistémica de dosis altas de PTZ en ratas produce un patrón típico convulsivo. El patrón conductual consiste en inicialmente en movimientos faciales, piloerección y cola erguida, seguida de espasmos musculares provenientes de la musculatura del cuello y tronco que se propagan a las extremidades (*mioclonus*), posteriormente el animal pierde la postura y se desencadena la fase clónica que es característica por una serie de movimientos involuntarios bruscos seguidos de la crisis tónica que es una hiperextensión de las extremidades (Yonekawa, 1980; Kupferberg, 1997). Por lo anterior la administración de PTZ se considera un modelo idóneo para el estudio de crisis tónico-clónicas generalizadas; sin embargo, este modelo no permite diferenciar los fármacos efectivos en las crisis tónico-clónicas y las crisis de ausencia (Engel, 1997; Yonekawa, 1980; Speckmann, 1990). Por su bajo costo y su fácil manejo, el empleo del modelo PTZ ha sido ampliamente usado en la investigación clínica y desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivantes (Jarogniew, 2005; Pavlova, 2006; Ammon-Treiber, 2007; Xiaoqiong, 2007).

La principal limitación de este modelo es que no es utilizado para diferenciar la eficacia de los fármacos en crisis generalizadas y de ausencia cuando se toma como punto final las crisis tónicas (Avoli, 1990).

Comentarios finales

Existen diversos reportes en donde las crisis convulsivas inducidas por PTZ son generadas por la administración crónica de dosis que van desde los 25 a 40 mg/

kg (Agarwal, 2011; Claycomb, 2011; Mehla, 2010; Xiaoqiong, 2007), o bien, mediante la administración de una dosis única de 70 a 120 mg/kg (Jarogniew, 2005). Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha empleado este modelo logrando inducir las crisis en el 100% de los individuos administrando una sola dosis de 50 mg/kg de PTZ, por lo cual sugerimos que esta dosis sea empleada para estudios posteriores. Por su bajo costo y su fácil manejo, el modelo PTZ es ampliamente usado en la investigación clínica en animales y desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivantes.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Agarwal NB, Agarwal NK, Sharma KK. Effect of lamotrigine, oxcarbamazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure* 2011 Jan 17. [Epub ahead of print].
2. Ammon-Treiber S, Grösch G. Pentylentetrazol-kindling in mice overexpressing heat shock protein 70. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2007;375:115-21.
3. Ariza S, Rincón J, Guerrero M. Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *hygrophylla tytha* Leonard. *Rev Col. Cienc Quím Farm* 2006;35(1):106-19.
4. Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Naquet R. Generalized epilepsy. neurobiological approaches. Birkhäuser Boston Inc. 1345.1990.
5. Ben-Ari Y, Tremblay E, Richie D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentylentetrazole metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981;6,1361-91.
6. Browning RA. Role of the brain-stem reticular formation in tonic-clonic seizures: lesion and pharmacological studies. *Federation Proceedings* 1985; 44, 2425-31.
7. Claycomb RJ, Hewett SJ, Hewett JA. Prophylactic, prandial rofecoxib treatment lacks efficacy against acute PTZ-induced seizure generation and kindling acquisition. *Epilepsia* 2011; 52(2):273-83.
8. Conn PN. Principios de farmacología. El manual moderno. México. Hardman JG, Limbird LE. Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. 10a. Edición. México, D.F. 2003.
9. Cryan JF. Automated tests for measuring the effects of antidepressants in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78(2):269-74.
10. Dibas MI, Dillon GH. The central nervous system convulsant pentylentetrazole stimulates gamma aminobutyric acid (GABA)-activated current picrotoxin-resistant GABA(A) receptors in HEK293 cells. *Neurosci Lett* 2000;285:193-6.
11. Engel J. Seizures and epilepsy. Davids Company, U.S.A. 1989; 3-7,71-84.
12. Engel J, Pedley TA. Epilepsy: a comprehensive textbook. Lippincott-Raven Publishers 1997; 1425-34.
13. Fisher, RS. Animal models of the epilepsy. *Brain Res Rev* 1989;14, 245-78.
14. Forcadas-Berdusan MI. Epilepsia, esa desconocida. *Suma Neurológica* 2003;2(1):5-18.
15. Gale K. Animal models of generalized convulsive seizures. Generalized Epilepsy. Neurobiological Approches. Avoli M. Gloor, P. (Eds). Birkhäuser Press, Michign, U.S.A. 1990;329-43.
16. Hildebrandt F. Pentamethylenetetrazole (Cardiazol). *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1926;116,109-10.
17. Hosford D; Wang Y. Utility of the lethargic (ZhAh) mouse model of

- absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures. *Epilepsia* 1997; 38(4):408-14.
18. Jarogniew J. Isobolographic characterisation of interactions among selected newer antiepileptic drugs in the mouse pentylene-tetrazole-induced seizure model. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2005;372:41-54.
 19. Kupferberg G, Schmutz M. Screening of new compounds and the role of the pharmaceutical industry. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. Engel, J. & Pedley T. A. (Eds) Lippincott – Raven Publishers. Philadelphia. 1997;1417-34.
 20. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptic and disease – modifying. A comparison of the pharmacology of kindling and post – status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002;50, 105-23.
 21. Luszczki J; Czuczwar S. Isobolographic characterisation of interactions among selected newer antiepileptic drugs in the mouse pentylenetetrazole-induced seizure model. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2005;372: 41-54.
 22. Marescaux, C; Micheletti, G. A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in rat: Comparison with pentylene-tetrazole-induced seizures. *Epilepsia* 1984;25, 326-31.
 23. Mas-Bagà, M. Farmacología básica del valproato: revisión tras 35 años de uso clínico para el tratamiento de la epilepsia. *RET Revista de Toxicomanías* 2006;47:11-33.
 24. Mehla J, Reeta KH, Gupta P, Gupta. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in an pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. *Life Sci* 2010;Nov 20;87(19-22):596-603.
 25. Merrit HH, Putnam TJ. A new series of anticonvulsant drugs tested by experimental animals. *Arch Neurol Psychiatr.* 1938;39:1003-15.
 26. Miller, JW. Functional atomy of pentylenetetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem. *Ann Neurol* 1987;22, 615-21.
 27. Pavlova TV, Yakovlev AA, Stepanichev M. Yu, Gulyaeva NV. Pentylenetetrazol kindling in rats: is neurodegeneration associated with manifestations of convulsive activity? *Neurosci Behav Physiol* 2006;36:7.
 28. Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylenetetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 2006;392 154–8.
 29. Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL. Models of seizures and epilepsy. *Elsevier Academic Press* 2006;1-15.
 30. Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 2007;48 Suppl 2:13-20.
 31. Ramanjaneyulu R, Ticku M. Interactions of pentylenetetrazol and tetrazole analogues with picrotoxin site of the benzodiazepine – GABA receptor – ionophore complex. *Eur J Pharmacol* 1984;98, 337-45.
 32. Rubio-Donnadieu F, Reséndiz-Aparicio JC. Lineamientos para el tratamiento de la epilepsia. Programa prioritario de epilepsia. México. 2001.
 33. Sarkisian, MR. Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior* 2001;2, 201-16.
 34. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005;46, 858-77.
 35. Snead, O. Absence epilepsy: advances in experimental animal model. *Adv. Neurol* 1999;79, 253-78.
 36. Solis H. Participación de la inhibición recurrente en algunos modelos de convulsiones generalizadas. *Epilepsia: aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Feria, V. A. (Eds). *Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía* 1997; 66-84.
 37. Speakmann EJ. Mechanisms underlying generalized tonic-clonic seizures in rat: Functional Significance of calcium ions. *Generalized epilepsy. Neurobiological Approaches*. Avoli, M. (Eds). Birkhäuser Boston Inc Press, Michigan, U.S.A. 1990;329-43.
 38. Uldall P, Alving J, Hansen LK. The misdiagnosis of epilepsy in children admitted to a tertiary epilepsy centre with paroxysmal events. *Arch Dis Child* 2006;91:219-21.
 39. Xiaoqiong Ma, Guangyi Liu, Shuang Wang, Zhong Chenc. Evaluation of sphingolipids changes in brain tissues of rats with pentylenetetrazol-induced kindled seizures using MALDI-TOF-MS. *Journal of Chromatography B* 2007; 859 170-7.
 40. Yonekawa WD. Relation between pentylenetetrazole-induced seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214,589-3.