

El mutante de mielina *taiep* como un modelo de crisis de ausencia

José R. Eguibar^{a*} y Ma. del Carmen Cortés^b

^aInstituto de Fisiología. Secretaría General de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México,

^bFacultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Recibido en su versión modificada: 15 de enero de 2010

Aceptado: 19 de enero de 2010

RESUMEN

Antecedentes: La rata *taiep* es un mutante de la mielina que muestra una hipomielinización inicial seguida de desmielinización progresiva del sistema nervioso central. Un síntoma neurológico importante de las ratas *taiep* es el aumento de la susceptibilidad a crisis epilépticas de tipo audiogénico y también muestran descargas espiga-onda, lo que sugiere crisis tipo ausencia.

Objetivos: En el presente trabajo se analizaron con detalle las descargas espiga-onda a lo largo del ciclo vigilia-sueño y la susceptibilidad de estos animales a las crisis inducidas con pilocarpina sistémica.

Métodos: Para explorar la asociación entre los estados de sueño-vigilia y las crisis de ausencia, se implantaron electrodos corticales y a profundidad en el hipocampo en ratas anestesiadas con hidrato de cloral, empleando un aparato y el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson. Para los registros, las ratas se mantuvieron en un cuarto sonomortiguado bajo condiciones medioambientales controladas; las señales se amplificaron, filtraron y almacenaron mediante el sistema Harmonie (Canadá) en el disco duro de una computadora, empleando para su posterior análisis los módulos Sensa y Luna del sistema Harmonie.

Resultados: Los resultados mostraron que las ratas *taiep* tienen crisis de ausencia asociadas a las distintas etapas del ciclo sueño-vigilia, siendo estadísticamente más frecuentes las que se vinculan a la vigilia y las de mayor duración media. Las características de frecuencia fueron similares a los husos de sueño que se presentan durante el sueño de ondas lentas. Esto es, ambas actividades electrocorticográficas tienen su componente principal en la banda theta (4-8 Hz). La administración de pilocarpina (300 mg/kg) produjo un incremento de la descarga cortical que persistió por 24 horas con cinco patrones característicos asociado a una disminución concomitante de la duración y frecuencia de las crisis de ausencia. Las ratas *taiep* fueron más resistentes a la acción de este agonista colinérgico muscarínico respecto de ratas Sprague-Dawley controles, que fallecieron por crisis epilépticas alrededor de nueve horas después de la aplicación del fármaco.

Conclusiones: Los resultados indican que las crisis de ausencia de las ratas *taiep* son similares a las que se presentan en las ratas GAERS y WAG/Rij, otros modelos de este tipo de epilepsia, y resultan ser un modelo novedoso para evaluar fármacos con actividad antiepileptica, sobre todo considerando su resistencia a la acción de la pilocarpina.

Palabras clave:

Epilepsia, desmielinización, pilocarpina, anticonvulsivantes, pequeño mal

SUMMARY

Background: *Taiep* rat is a myelin mutant rat with hypomyelination followed by progressive demyelination. This mutant presents cortical discharges with a spindle form, with an ascending and descending phases similar to absence epilepsy.

Methods: *Taiep* rats were maintained under standard animal room conditions with free access to balanced rodent pellets and tap water. Rats were anesthetized with chloral hydrate under aseptic conditions; three stainless steel screws and a bipolar electrode were implanted in the hippocampus. The signals were amplified, filtered and recorded using a video-EEG Harmonie system (Canada). All data were analyzed using Sensa and Luna modules.

Results: Our results showed that *taiep* rats have spike-wave discharges (SWD) during wake, slow wake sleep (SWS) and rapid eye movement (REM), being statistically higher and longer during awake period than SWS or REM sleep. The systemic administration of pilocarpine, a cholinergic agonist, increased dramatically the cortical discharges with five characteristic seizures patterns and concomitantly decreased the frequency and duration of absence crisis. However, only 80 % of the *taiep* rats tested showed this paroxysm. On the other hand, 100 % of control Sprague-Dawley rats showed tonic clonic seizures, indicating some type of resistance to this muscarinic cholinergic drug in *taiep* rats.

Conclusions: These results showed that the *taiep* rat, a myelin mutant, is a good model for the electrophysiological and pharmacological study of absence epilepsy, particularly considering its resistance to pilocarpine-induced seizures.

Key words:

Epilepsy, demyelination, pilocarpine, anticonvulsants, petit mal

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: José R. Eguibar. Apartado Postal 5-66, 72430 Puebla, Puebla, México. Tel.: (222) 229 5500, extensión 5023. Fax: (222) 242 2682. Correo electrónico: jeguibar@siu.buap.mx

Introducción

En el Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se dispone de la rata *taiep*, un mutante de la mielina que se obtuvo de manera espontánea durante el proceso de selección para producir una rata con alta frecuencia de bostezo espontáneo. La rata *taiep* muestra hipomielinización inicial seguida de desmielinización progresiva del sistema nervioso central; el carácter se hereda de manera autosómica recesiva.¹ *Taiep* es el acrónimo de los principales síntomas motores que la caracterizan: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis.¹ El síndrome motor es progresivo, de tal forma que aparece al mes de vida con una frecuencia de 14 Hz y decrece con la edad. La ataxia aparece a los dos meses de edad, los episodios de inmovilidad se inician a los seis meses y muestran una máxima susceptibilidad entre los siete a los ocho meses de edad, siendo mayor su incidencia en los machos que en las hembras.² Los episodios de inmovilidad pueden presentarse de forma espontánea o inducirse al sujetar súbitamente a las ratas por la cola o por el tórax, siendo el estímulo más efectivo sostenerlas de la cola.²

La epilepsia inicialmente descrita en el mutante se produjo por estímulos auditivos de 103 dB y con un amplio rango de frecuencias, emitidos por una chicharra que se encendía en periodos de 30 segundos. Las crisis se presentan en tan solo 6 % de los animales de dos a seis meses de edad y se incrementan hasta 62.5 % en animales de 12 a 13 meses de edad; en animales de 15 meses y más se muestra paresia o parálisis del tren posterior.¹

En registros electroencefalográficos de corta duración (tres horas), Prieto y colaboradores³ describieron que el mutante de mielina *taiep* muestra ondas corticales anormales en forma de huso, las cuales se presentan en todas las áreas corticales y con una propagación rostro-caudal. Las ratas *taiep* muestran, además, cambios en la distribución del ciclo sueño-vigilia.⁴ De hecho, la incidencia de movimientos oculares rápidos se incrementa en el mutante y se ha propuesto como indicador de desmielinización.⁵

La alteración de la mielina se debe a una acumulación anormal de microtúbulos en el citoplasma y en los procesos de los oligodendrocitos, lo que altera los mecanismos de transporte desde el retículo endoplásmico rugoso hacia la porción Cis del aparato de Golgi.^{6,7} En cultivos de oligodendrocitos se ha podido observar que se producen cantidades altas de tubulinas y de las proteínas asociadas a los microtúbulos.⁸ El crecimiento de los microtúbulos también se ve alterado, ya que se da en un patrón preferente de crecimiento en contra de las manecillas del reloj, en lugar de a favor de las manecillas de reloj, como sucede en oligodendrocitos normales,⁸ lo que altera los mecanismos de transporte de las principales proteínas de la mielina. De hecho, las ratas *taiep* tienen niveles subnormales de las proteínas de mielina: la proteína básica de mielina, la proteína proteolipídica, la 3',5' nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa y de la proteína básica de la mielina de los oligodendrocitos.⁹ Las alteraciones en la mielina producen cambios en los componentes centrales de los potenciales provocados auditivos¹⁰ y en los somatosensoriales,¹¹ así

como en la morfología y las velocidades de conducción en los potenciales de acción compuestos en el nervio óptico de ratas *taiep* en condiciones *in vitro*.¹²

Con base a estos antecedentes, en los presentes experimentos se analizarán de manera detallada la morfología y componentes de frecuencia de estas descargas corticales en registros polisomnográficos de 24 horas, su relación con el ciclo sueño-vigilia y la sensibilidad a la administración sistémica de pilocarpina, un agonista colinérgico muscarínico y potente inductor de crisis epilépticas.

Material y métodos

Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio bajo un ciclo luz-oscuridad de 12:12, con encendido de las luces a las 7:00 a. m. Con temperatura controlada de 21 ± 2 °C y humedad relativa de 30 a 45 %. Las ratas se mantuvieron en jaulas colectivas de acrílico transparente, tres animales por jaula, con cambio de viruta de madera presurizada (Aspen beta chip) tres veces por semana, libre acceso a alimento balanceado para roedores (Zeigler, Estados Unidos) y agua purificada.

Implante de electrodos

Las ratas *taiep* y Sprague-Dawley de ocho a nueve meses se anestesiaron con hidrato de cloral 300 mg/kg por vía intraperitoneal. Bajo anestesia profunda, los animales se montaron en un aparato estereotáxico Kopf. Se realizó una incisión media a lo largo del cráneo, se removió el periostio con una legra y se controló el sangrado de los huesos del cráneo mediante peróxido de hidrógeno y cera para hueso. Siguiendo las coordenadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson,¹³ se realizaron trépanos dirigidos a las cortezas cerebrales frontal, parietal y occipital del lado derecho y en el izquierdo para la región CA₁ del hipocampo.

Para los registros en la corteza cerebral se implantaron tornillos de acero inoxidable soldados a un alambre también de acero inoxidable (Plastics One Inc.). Para el hipocampo se implantó un par de alambres de platino trenzados, con una diferencia de 1 mm entre las puntas (Plastics One Inc.). Para el electromiograma de los músculos de la nuca se implantaron alambres de acero inoxidable a cada lado y uno adicional en la parte superior de la órbita para el registro del electrooculograma, y un tornillo de acero inoxidable en la corteza frontal que se empleó como tierra. Todos los electrodos se conectaron a un casquete de conexión múltiple con terminales hembras recubiertas de oro para una adecuada transmisión de las señales eléctricas (Plastics One Inc.), fijándose al cráneo con acrílico dental (Cranio Powder, Plastics One, Inc.).

Después de la cirugía, los animales recibieron como antibiótico tartrato de tilosina 50 mg/kg y como analgésico metamizol sódico 40 mg/kg por tres días por vía subcutánea, bajo la estricta supervisión de un médico veterinario y zootecnista. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los códigos y leyes del séptimo título de la Ley General de Salud del gobierno de México (NOM-062-ZOO-1999), los

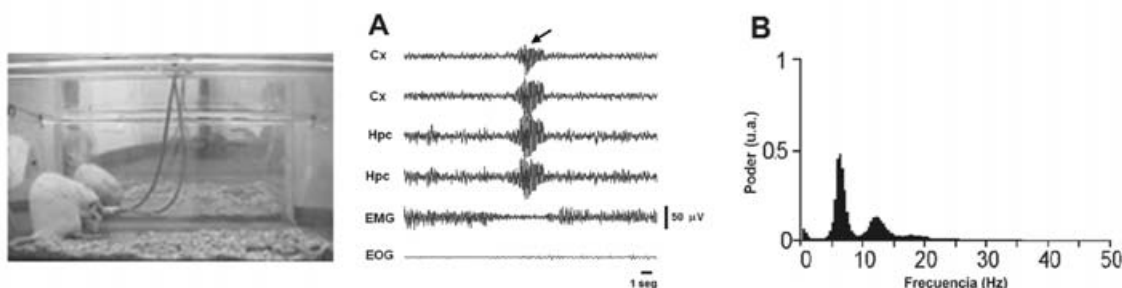


Figura 1. Descarga tipo espiga-onda en una ratona macho *taiep* de ocho meses durante la vigilia quieta. A) La descarga tipo espiga-onda se presenta de manera sincrónica tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo. Los complejos espiga-onda se suceden durante la vigilia quieta de la ratona. B) El análisis del espectro de potencia, empleando la transformada rápida de Fourier muestra un componente principal en 6.25 ± 0.4 Hz ($n = 146$ descargas tipo espiga-onda), esto es en la banda theta.

cuales corresponden a los de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica¹⁴ (guía del NIH revisada en 2007).

Del cuarto al séptimo día posimplante, los animales se adaptaron a las condiciones de registro en un cuarto sonoro amortiguado y en condiciones controladas medioambientales.

Registro

Las actividades electroencefalográfica, electromiográfica y electrooculográfica se amplificaron y digitalizaron a través de una tarjeta de conversión analógico/digital con una velocidad de muestreo de 200 Hz (Harmonie, Stellate Co., Canadá). Las señales fueron almacenadas en el disco duro de una computadora personal que opera bajo sistema operativo Windows Milenio. Los estados sueño-vigilia se analizaron con el módulo Luna y la actividad de descargas tipo espiga-onda y los husos de sueño con el módulo Sensa en periodos de 10 segundos. La evaluación de los estados de vigilia se realizó mediante análisis de las señales y de la conducta a través de video digitalizado en archivos con formato MPEG.

Los estados evaluados fueron:

1. Vigilia, que se caracteriza por ondas de baja amplitud y alta frecuencia (12 a 20 Hz) y se presenta cuando el animal deambula, se asea, come, bebe o explora.
2. Sueño de ondas lentas, cuando el animal está inmóvil con los ojos cerrados y su actividad cortical se caracteriza por ondas de baja frecuencia de 0 a 4 Hz (ondas delta) pero de gran amplitud.
3. Sueño con movimientos oculares rápidos, que se caracteriza por que el animal está inmóvil en posición ovillada o acostado de lado, con presencia de sacudidas musculares (*twitches*) o movimientos de las vibras y con actividad cortical similar a la de vigilia.

Los distintos estadios se organizaron a lo largo del tiempo para establecer su asociación con las crisis de ausencia.

Análisis

En periodos de 10 segundos se registraron 2014 puntos mediante la transformada rápida de Fourier, empleando el

módulo Sensa del Sistema Harmonie, lo que permitió analizar los componentes de frecuencia y el poder de las señales.¹⁵ Los resultados se analizaron mediante el análisis de medidas repetidas seguido de las pruebas de Tukey o Dunn, según correspondiera, con el programa Sigma-Stat 3.0 en ambiente Windows y bajo los lineamientos estadísticos de Siegel,¹⁶ considerando $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

Resultados

Las ratas *taiep* macho de ocho meses de edad mostraron descargas tipo complejo espiga-onda, que se caracterizan por una forma de huso con una fase de ascenso de la amplitud de la señal seguida de una de descenso hasta que se restaura la actividad cortical previa (Figura 1). Las descargas tipo espiga-onda se presentaron de manera espontánea en todas las áreas de la corteza cerebral, y el análisis espectral de las mismas empleando la transformada rápida de Fourier mostró que existe una frecuencia principal de 6.25 ± 0.4 Hz ($n = 146$), la cual oscila entre 5 y 8 Hz, esto es, dentro del rango de la banda theta (Figura 1B).

Durante el sueño de ondas lentas se presentaron en la corteza husos de sueño (Figura 2, flecha) que tuvieron una morfología similar a las descargas tipo espiga-onda y con una frecuencia principal obtenida empleando la transformada rápida de Fourier de 7.2 ± 0.3 Hz ($n = 134$ husos de sueño), esto es, ambas en el rango de la banda theta.

Se analizaron las etapas del ciclo sueño-vigilia y su asociación con los complejos espiga-onda. Este análisis indicó que la mayoría de las descargas tipo espiga-onda sucede durante la vigilia, pero existe disminución significativa en el sueño de ondas lentas y en el sueño con movimientos oculares rápidos ($\chi^2 = 16.0$, $p < 0.001$), seguida de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) Figura 3A). La duración media de estas descargas corticales fue también de mayor duración media en la vigilia respecto del sueño de ondas lentas o del sueño con movimientos oculares rápidos ($H = 243.2$, $p < 0.001$, seguido de la prueba Dunn $p < 0.05$, Figura 3B).

Cabe la pena destacar que la distribución del número de ERAV a lo largo de los ciclos circadianos tuvo una media de

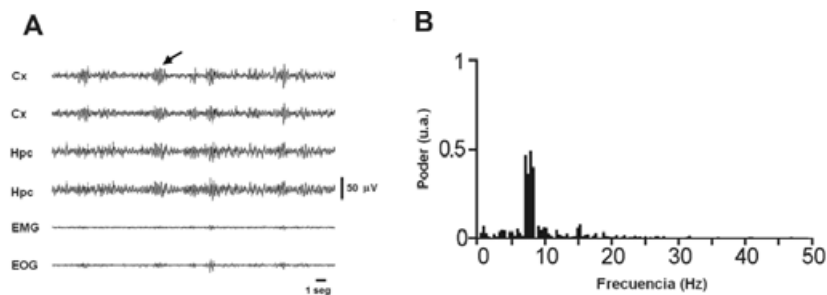


Figura 2. Huso de sueño durante sueño de ondas lentas en una rata *taiep*. A) Durante el sueño de ondas lentas se presentan husos de sueño (flecha) que se asemejan a las descargas espiga-onda. B) El análisis del espectro de potencia empleando la transformada rápida de Fourier muestra un componente principal en 7.16 ± 0.3 Hz ($n = 134$ husos de sueño), en el rango de la banda theta.

67.9 ± 2.2 (media $\pm$ e.e.m., $n = 8$) y distribución homogénea a lo largo de las 24 horas del día, lo que no produjo diferencias significativas entre las horas de registro (Figura 4).

La duración media de las descargas tipo espiga-onda fue mayor entre las 20 y 24 horas respecto de las que se sucedieron entre las 2 y 6 de la mañana (Anova de medidas repetidas, $F = 5.7$, $p = 0.001$; seguido de la prueba de Tukey $p < 0.05$). La duración media promedio (MESOR) de las descargas tipo espiga-onda fue de 5.7 ± 0.12 segundos a lo largo del ciclo circadiano (Figura 5).

Después de la administración sistémica (i.p.) de 300 mg/kg de pilocarpina se produjo una descarga de tipo gran mal de gran amplitud (patrón tipo I, Figura 6) y con manifestaciones motoras evidentes en 80 % de las ratas *taiep* probadas (6/8), respecto de 100 % de las ratas control Sprague-Dawley (4/4); estos últimos animales murieron debido a las convulsiones entre las nueve y once horas después de la administración del fármaco, mientras que las ratas *taiep* sobrevivieron a las 24 horas de registro. Asimismo, la latencia al inicio de las crisis convulsivas fue menor en las ratas controles 62 segundos que en las *taiep* con 485 segundos ($p < 0.01$). En las ratas *taiep* la

descarga cambió hacia una serie de patrones de descarga de menor amplitud, como se muestran en la Figura 6 que se detallará a continuación. Estos patrones de descarga cortical producen disminución de las descargas tipo espiga-onda y reducen significativamente su duración ($p < 0.05$; patrones B a E). De hecho, los cinco patrones oscilan en su frecuencia y duración a lo largo de las 24 horas después de la administración del fármaco en las ratas *taiep*, pero no en las ratas Sprague-Dawley que mueren después de la administración de la pilocarpina.

Algunos patrones mostraron actividades con complejos con espiga multionda regulares (Figura 6B) o continuas (Figura 6C). Pero conforme la pilocarpina se metaboliza, aparecen patrones en ráfagas con intervalos interictales donde disminuye la amplitud del registro electroencefalográfico (Figura 6D), que se alternan con espigas marcadas por ondas lentas que se suceden a intervalos regulares en toda la corteza cerebral y en el hipocampo (Figura 6E), sin que

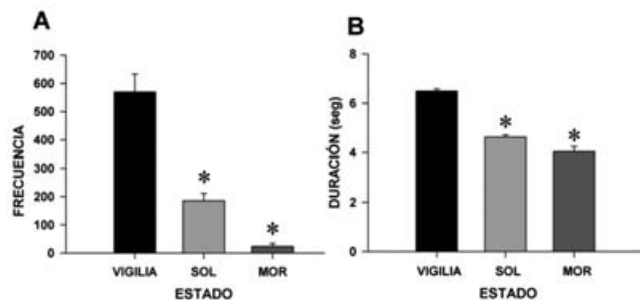


Figura 3. Distribución de la frecuencia y duración de las descargas espiga-onda en ratas macho *taiep*. A) Las descargas tipo espiga-onda tienen una mayor incidencia en la vigilia respecto al sueño con movimientos oculares rápidos ($\chi^2 = 16.0$, $p < 0.001$, seguida de la prueba de Tukey, $p < 0.05$). B) La duración media de las descargas tipo espiga-onda es mayor en la vigilia respecto al sueño de ondas lentas o el sueño con movimientos oculares rápidos ($H = 243.2$, $p < 0.001$; seguido de la prueba Dunn $p < 0.05$).

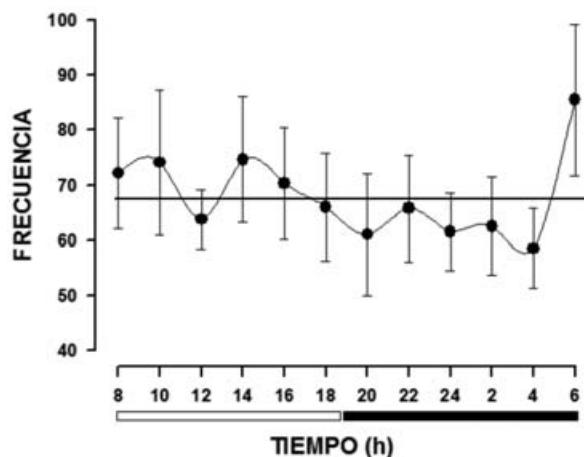


Figura 4. Distribución de la frecuencia de complejos espiga-onda a lo largo del ciclo luz-oscuridad. La frecuencia de las descargas tipo espiga-onda es similar a lo largo del día, con un valor promedio de 68 ± 2.2 descargas, por lo que no existen diferencias significativas entre las horas de registro (Anova de medidas repetidas, $p = 0.34$).

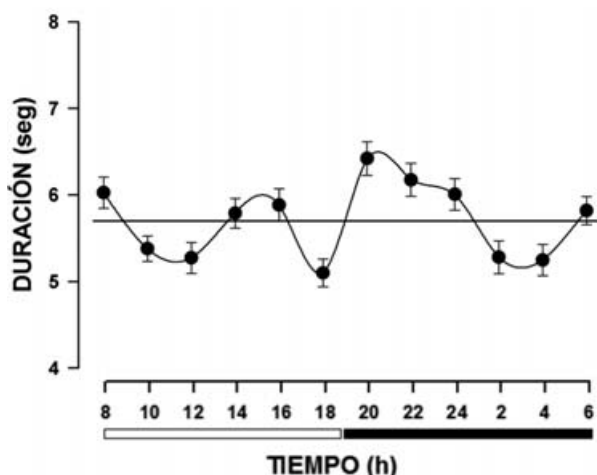


Figura 5. Distribución de la duración media de las descargas tipo espiga-onda a lo largo del ciclo luz-oscuro. El valor promedio de las duraciones es mayor entre las 20 y 24 horas respecto de 2 a 6 de la mañana (Anova de medidas repetidas, $F = 5.7$; $p = 0.001$; seguido de la prueba de Tukey $p < 0.05$). La duración media promedio de las descargas tipo espiga-onda es de 5.7 ± 0.12 segundos a lo largo del ciclo circadiano.

conllevar a la muerte del mutante o incluso regresar a los patrones ilustrados en B o C, y sin que existiera un orden de aparición sino que la excitabilidad cortical se incrementó por la acción de la droga.

En experimentos en curso hemos encontrado que las descargas tipo espiga-onda se reducen por la administración sistémica de etosuximida (25 mg/kg), de 82 a 52 descargas tipo espiga-onda/hora; este efecto se acentúa al administrar una dosis de 50 mg/kg ($p < 0.05$).

Discusión

Estos resultados muestran que las ratas *taiep*, un mutante de la mielina, tienen descargas corticales que se asemejan a las que se producen en las crisis de ausencia (epilepsia pequeño mal). Estas descargas espiga-onda son similares a las que muestran los modelos genéticos de epilepsia del tipo de las crisis de ausencia, como el modelo francés GAERS (*genetic absence rats from Strasbourg*) y el holandés WAG/Rij (*Wistar albino Glaxo rats from Rijswijk*). Es importante destacar que los modelos animales disponibles para el estudio de las crisis de ausencia son los que reproducen solo los síntomas, y usualmente se obtienen a partir de lesiones empleando sustancias neurotóxicas o alternativamente los modelos anteriores que se han obtenido por reproducción selectiva (GAERS y WAG/Rij), que muestran descargas tipo espiga-onda de manera espontánea y altamente predecibles sobre la base de un fenotipo aparentemente normal.^{17,18} El caso de las ratas *taiep* sería de este último tipo pero con una característica adicional: muestran un síndrome motor debido a sus alteraciones de la mielina.^{19,20}

El complejo espiga-onda se caracteriza electrofisiológicamente por una frecuencia en el rango de la banda theta, esto es, entre 4 y 8 Hz, y son similares a los husos de sueño que se presentan durante la fase de sueño de ondas lentas, como hemos mostrado en el presente trabajo (compárese Figuras 1 y 2). Una característica de estos complejos espiga-onda es que su inicio y terminación son súbitos y generalmente la actividad electroencefalográfica ulterior es normal, como acontece en la rata *taiep* (Figura 1).

La participación del circuito tálamo-cortical, en particular del complejo ventrobasal (CVB) y el núcleo tálamico reticular (NTR) en el establecimiento y propagación de las crisis de ausencia se ha definido desde hace varios años.²¹ El comportamiento neuronal oscilatorio entre un patrón de

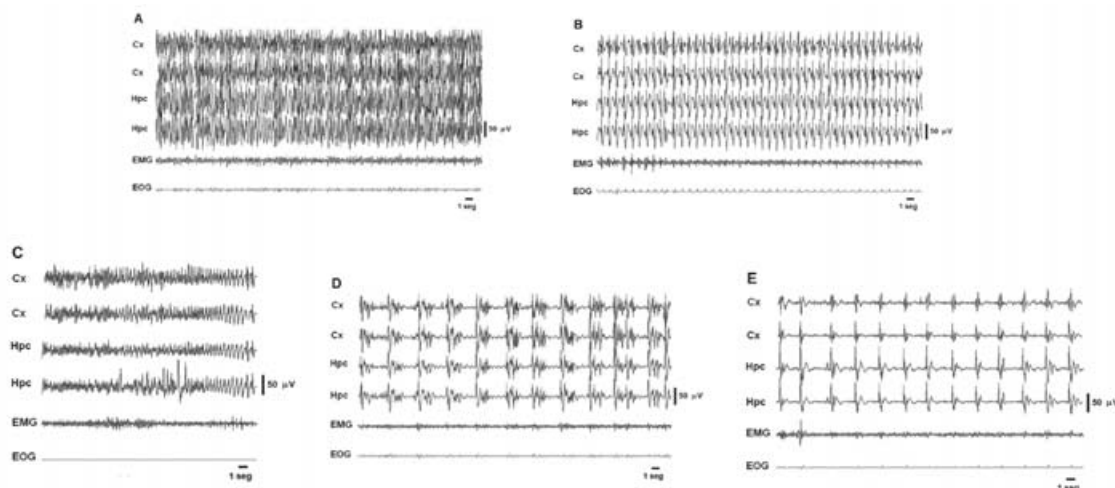


Figura 6. La administración sistémica de pilocarpina, un agonista colinérgico muscarínico, produce crisis convulsivas generalizadas. A) La pilocarpina induce inicialmente crisis epilépticas generalizadas. El resto de los cuatro patrones electroencefalográficos (B a E) oscilan en el tiempo y producen que disminuya la frecuencia y duración de las crisis de ausencia en la ratas *taiep* macho adultos, asociadas a otras actividades paroxísticas.

descarga fásico y otro en el que las neuronas del NRT descargan en meseta, ha sido propuesto como fundamental en el cambio de patrón de la actividad cortical. De hecho, lo que permite que cambie el flujo de información sensorial hacia la corteza cerebral dependería de este cambio de patrón de descarga de las neuronas del NRT.²² En las crisis de ausencia se ha propuesto que tanto las crisis de ausencia como en los husos del sueño, las neuronas marcapaso del NTR son las que comandan este ritmo cortical.²³

Con base en distintos abordajes experimentales se ha propuesto que las neuronas que contienen ácido gamma aminobutírico (GABA), esto es las neuronas del NTR GABAérgicas, desempeñan un papel fundamental en la generación del ritmo que se presenta durante las descargas espiga-onda.²⁴ En la rata GAERS se ha mostrado que la administración de agonistas para el receptor GABA_A y GABA_B incrementa las descargas tipo espiga-onda; por otra parte el bloqueo de los receptores GABA_B en el NRT o el CVB disminuyen las descargas corticales espiga-onda en ratas GAERS.²⁵ Por otra parte, la lesión del NRT y áreas adyacentes muestran una inhibición del patrón descarga tipo complejo espiga-onda en las ratas GAERS²⁶ y en las WAG/Rij.²⁷ Estos hallazgos sustentan el papel de las neuronas GABAérgicas del NTR en la generación de las crisis de ausencia, no tenemos a la fecha estudios detallados en la rata *taiep* sobre el papel del GABA en el tálamo y las descargas tipo ausencia, pero en experimentos preliminares administrando sistémicamente diazepam, que modula las sinapsis GABAérgicas a través del receptor a benzodiazepinas, hemos mostrado que disminuye la frecuencia y duración de los complejos espiga-ondas (datos no ilustrados).

En los modelos animales con fenotipo de crisis de ausencia se han podido realizar estudios electrofisiológicos detallados en diferentes zonas de la corteza cerebral. Estos estudios han podido determinar que es a nivel de la corteza somatosensorial en la zona de proyección perioral donde se origina la hiperreactividad tipo espiga-onda de las crisis de ausencia, y desde este punto se propaga al resto de la corteza cerebral en la rata WAG/Rij.²⁷ No se tienen estudios similares en las ratas GAERS, pero es claro que en las ratas *taiep* la propagación de los complejos espiga-onda inician en la región frontal y se propagan hacia la corteza occipital,³ lo que sugiere que existe un punto de irritabilidad en zonas similares a lo informado en la rata WAG/Rij, y es un punto que analizaremos en detalle a través de un mapeo cerebral en este mutante de mielina.

Resulta alentador que experimentos preliminares en humanos han podido mostrar mediante resonancia magnética funcional que existen datos de hiperactividad en la corteza sensorial,²⁴ lo que sustenta las observaciones que se han obtenido en la rata WAG/Rij.

En la mayoría de los casos humanos las crisis de ausencia requieren monoterapia, siendo los mejores tratamientos la etosuximida o el valproato de sodio; en las últimas décadas se ha agregado a este arsenal la lamotrigina. Solo un pequeño porcentaje de casos de crisis de ausencia requieren politerapia y la combinación usual que las controla es el valproato de sodio y lamotrigina. En las ratas GAERS y WAG/Rij, la etosuximida disminuye las crisis de ausencia,²⁴ también este fármaco disminuye significativamente la frecuencia de

complejos espiga-onda en las ratas *taiep*. Recientemente, en las ratas WAG/Rij empleando registro electroencefalográfico e hibridización *in situ*, se ha podido mostrar que los canales de sodio tipo Nav1.1 y NAV 1.6 están sobreexpresados en la corteza de estos animales, lo que produce una hiperexcitabilidad en la corteza somatosensorial tras la administración local de agonistas para el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Sin embargo, la administración local de fenitoína, un bloqueador de canales de sodio, produce una disminución de los complejos espiga-onda.²⁸ Las ratas *taiep* muestran también alteraciones en los canales de sodio en el cerebelo al año de edad.²⁹

Es claro que se debe analizar el papel de la fenitoína aplicada localmente y sistémicamente, ya que este último tratamiento agrava la crisis de ausencia en humanos y en los modelos animales.²⁴ Por otra parte, en varios ratones con mutaciones en el canal de calcio (Tottering, Stargazer, Leaner, Mocha, Ducky) se obtienen fenotipos con crisis de ausencia,¹⁹ lo que soporta que las canalopatías pueden ser parte del sustrato donde subyace la actividad tálamo-cortical anormal. Cabe la pena destacar que las ratas *taiep* muestran una transmisión asíncrona de los potenciales postsinápticos excitatorios, tanto en la médula espinal entre las fibras Ia con las motoneuronas como a nivel del hipocampo, probablemente debido a una distribución anómala de los canales en la superficie neuronal debido a las alteraciones en la interacción axón-glía en el mutante.^{30,31}

Nuestros resultados muestran que existe una correlación del estado de vigilia, particularmente la vigilia quieta, y la expresión de complejos espiga-onda. Es también durante el inicio del sueño de ondas lentas que se producen husos de sueño que se deben a cambios en la actividad GABAérgica en el NRT, lo que soporta aún más que es el circuito tálamo-cortical el que se encuentra alterado en la rata *taiep*. El que este sistema se encuentre involucrado también en la rata *taiep* se sustenta, al menos en parte, al hallazgo de que cualquier estímulo sensorial inhibe la expresión de los complejos espiga-onda; vale la pena recordar que los niños con crisis de ausencia muestran pérdida de contacto con el entorno.²² La asociación del sueño con las crisis epilépticas ha sido descrita desde la antigüedad (Hipócrates y Aristóteles ya lo referían), pero no es hasta el advenimiento de los registros electroencefalográficos que se pudo determinar con certeza la manifestación de epilepsia con el sueño. Es claro que los cambios de actividad cerebral que se suceden entre la vigilia y las dos etapas del sueño condicionan la aparición de esta actividad paroxística, como también acontece en nuestro mutante y en humanos.³²

La rata *taiep* macho adulta muestra inmovilidades espontáneas o al ser manipulada súbitamente presentando una actividad en el registro electroencefalográfico, similar a la del sueño con movimientos oculares rápidos;² adicionalmente, tiene alteraciones en la organización del ciclo sueño-vigilia, lo que apoya que este animal pueda mostrar narcolepsia-cataplejía.⁴ De hecho, el perfil farmacológico de las inmovilidades es similar a la de los perros y humanos narcolépticos³³, esto es, se incrementan con la administración sistémica de prazosina, un antagonista α_1 adrenérgico o por la inyección de agonistas α_2 ,^{34,35} pero se inhiben por la acción de

antagonistas α_2 adrenérgicos,³⁵ de agonistas serotoninérgicos presinápticos de los subtipos 1A, 1B,³⁶ o bien por la acción de receptores serotoninérgicos postsinápticos del subtipo 2A/2C.³⁷

Estos hallazgos indican que dos de los síntomas de la rata *taiep* tienen como base una inadecuada coordinación del sistema tálamo-cortical y futuros experimentos nos permitirán dilucidar las bases neurobiológicas de dichas alteraciones, que pueden deberse a la transmisión asíncrona de potenciales postsinápticos excitatorios y de acción, como se ha mostrado en preparaciones reducidas y en etapas tempranas del desarrollo del mutante.

Por último, la actividad que se sucede después de la administración de pilocarpina sistémica indica que las ratas *taiep* son susceptibles a la acción de esta droga, que se sabe produce crisis epilépticas que asemejan a la epilepsia del lóbulo temporal.²⁴ Durante el desarrollo de las crisis, los animales transitan de crisis generalizadas hacia otros estados con patrones bien definidos y que pueden ser caracterizados electrofisiológicamente (Figura 6). Estos hallazgos nos permitirán a futuro abordar cómo se encuentra la excitabilidad neuronal en diferentes partes del sistema nervioso durante los diferentes tipos de actividad eléctrica cortical, desde las crisis de ausencia hasta descargas paroxísticas generalizadas después de la administración de pilocarpina o de otros convulsivantes. En experimentos preliminares, la administración sistémica de dosis bajas de pentilenetetrazol 20 mg/kg indujo un incremento significativo en la expresión de los complejos espiga-onda, pero no de crisis convulsivas generalizadas (datos no ilustrados). Mientras que la etosuximida, droga prototípica para el tratamiento de las crisis de ausencia las disminuye.

Conclusiones

Las ratas *taiep* son un modelo adecuado para el estudio de las alteraciones eléctricas debidas a un proceso de desmielinización progresivo incluyendo las manifestaciones epilépticas. También representa un modelo único en el sentido de que muestra una larga sobrevida de hasta 18 meses, lo que permitirá realizar estudios correlativos entre la actividad eléctrica anormal y los cambios morfológicos que ésta produce. En las alteraciones de la morfología de los potenciales provocados auditivos, los cuales correlacionan con los cambios de la mielina central^{10,11} o bien la disminución de la velocidad de conducción en el nervio óptico del mutante y la ultraestructura de la región paranodal,¹² lo que expone los canales de potasio y altera la excitabilidad nerviosa. Es claro entonces que este mutante de la mielina es un modelo adecuado para diferentes abordajes experimentales para el estudio de la epilepsia y su tratamiento farmacológico.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el proyecto área SALUD/2008-2009 de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), y por el maestro Enrique Agüera Ibáñez, rector de la BUAP, a favor de José R. Eguibar. Agradecemos la participación de K. Matamoras y R. C. Callejas, becarios del programa la Ciencia en tus Manos de la VIEP; y de Diana M. Mendiola, técnica del laboratorio.

Referencias

- Holmgren B, Urbá-Holmgren R, Riboni L, Vega-Sáenz de Miera EC. Sprague-Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Lab Anim Sci* 1989;39:226-228.
- Cortés MC, Gavito B, Ita ML, Valencia J, Eguibar JR. Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse* 2005; 58:95-101.
- Prieto GJ, Urbá-Holmgren R, Holmgren B. Sleep and EEG disturbances in a rat neurological mutant (*taiep*) with immobility episodes: A model of narcolepsy-cataplexy. *EEG Clin Neurophysiol* 1991;79:141-147.
- Cortés MC, Ita ML, Eguibar JR. The sleep-wake cycle is disorganized and out of rhythm in *taiep* rats. XXXIV Annual Meeting, The Society for Neuroscience, 2004.
- Anch AM, Laposky AD. Rat sleep and eye movement density as biological markers of demyelinating disease. *Physiol Behav* 2000;71:269-275.
- Couve E, Cabello JF, Krsulovic J, Roncagliolo M. Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant *taiep* rat. *J Neurosci Res* 1997;47:573-581.
- O'Connor LT, Gotees BD, Couve E, Song J, Duncan ID. Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the *taiep* rat. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:396-407.
- Song J, O'Connor LT, Yu W, Baas PW, Duncan ID. Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *J Neurocytol* 1999;28:671-683.
- Möller JR, Durr PG, Quarles RH, Duncan ID. Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the *taiep* rat. *J Neurochem* 1997;69:773-779.
- Roncagliolo M, Benítez J, Eguibar JR. Progressive deterioration of central components of auditory brainstem responses during postnatal development of the myelin mutant *taiep* rat. *Audiol Neurotol* 2000;5:267-275.
- Eguibar JR, Cortés MC, Roncagliolo M. The myelin mutant rat *taiep* showed an alteration in the central components of somatosensory and motor evoked potentials. *EEG Clin Neurophysiol* 2008;119(Suppl 2):KN3.
- Roncagliolo M, Schlageter C, Leon C, Couve E, Bonansco C, Eguibar JR. Developmental impairment of compound action potential in the optic nerve of myelin mutant *taiep* rats. *Brain Res* 2006;1067:78-84.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. USA: Academic Press Burlington MA; 2007.
- Clark JD. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. USA: National Research Press; 2002.
- Maloney KJ, Cape EG, Gotman J, Jones BE. High-frequency g electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience* 1997;76:541-555.
- Siegel S. Non parametric statistics for the behavioral sciences. New York USA: McGraw-Book; 1970.
- Rudolf G, Bihoreau T, Godfrey RF, Wilder SP, Cox Rd, Lahtrop M, et al. Polygenic control of idiopathic generalized epilepsy phenotypes in the genetic absence rats from Strasbourg (GAERS). *Epilepsia* 2004;45:301-308.
- Manning JA, Douglas AR, Bowery NG. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:542-549.
- Duncan ID, Lunn KF, Holmgren B, Urbá-Holmgren R, Brignolo-Holmes KF. The *taiep* rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J Neurocytol* 1992;21:870-884.
- Lunn KF, Clayton MK, Duncan ID. The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *J Neurocytol* 1997;26:267-281.
- Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter GM. Spontaneous spike and wave discharges in thalamus and cortex in a rat model of genetic petit mal-like seizures. *Exp Neurol* 1987;96:127-136.
- Steriade M. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci* 2005; 28:318-324.
- Kostopoulos GK. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *EEG Clin Neurophysiol* 2000;111(Suppl 2):S27-S38.
- Van Luijckelaar G, Sitnikova E. Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:983-1003.
- Liu Z, Vergnes M, Depaulis A, Marescaux C. Involvement of intrathalamic GABA_B neurotransmission in the control of absence seizures in the rat. *Neurosci* 1992;48:87-93.
- Vergnes M, Marescaux C. Cortical and thalamic lesions in rats with genetic absence epilepsy. *J Neural Trans* 1992; 35 (Suppl):71-83.

27. **Meeren HK, Pijn JP, Van Luijckelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH.** Cortical focus drive spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 2002;22:1480-1495.
28. **Gurbanova AA, Aker R, Berkman K, Onat FY, Van Rijn CM.** Effect of systemic and intracortical administration of phenytoin in two genetic models of absence epilepsy. *Br J Pharmacol* 2006;148:1076-1082.
29. **Black J A, Fjell J, Dib-Hajj S, Duncan ID, O'Connor LT, Fried K, et al.** Abnormal expression of SNS/PN3 sodium channel in cerebellar Purkinje cells following loss of myelin in the taiep rat. *NeuroReport* 1999;10:913-918.
30. **Bonansco C, Fuenzalida M, Olivares V, Molina C, Roncagliolo M.** Asynchronous transmission in the CA3-CA1 hippocampal synapses in the neurological mutant taiep rat. *J Neurocytol* 2007;85:223-229.
31. **Fuenzalida M, Roncagliolo P, Bonansco C, Roncagliolo M.** Immature developmental pattern of the monosynaptic reflex in the isolated spinal cord of glial mutant taiep rats. *Dev Brain Res* 2004;153:197-202.
32. **Huerta-Díaz E.** Sueño y epilepsia. En: Valencia M, Salín R, Pérez R, editores. *Los trastornos del dormir*. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000. pp. 133-148.
33. **Nishino S, Mignot E.** Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 1997;52:27-78.
34. **Cortés MC, Arias-Montaña JA, Eguibar JR.** Prazosin increases immobility episodes in taiep rats without changes in the properties of $\alpha 1$ receptors. *Neurosci Lett* 2007;412:159-162.
35. **Eguibar JR, Cortés MC, Valencia J, Arias-Montaña JA.** $\alpha 2$ adrenoceptors are involved in the regulation of the gripping-induced immobility episodes in taiep rats. *Synapse* 2006;60:362-370.
36. **Ita ML, Cortés MC, Valencia J, Eguibar JR.** Activation of serotonin 5-HT₁-receptors decreases gripping-induced immobility in taiep rats. *Neurosci Lett* 2008;449:147-150.
37. **Eguibar JR, Cortés MC, Ita ML.** Serotonergic postsynaptic receptors modulate gripping-induced immobility episodes in male taiep rats. *Synapse* 2009; in press.