



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EFEECTO ANTIEPILÉPTICO DE LA SAXITOXINA EN LA  
CEPA DE RATÓN CD-1

TESIS

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Carla Alejandra Muñoz Rojas**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2020

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 07 del Mes de Agosto del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Efecto antiepiléptico de saxitoxina en la cepa de ratón CD-1"**

Presentada por el alumno:

**Carla Alejandra Muñoz Rojas**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



---

**Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz**  
Co-Directora de Tesis




---

**Dr. José Jesús Bustillos Guzmán**  
Co-Director de Tesis



---

**Dra. María Leonor López Meraz**  
Co-Tutor de Tesis



---

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
**Co-Directora de tesis**

Dr. José Jesús Bustillos Guzmán  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
**Co-Director de tesis**

Dra. María Leonor López Meraz  
Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana.

### **Co-Tutora de tesis**

#### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. José Jesús Bustillos Guzmán  
Dra. María Leonor López Meraz

#### **Jurado de Examen**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. José Jesús Bustillos Guzmán  
Dra. María Leonor López Meraz

#### **Suplente**

Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval

## Resumen

Los fármacos antiepilépticos (FAE) regulan la sobreexcitación de las células nerviosas para evitar o reducir la frecuencia de las crisis epilépticas, sin embargo, los FAE presenten efectos adversos, haciendo necesario proponer fármacos alternativos. La saxitoxina (STX) es una toxina paralizante que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC), los cuales son un blanco común para encontrar nuevos antiepilépticos. Para evaluar las crisis epilépticas se utilizan modelos de crisis aguda como el pentilentetrazol (PTZ) en roedores. Una dosis de 100 mg/kg de PTZ inyectada vía intraperitoneal (i.p.) presenta consecutivamente tres crisis: 1) mioclonus, 2) crisis clónico generalizada (CCG) y 3) crisis tónico-clónico generalizada (CTCG). El objetivo fue evaluar el efecto antiepiléptico de la STX en ratones CD-1 utilizando el modelo del PTZ y comparar su efecto con el de la fenitoína (FNT), un antiepiléptico comercial, que al igual que la STX, bloquea los VGSC. Adicionalmente se evaluó si la STX llega al cerebro, mediante cromatografía líquida de alta resolución, para identificar si persiste después de la administración del PTZ. Se establecieron 5 dosis subletales (1.8, 3.9, 6, 7.5, 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), una dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX y una dosis de 50 mg/kg de FNT. El desarrollo experimental consistió en inyectar vía i.p. los vehículos de la STX y la FNT como controles, y las dosis correspondientes de STX y FNT. Después de 30 min se administró i.p. el PTZ (100 mg/kg) a cada uno de los grupos experimentales, y durante los siguientes 30 min se evaluó el porcentaje de ratones que presentaron las crisis y el tiempo que tardaron en iniciar las crisis. Los resultados mostraron que la STX no evitó las crisis y no se detectó en el cerebro de los ratones, aunque no se puede descartar que hayan quedado niveles traza de STX que no se identificaron. La dosis subletal de STX de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mostró un aumento significativo en la latencia del mioclonus con respecto a su vehículo y a la FNT. La misma dosis disminuyó el porcentaje de ratones que presentaron la CCG en comparación con la FNT. La FNT evitó en el 100% de los ratones, la aparición de la CTCG. Los ratones que sobrevivieron a la  $DL_{50}$  de STX mostraron una disminución en el porcentaje de organismos que presentaron la CTCG. Este trabajo es el primer reporte donde se propone a la STX como FAE, observándose efectos significativos en la latencia y porcentaje de ratones que presentan las crisis. La STX presenta un margen terapéutico estrecho por lo que se requieren más estudios para elucidar los efectos antiepilépticos de la STX o alguno de sus análogos que poseen menor potencia tóxica y un mayor rango terapéutico.

**Palabras clave:** Antiepiléptico, Saxitoxina, Pentilentetrazol, Fenitoína



Vo.Bo.




---

**Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz**  
Co-Directora de Tesis

---

**Dr. José Jesús Bustillos Guzmán**  
Co-Director de Tesis

## Summary

Antiepileptic drugs (AED) regulate the over-excitation of nerve cells to avoid or reduce the frequency of epileptic seizures; however, AED present adverse effects, making it necessary to propose alternative drugs. Saxitoxin (STX) is a paralyzing toxin that blocks voltage-gated sodium channels (VGSC), a frequent target for finding new antiepileptics. Acute seizure models such as pentylenetetrazole (PTZ) in rodents can be used to evaluate seizures. A dose of 100 mg/kg of PTZ injected intraperitoneally (i.p.) presents three consecutive seizures: 1) myoclonus, 2) generalized clonic seizures (GCS), and 3) generalized tonic-clonic seizures (GTCS). The objective was to evaluate the antiepileptic effect of STX in CD-1 mice using the PTZ model and to compare its effect with phenytoin (PHT), a commercial antiepileptic that also blocks VGSCs. It was also evaluated if STX reaches the brain, using high-performance liquid chromatography, to identify if it persists after administration of PTZ. Five sublethal doses were established (1.8, 3.9, 6, 7.5, 8.5  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ), a mean lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ) of 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for STX, and a dose of 50 mg/kg for PHT. The experimental design consists of injecting intraperitoneally (i.p.) STX and PHT vehicles as controls, and the corresponding doses of STX and PHT. After 30 minutes, the PTZ (100 mg/kg) was administered i.p. to each of the experimental groups; during the following 30 minutes, the percentage of mice that presented the seizures and the time it took to start the seizures were evaluated. The results determined that STX did not prevent seizures and was not detected in the mice's brains, although it cannot be ruled out that they have had trace levels of STX that are not identified. The sublethal STX dose of 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  showed a significant increase in myoclonus latency compared to its vehicle and PHT. The same treatment decreased the percentage of mice that included GCS compared to PHT. PHT prevented the appearance of GTCS in 100% of the mice. Mice that survived STX  $\text{LD}_{50}$  showed a decrease in the percentage of organisms that presented the GTCS. This work is the first report where the STX is proposed as FAE, observing significative effects on latency and the percentage of mice that present seizures. STX has a narrow therapeutic margin; more studies are needed to elucidate the antiepileptic effects of STX or any of its analogs that have less toxic potency and a higher therapeutic range.

**Key words:** *Antiepileptic, Saxitoxin, Pentylenetetrazole, Phenytoin*



Vo.Bo.



---

**Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz**  
Co-Directora de Tesis

---

**Dr. José Jesús Bustillos Guzmán**  
Co-Director de Tesis

## Dedicatoria

A mi familia, que siempre ha creído en mí y me ha apoyado.

A mi hijo, que en poco tiempo me ha enseñado tanto y quien me da la fuerza para seguir adelante.

***“Ad lucem”***

## **Agradecimientos**

Al programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), por permitirme realizar la maestría en la institución y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. 488439). Al proyecto CONACyT de Ciencia Básica CB-2015-1 (No. 258122).

A la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa, y a la Dra. Leonor López permitirme realizar una estancia académica en sus instalaciones, su asesoramiento en el tema de tesis y capacitación en manejo animal.

A mi Comité Tutorial (Dra. Norma Estrada, Dr. José Bustillos y Dra. Leonor López), por su presencia, apoyo y disposición durante la realización del proyecto de maestría.

A Erick Núñez (titular) y Daniel Ceseña (técnico) del laboratorio de Análisis de Biotoxinas Marinas, por facilitarme la toxina, sus instalaciones, asesoramiento y capacitación en manejo animal para llevar a cabo el proyecto de tesis.

A Amaury Cordero (titular) y Guadalupe Sánchez (técnico) del Bioterio, por su asesoramiento, disposición y facilitación de material.

A la Dra. Norma Estrada por permitirme llevar a cabo parte mi proyecto en el laboratorio de BioHelis.

Al Dr. José Bustillos (titular) y Francisco Hernández (técnico) del laboratorio de Microalgas Nocivas, por el apoyo con el análisis de muestras en el cromatógrafo líquido de alta eficacia.

A Rosa María Morelos, Ismael Mendoza, Anais Lucero y a los técnicos Víctor Moyron y Julio Hernández por el apoyo en diferentes áreas del proyecto de tesis.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>Abreviaturas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1.</b> Generalidades de las crisis epilépticas.....	1
<b>1.2.</b> Blancos moleculares de los fármacos antiepilépticos .....	2
<b>1.3.</b> Desventajas de fármacos antiepilépticos convencionales.....	5
<b>1.4.</b> Modelos de estudio para detección de nuevos fármacos antiepilépticos .....	7
<b>1.5.</b> Modelo de crisis aguda del pentilentetrazol para investigación de nuevos fármacos antiepilépticos.....	8
<b>1.6.</b> La saxitoxina como un fármaco con potencial antiepiléptico .....	9
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	11
<b>2.1.</b> Potencial terapéutico de la saxitoxina y sus análogos.....	11
<b>2.2.</b> Canales de sodio dependientes de voltaje.....	12
<b>2.3.</b> Interacción de los canales dependientes de voltaje con la saxitoxina.....	17
<b>2.4.</b> Afinidad de la saxitoxina y sus derivados por las isoformas de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	18
<b>2.5.</b> Toxicidad de la saxitoxina.....	19
<b>2.6.</b> Toxicocinética de la saxitoxina.....	21
<b>2.6.1.</b> Distribución.....	21
<b>2.6.2.</b> Metabolismo.....	22
<b>2.6.3.</b> Excreción.....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>5.1.</b> Objetivo general.....	25
<b>5.2.</b> Objetivos particulares.....	25
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>6.1.</b> Obtención de ratones CD-1.....	26
<b>6.2.</b> Obtención de compuestos químicos.....	26
<b>6.3.</b> Dosis utilizadas de Saxitoxina, fenitoína y pentilentetrazol.....	27
<b>6.4.</b> Desarrollo experimental.....	27
<b>6.4.1.</b> Efecto antiepiléptico de cinco dosis subletales y una $DL_{50}$ de saxitoxina... ..	28
<b>6.4.2.</b> Comparación del efecto antiepiléptico de la dosis efectiva de saxitoxina con el de fenitoína.....	29
<b>6.5.</b> Análisis estadístico.....	30
<b>6.5.1.</b> Porcentaje de ratones que presentan cada crisis epiléptica.....	30



6.5.2. Latencia a la aparición de la primera crisis epiléptica.....	30
6.6. Identificación y Cuantificación de la saxitoxina en los cerebros de los ratones por cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente.....	30
7. <b>RESULTADOS</b> .....	32
7.1. Efecto antiepiléptico de cinco dosis subletales y una $DL_{50}$ de saxitoxina .....	32
7.2. Comparación del efecto antiepiléptico de la dosis efectiva de saxitoxina con el de fenitoína .....	36
7.3. Identificación y cuantificación de la saxitoxina en los cerebros de los ratones.....	39
8. <b>DISCUSIÓN</b> .....	40
8.1. Efecto antiepiléptico de la saxitoxina.....	40
8.2. Comparación de la saxitoxina con la fenitoína.....	42
8.3. La saxitoxina en el cerebro.....	44
9. <b>CONCLUSIONES</b> .....	45
10. <b>LITERATURA CITADA</b> .....	46

## Lista de figuras

- Figura 1.** Estructura química de las toxinas paralizantes (Tomado de Wiese *et al.*, 2010.. 10
- Figura 2.** (A) Diagrama de la estructura molecular de la subunidad  $\alpha$  del VGSC donde se muestran los cuatro dominios, cada uno con sus 6 segmentos  $\alpha$  hélice; el dominio sensor de voltaje (VSD); el dominio del poro (PD), el bucle de inactivación (IFM); los motivos DEKA y EEDD del filtro de selectividad (SF); y los sitios farmacológicos de unión a diferentes toxinas (Tomado y modificado de Zhang *et al.* 2013). (B) Estructura química de la STX y su interacción con el VGSC en el área del SF descrito en el documento (Tomado y modificado de Shen *et al.*, 2018)..... 18
- Figura 3.** Porcentaje (%) de ratones que presentan las crisis epilépticas: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; a diferentes dosis de STX ( $\mu\text{g}$  STX/kg peso ratón), en ratones CD-1 ( $20\pm 1$  g). El vehículo (veh) o las diferentes dosis de STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). El asterisco denota diferencia estadística significativa de las dosis administradas con respecto al vehículo (control) ( $p < 0.05$ )..... 35
- Figura 4.** Latencia (segundos) a la aparición de la primera crisis epiléptica: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con diferentes dosis de STX ( $\mu\text{g}$  STX/kg peso ratón), en ratones CD-1 ( $20\pm 1$  g). El vehículo (veh) o las diferentes dosis de STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). Los datos se representan con un círculo y se muestran la mediana, los cuartiles del 25 y 75% y los valores mínimo y máximo. El asterisco denota diferencia estadística significativa de las dosis administradas con respecto al control (vehículo) ( $p < 0.05$ )..... 36
- Figura 5.** Porcentaje (%) de ratones que presentan las crisis epilépticas: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con una dosis de FNT (50mg/kg) comparada con una dosis de STX (8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), en ratones CD-1 ( $20\pm 1$  g). Los vehículos (veh), la FNT o la STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). El asterisco denota diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )..... 38
- Figura 6.** Latencia (segundos) a la aparición de la primera crisis epiléptica: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con una dosis de FNT (50mg/kg) comparada con una dosis de STX (8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en ratones CD-1 ( $20\pm 1$  g). Los vehículos (veh), la FNT o la STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). Los datos se representan con un triángulo y se muestran la mediana, los cuartiles del 25 y 75% y los valores mínimo y máximo. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0.01$ ). El superíndice a denota que no hubo comparación con la dosis de FNT (50 mg/kg) por ausencia de datos..... 39

**Figura 7.** Cromatogramas representativos de STX analizada en el cerebro de ratón con el método de HPLC-FLD. a) Cromatograma de referencia del estándar de STX (FDA, NIST) con un tiempo de retención de 30 min; b) cromatograma de ratones sin exposición a STX; c) cromatograma proveniente del experimento con una dosis de 8.5 µg STX/kg peso ratón y 30 min después administración de PTZ (100 mg/kg)..... 40

**Lista de tablas**

<b>Tabla I.</b> Localización y expresión de las isoformas de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	15
<b>Tabla II.</b> Distribución de las isoformas de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje en la estructura neuronal del sistema nervioso central.....	16
<b>Tabla III.</b> Afinidad de las isoformas de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje por la STX.....	19
<b>Tabla IV.</b> Valores de toxicidad ( $DL_{50}$ ) en vertebrados para STX administrados por diferentes vías: (i.m.) intramuscular; (i.p.) intraperitoneal; (i.v.) intravenosa; (o.) oral; (s.c.) subcutánea. Los valores de $DL_{50}$ se muestran en $\mu\text{g}/\text{kg}$ y $\text{nmol}/\text{kg}$ .....	20

## Abreviaturas

<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemist
<b>Arg</b>	Arginina
<b>BZD</b>	Benzodiazepinas
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CBZ</b>	Carbamazepina
<b>CCG</b>	Crisis Clónico Generalizada
<b>CTCG</b>	Crisis Tónico Clónico Generalizada
<b>CD<sub>55</sub></b>	Dosis convulsiva media
<b>CD-1/ICR</b>	Cepa de ratón albino
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>Cryo-EM</b>	Estructura de microscopía crioelectrónica
<b>Dc1a</b>	Toxina peptídica que altera la activación de voltaje
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DEKA</b>	(D) Aspartato- (E) glutamato-(K) lisina- (A)alanina
<b>ED<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva media
<b>EEDD</b>	(E) Glutamato- (E) glutamato-(D) aspartato- (D)aspartato
<b>ELISA</b>	Acrónimo del inglés Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay
<b>FAE</b>	Fármaco antiepiléptico
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FBM</b>	Felbamato
<b>FNT</b>	Fenitoína
<b>g</b>	Gramos
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor A de ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA<sub>B</sub></b>	Receptor B de ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GBP</b>	Gabapentina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GMT</b>	Gating Modifier Toxin
<b>GTX 2/3</b>	Gonyautoxinas 2/3
<b>h</b>	Horas
<b><sup>3</sup>H</b>	Tritio
<b>H<sub>2</sub>Oa</b>	Agua acidificada con HCl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HEPA</b>	Filtros de aire
<b>HPLC-FLD</b>	High Performance Liquid Cromatography with Fluorescence detector
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>HSD</b>	Honestly significant difference
<b>IFM</b>	Isoleucina-fenilalanina-metionina

<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>K</b>	Potasio
<b>kD</b>	Kilodaltones
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal Media
<b>LEV</b>	Levetiracetam
<b>LSD</b>	Least significant difference
<b>Lys</b>	Lisina
<b>LTG</b>	Lamotrigina
<b>M</b>	Molar
<b>MES</b>	Maximal electroshock
<b>µg/kg</b>	Microgramos por kilogramo de peso
<b>mg/kg</b>	Miligramos por kilogramo de peso
<b>min</b>	Minutos
<b>µl</b>	Microlitros
<b>ml</b>	Mililitros
<b>ml/kg</b>	Mililitros por kilogramo de peso
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normalidad
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canal de sodio controlado por voltaje
<b>Na<sub>v</sub>PaS</b>	Canal de sodio controlado por voltaje de <i>Periplaneta americana</i>
<b>NEO</b>	Neosaxitoxina
<b>ng/g</b>	Nanogramos por gramo
<b>ng/ml</b>	Nanogramos por mililitros
<b>NH<sub>2</sub></b>	Grupo amino
<b>Nm</b>	Nanómetros
<b>nmol/kg</b>	Nanomoles por kilogramos
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>OCBZ</b>	Oxcarbazapina
<b>P</b>	Conector extracelular del poro
<b>P7</b>	Día postnatal 7 de rata
<b>PB</b>	Fenobarbital
<b>PD</b>	Dominio del poro
<b>Pg</b>	Picogramo
<b>PGB</b>	Pregabalina
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PRM</b>	Primidona
<b>PST</b>	Paralyzing Shellfish Toxins
<b>PTZ</b>	Pentientetrazol
<b>RFM</b>	Rufinamida
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto

<b>RTG</b>	Retigabina
<b>S</b>	Segmento transmembranal de $\alpha$ hélice
<b>S</b>	Segundos
<b>s.c.</b>	Subcutánea
<b>SIA</b>	Segmento Inicial del Axón
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>SF</b>	Selectivity filter (filtro de selectividad)
<b>Ss</b>	Solución salina
<b>SS</b>	Segmento transmembranal corto de $\alpha$ hélice
<b>STP</b>	Estiripentol
<b>STX</b>	Saxitoxina
<b>STXOL</b>	Saxitoxinol
<b>FAT</b>	Fracción de alcaloides totales
<b>TGB</b>	Tiagabina
<b>TMB</b>	TetraMetilBencidina
<b>TPM</b>	Topiramato
<b>TTC</b>	Técnico Titular C
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>Veh</b>	Vehículo
<b>VGB</b>	Vigabatrina
<b>VGCC</b>	Voltage Gated Calcium Channel
<b>VGKC</b>	Voltage Gated Potassium (K) Channel
<b>VGSC</b>	Voltage Gated Sodium Channel
<b>VPA</b>	Valproato
<b>VSD</b>	Voltage-Sensing Domain
<b>ZNS</b>	Zonisamida

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades de las crisis epilépticas

Una crisis epiléptica es una manifestación clínica que resulta de la actividad excesiva de las neuronas y deriva en la alteración de la conciencia, de la sensación, o en el control motor. Las crisis epilépticas deben distinguirse de la epilepsia en que las crisis pueden ser eventos aislados o agudos (no asociados con la epilepsia) o bien crónicos y espontáneos, que es propiamente epilepsia, la cual es una condición crónica en la que las crisis se producen repetida y espontáneamente debido a una anomalía cerebral subyacente que persiste entre crisis (Bowman *et al.*, 2001; Simeone y Rho, 2009).

Las crisis epilépticas tienen dos características distintivas: hiperexcitabilidad e hipsincronía neuronal; es decir, que para que una crisis epiléptica se manifieste de forma electroclínica, deben generarse impulsos nerviosos a una velocidad excesivamente alta y/o en un patrón anormal, así como, presentar actividad sincrónica de grandes poblaciones de neuronas (Simeone y Rho, 2009).

Las crisis epilépticas se clasifican en dos categorías, dependiendo de si toda la corteza cerebral (crisis generalizadas), o sólo una parte restringida (crisis parciales), está involucrada en la descarga eléctrica anormal inicial. Se clasifican como simples cuando la conciencia se conserva y complejas cuando la conciencia se altera. Las crisis parciales simples pueden evolucionar hacia crisis parciales complejas o crisis tónico-clónicas secundariamente generalizadas como resultado de la propagación de actividad eléctrica anormal. Las crisis generalizadas primarias (también llamadas crisis generalizadas) involucran áreas generalizadas de la corteza cerebral, y estas se subdividen en dos tipos: convulsivas y no convulsivas.



Las crisis generalizadas convulsivas se caracterizan por contracciones de los músculos a veces violentas y sostenidas, mientras que las crisis generalizadas no convulsivas carecen de actividad motora prominente. Las crisis generalizadas tónico-clónicas, clónicas y algunas tónicas se denominan crisis generalizadas convulsivas. La crisis generalizada no convulsiva más común es la de ausencia, pero la categoría también incluye crisis atónicas, tónicas breves y mioclónicas (Bowman *et al.*, 2001; Simeone y Rho 2009).

Las crisis epilépticas pueden ser causadas por múltiples mecanismos, sin embargo, se discute a menudo que las crisis surgen cuando hay una interrupción de los mecanismos que normalmente crean un equilibrio entre la excitación y la inhibición de la actividad eléctrica en el sistema nervioso. Por lo tanto, normalmente hay controles que evitan que las neuronas generen un impulso nervioso, pero también hay mecanismos que lo facilitan para que el sistema nervioso pueda funcionar adecuadamente. La interrupción de los mecanismos que inhiben la activación, o la promoción de los mecanismos que facilitan la excitación pueden provocar crisis. Sin embargo, en la epilepsia, no solo se requiere un mecanismo del por qué se producen las crisis, sino un mecanismo adicional que también explique el momento de las transiciones episódicas de la actividad normal a las crisis (Bowman *et al.*, 2001; Scharfman, 2007; Staley, 2015).

## **1.2. Blancos moleculares de los fármacos antiepilépticos**

Tradicionalmente, existen tres clases principales de blancos moleculares que se consideran relevantes para limitar la actividad epiléptica. Estos incluyen: 1) canales de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) controlados por voltaje; 2) receptores A de ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\text{GABA}_A$ ); y 3) receptores ionotrópicos de glutamato. Los fármacos antiepilépticos (FAE) clínicamente útiles ejercen sus efectos principalmente sobre uno o más de estos blancos (Simeone y Rho, 2009).

Las neuronas y las células musculares son células excitables, que al ser estimuladas generan una respuesta de naturaleza eléctrica. Para poder realizar dicha respuesta la membrana de la neurona dispone de canales iónicos que van a dejar fluir cargas eléctricas en forma de iones. El ciclo de actividad de un canal le permite pasar por tres estados, abierto, inactivo y cerrado, así, los FAE pueden afectar directamente los canales iónicos o influir indirectamente en la síntesis, el metabolismo o la función de los neurotransmisores o receptores que controlan la apertura y el cierre de los canales (Scharfman, 2007). El potencial de acción es el mecanismo celular por el cual las células excitables dentro del sistema nervioso se comunican entre sí. Para el desarrollo de un potencial de acción se requiere la existencia de canales controlados por voltaje que se abren o cierran en respuesta a la despolarización de la membrana. Cuando ésta alcanza un umbral, se abren los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (VGSC, por sus siglas en inglés: Voltage Gated Sodium Channel), a través de los cuales entra el  $\text{Na}^+$  al interior de la neurona y disminuye la diferencia de cargas eléctricas con la parte externa, así la membrana se despolariza y se produce un potencial de acción (Errington *et al.*, 2005). La modulación selectiva de este proceso representa un objetivo para los FAE como la fenitoína (FNT), carbamazepina (CBZ), valproato (VPA), felbamato (FBM), lamotrigina (LTG), oxcarbazepina (OCBZ), topiramato (TPM) y zonisamida (ZNS) (Bromfield *et al.*, 2006; Leppik *et al.*, 2006).

Por su parte, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VGCC, por sus siglas en inglés: Voltage Gated Calcium Channel) son críticos para el correcto funcionamiento de las células excitables dentro del sistema nervioso central (SNC). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la célula es esencial para la transducción de señales, como en la liberación de neurotransmisores, y en la regulación de la expresión génica e incluso la muerte celular (Errington *et al.*, 2005). Entre los FAE asociados a los VGCC están la etosuximida (ESM), gabapentina (GBP), levetiracetam (LEV), LTG, TPM, VPA y ZNS (Bromfield *et al.*, 2006; Leppik *et al.*, 2006). Por lo tanto, los FAE que modulan los VGSC y VGCC estabilizan el flujo de iones en las membranas neuronales, bloquean la activación y propagación del potencial de acción, reducen la liberación de neurotransmisores y así evitan la propagación de las crisis epilépticas (White *et al.*, 2007).

Otro blanco molecular de los FAE es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que es un aminoácido que actúa como el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC. Ejerce su función primordial en la sinapsis mediante la unión a receptores  $GABA_A$  postsinápticos que se encuentran acoplados a un canal iónico, y cuya activación hiperpolariza la célula e inhibe la transmisión de un potencial de acción (Jewett y Sharma, 2018). El GABA se forma dentro de los terminales del axón GABAérgico y se libera en la sinapsis, donde actúa en uno de los dos tipos de receptores:  $GABA_A$ , que controla la entrada de  $Cl^-$  en la célula, y  $GABA_B$ , que aumenta la permeabilidad del  $K^+$ , disminuye la entrada de  $Ca^{2+}$  e inhibe la liberación presináptica de otros neurotransmisores. El GABA se elimina rápidamente por recaptación en las células gliales y las terminales nerviosas presinápticas y luego se cataboliza por la transaminasa del GABA (Treiman, 2001). Varios de los FAE disponibles han demostrado la capacidad de potenciar la neurotransmisión GABAérgica mediada por el receptor  $GABA_A$ , como las benzodiazepinas (BZD), los barbitúricos, FBM, TPM y ZNS. También se ha encontrado que varios FAE aumentan el tono GABAérgico al disminuir el metabolismo de GABA, como el VPA y la vigabatrina (VGB); prevenir la recaptación de GABA, como la tiagabina (TGB); o aumentar su síntesis con VPA y la gabapentina (GBP) (Leppik *et al.*, 2006).

Por su parte, el glutamato es el neurotransmisor excitador predominante del cerebro de los mamíferos adultos. El glutamato media sus efectos excitadores en la sinapsis a través de varias subclases de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Barker-Haliski y White, 2015). Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos se pueden subdividir en aquellos sensibles al N-metil-D-aspartato (NMDA) y aquellos sensibles al  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato y al kainato que son los receptores AMPA y kainato, respectivamente. Los receptores NMDA aumentan predominantemente la permeabilidad de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , mediando los potenciales excitadores postsinápticos lentos y la excitación mediada por los receptores AMPA y kainato produce una elevada permeabilidad al  $Na^+$  y son responsables de la neurotransmisión excitadora rápida (Czapinski *et al.*, 2005). Tras su liberación, sus acciones son terminadas por

transportadores de glutamato (Underhill, 2014). De los FAE disponibles, el FBM y el TPM son novedosos porque poseen una capacidad única para reducir la neurotransmisión excitadora mediada por glutamato mediante la modulación de los receptores NMDA, en el caso del FBM, y el TPM con los receptores AMPA y kainato. La acción del FBM en los receptores NMDA puede estar relacionada con la reducción de la neurotransmisión excitadora lenta y la disminución de la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios asociada con la liberación excesiva de glutamato. Por el contrario, la acción del TPM en los receptores de AMPA y kainato modifica la excitación rápida (Leppik *et al.*, 2006).

### **1.3. Desventajas de fármacos antiepilépticos convencionales**

Los fármacos tienen algunos efectos adversos, que van desde leves hasta agudos, y graves o crónicos (Cramer *et al.*, 2010). Se distinguen cinco tipos de efectos adversos que están relacionados con el mecanismo de acción conocido del fármaco (tipo A); con la vulnerabilidad individual, como el mecanismo inmunológico, genético u otro (tipo B); con la dosis acumulativa del fármaco (tipo C); con la exposición prenatal (tipo D); o a interacciones farmacológicas (tipo E) (Perucca y Gilliam, 2012).

Los efectos tipo A más representativos de los FAE afectan el SNC e incluyen somnolencia, fatiga, mareos, inestabilidad, visión borrosa o doble, dificultad para concentrarse, problemas de memoria, irritabilidad, depresión, cambios de comportamiento o personalidad, psicosis (Perucca y Gilliam, 2012; Sills, 2011). Aunque los efectos adversos varían de un fármaco a otro, la mayoría de los FAE, si no todos, comparten estos efectos, especialmente los trastornos de sedación (fenobarbital (PB), primidona (PRM) y BZD), coordinación (CBZ, FNT, PRM y BZD), disfunción cognitiva (barbitúricos, BZD, TPM), efectos psiquiátricos (barbitúricos, VGB, TGB, TPM, LEV, ZNS y FBM), entre otros (Perucca y Gilliam, 2012).

Los efectos tipo B más comunes de los FAE incluyen reacciones cutáneas, hematológicas y hepáticas o pancreáticas, mientras que los cambios en el peso corporal son un efecto típico del tipo C, que puede presentar graves riesgos para la salud asociados con la hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia y enfermedad cardiovascular, provocando la interrupción del tratamiento. La pérdida de peso puede ser causada por el TPM, ZNS, FBM, estiripentol (STP) y rufinamida (RFM). El aumento de peso se asocia más comúnmente con el VPA, GBP, PGB, VGB, retigabina (RTG) y, en menor medida, con la CBZ. Los efectos teratogénicos y cancerígenos se incluyen en la categoría tipo D. La exposición prenatal a FAE, particularmente en el primer trimestre, se asocia con un aumento de dos a tres veces en la frecuencia de malformaciones congénitas (Perucca y Gilliam, 2012).

Las interacciones farmacológicas adversas (tipo E) son comunes con el tratamiento de la epilepsia y generalmente son clínicamente relevantes porque la mayoría de los FAE tienen un índice terapéutico estrecho, y pequeños cambios en la farmacocinética puede resultar en una eficacia reducida o un aumento de los efectos tóxicos. En segundo lugar, muchos FAE afectan la actividad de las enzimas que metabolizan otros fármacos; y por último, la mayoría de los FAE son sustratos de las mismas enzimas. Las interacciones farmacocinéticas adversas pueden inducir o inhibir enzimas que metabolizan otros fármacos. La inducción enzimática se lleva a cabo con CBZ, FNT, PB y PGB, reduciendo la concentración sérica y la eficacia de una amplia gama de medicamentos, incluidos los antimicrobianos; inmunosupresores; anticonceptivos orales; medicamentos cardiovasculares, psicotrópicos y antineoplásicos y otros FAE. La inhibición enzimática es causada típicamente por el VPA, que aumenta las concentraciones séricas de varios fármacos, incluidos PB y LTG (Perucca y Gilliam, 2012).

#### **1.4. Modelos de estudio para detección de nuevos fármacos antiepilépticos**

Como se mencionó en el apartado previo, los FAE que se usan pueden promover efectos adversos, provocando la interrupción temprana y fracaso del tratamiento (Cramer *et al.*, 2010; Perucca y Gilliam, 2012; Sills, 2011). Por eso es que existe una demanda de nuevos tipos de FAE. El desarrollo de nuevos FAE ha sido exitoso en las últimas décadas, sin embargo, la búsqueda de mejor eficacia y tolerabilidad sigue siendo un objetivo importante. El descubrimiento y el desarrollo de un nuevo FAE depende en gran medida del uso preclínico de modelos animales para establecer la eficacia y la seguridad antes de los ensayos en humanos (Löscher, 2011).

En el descubrimiento y desarrollo de nuevos FAE, los modelos animales de crisis epilépticas o epilepsia tienen varios propósitos: 1) identificar nuevos FAE (Borowicz *et al.*, 2003; Kitano *et al.*, 2005; Saravanan *et al.*, 2014); 2) evaluar las posibles eficacias específicas del compuesto contra diferentes tipos de crisis o epilepsia (Heller *et al.*, 1983; Klitgaard, 2001); 3) probar modelos específicos de crisis difíciles de tratar y que son resistentes a los FAE para investigar si el nuevo fármaco tiene ventajas (Bethmann *et al.*, 2007; Brandt y Löscher 2014); 4) caracterizar la eficacia preclínica durante la administración crónica (Rocha 2008; Muñana *et al.*, 2015); 5) estudiar si la epileptogénesis altera el potencial de efectos adversos de un fármaco determinado (Löscher y Brandt 2010); 6) estimar las concentraciones plasmáticas efectivas de nuevos FAE para los primeros ensayos clínicos (Blanco-Serrano *et al.*, 1999; May *et al.*, 2003); y 7) descubrir terapias que puedan prevenir o modificar el desarrollo de la epilepsia (Löscher y Brandt 2010).

No todos los modelos animales pueden usarse para todos los propósitos descritos anteriormente. Además, la intención del experimento es esencial para la selección de un modelo animal adecuado. La mayoría de los modelos animales utilizados en la investigación son modelos de crisis epilépticas, en lugar de modelos de epilepsia, debido a que la epilepsia se caracteriza por crisis recurrentes espontáneas (Löscher, 2011).

### **1.5. Modelo de crisis aguda del pentilentetrazol para investigación de nuevos fármacos antiepilépticos**

Los modelos animales deben ser fáciles de realizar, eficientes en tiempo y costo, y predictivos de la actividad clínica. Uno de los modelos que se utiliza comúnmente como primera aproximación, capaz de reproducir total o parcialmente una serie de características clínicas, que luego se puedan trasladar al humano o a otras especies animales, es el modelo de crisis aguda del pentilentetrazol (PTZ) (Löscher, 2011).

El PTZ es un antagonista no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub>, que interacciona con el sitio de unión a picrotoxina, reduciendo principalmente la permeabilidad del Cl<sup>-</sup> y, en menor medida, la del Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Hansen *et al.*, 2000; Ramos-Morales *et al.*, 2012; Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011). La prueba con PTZ es el modelo de primera elección para detectar FAE. El PTZ se disuelve en solución salina o agua y puede administrarse en ratas neonatas (a partir de P7) y ratones adultos, más comúnmente por vía subcutánea (s.c.) intraperitoneal (i.p.), o menos común, por vía intravenosa (i.v.) (Velíšek, 2006; Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011). Usualmente, todos los fármacos se administran 30 min antes de la inyección de PTZ, y posteriormente, los animales se observan durante 30 min para determinar el tiempo que tardan en iniciar las crisis (latencia), la frecuencia de las crisis, la duración de las crisis y la mortalidad (Bhutada *et al.*, 2010; González-Trujano *et al.*, 2018; Herrera-Calderon *et al.*, 2018; Ingale y Gandhi 2015; Mandhane *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2006; Rasouli *et al.*, 2017; Rocha, 2008; Shibley y Smith, 2002; Tambe *et al.*, 2015).

Las manifestaciones conductuales, en ratones de 20–30 g, causadas por el PTZ lo hacen un modelo de crisis generalizadas con espasmos musculares mioclónicos, crisis clónicas (movimientos bruscos involuntarios y pérdida de postura), y tónico-clónicas (que empieza como la anterior y termina con la extensión de las extremidades) (González-Trujano *et al.*, 2018; Ramos-Morales *et al.*, 2012; Yonekawa *et al.*, 1980; Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011). Se reportan crisis de ausencia con dosis bajas de PTZ (20–30 mg/kg de peso); y crisis tónico-clónicas, con dosis altas (mayores a 40 mg/kg de peso) (Ramos-Morales *et al.*, 2012; Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011).

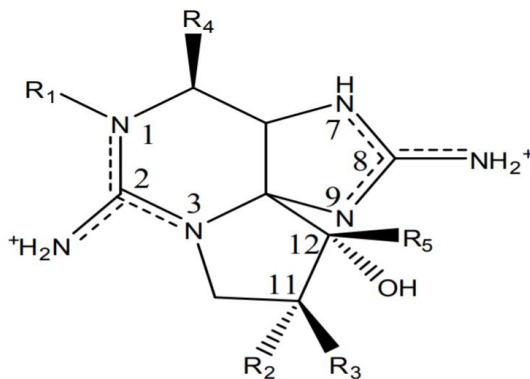
## 1.6. La saxitoxina como un fármaco con potencial antiepiléptico

En la búsqueda de nuevos FAE, se han reportado estudios sobre compuestos de origen biológico que evitan o disminuyen las crisis epilépticas (Bhutada *et al.*, 2010; González-Trujano *et al.*, 2018; Herrera-Calderon *et al.*, 2018; Ingale y Gandhi, 2015; Tambe *et al.*, 2015). En el presente estudio se investigó si la saxitoxina (STX) tiene efecto protector contra las crisis epilépticas inducidas por el PTZ.

La STX es un alcaloide neurotóxico natural (Wiese *et al.*, 2010) que pertenece al grupo de las toxinas paralizantes de mariscos (PST, por sus siglas en inglés: Paralytic Shellfish Toxin) debido a su ocurrencia y asociación con mariscos. Las PST son un grupo de 57 análogos que presentan una estructura tetrahidropurinica, estrechamente relacionados, cuya potencia difiere ampliamente (Durán-Riveroll *et al.*, 2017; Wiese *et al.*, 2010). La más potente es la STX, la primera PST caracterizada químicamente. El nombre saxitoxina se deriva del molusco en el que se identificó por primera vez, *Saxidomus giganteus* (Schantz *et al.* 1957). La STX y sus análogos son producidos por una variedad de fitoplancton, como *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, *Alexandrium catenella*, *A. tamarense*, *A. minutum* (Berdalet *et al.*, 2015; Hallegraeff *et al.*, 2004), entre otras; así como por cianobacterias de agua dulce, como *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos *et al.*, 1999).

La estructura básica de la STX, es una trialkiltetrahidropurina, con las posiciones 2 y 8 del anillo de purina que contiene los grupos amino (NH<sub>2</sub>), que forman los dos grupos de guanidinio (Fig. 1). A pH fisiológico, el 1,2,3-guanidino lleva una carga positiva, mientras que el grupo 7,8,9-guanidino está parcialmente desprotonado, por lo que la molécula tiene una alta polaridad. (Cusick y Sayler, 2013; Shimizu *et al.*, 1981; Wiese *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Debido a esta naturaleza polar, la molécula de STX se disuelve fácilmente en agua y alcoholes de cadena hidrocarbonada corta, pero es insoluble en solventes orgánicos. La STX es estable a temperaturas altas a un pH 3–4 (Indrasena y Gill, 2000a, 2000b).





**Figura 1.** Estructura química de las toxinas paralizantes (Tomado de Wiese *et al.*, 2010).

El blanco molecular principal de la STX, es el VGSC en las células nerviosas y musculares, al que se une con una alta afinidad y puede causar la muerte por parálisis respiratoria. Una molécula de STX se une por canal de Na<sup>+</sup>, específicamente en el poro del canal, por lo tanto, la STX es capaz de bloquear efectivamente el flujo interno de iones de Na<sup>+</sup> hacia el interior de la célula (Cusick y Sayler, 2013; Zhang *et al.*, 2013), efecto deseado contra las crisis epilépticas que se asocian a una hiperexcitabilidad de estos canales iónicos. Sin embargo, la STX también se une al canal de K<sup>+</sup> humano (Wang *et al.*, 2003) y actúa sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Su *et al.*, 2004). En el caso del canal de K<sup>+</sup>, el mecanismo de interacción difiere del canal de Na<sup>+</sup>, al modificar la activación del canal en lugar de bloquear el canal. Además, a diferencia de su interacción con el canal de Na<sup>+</sup>, en el que solo una molécula se une, cuatro o más moléculas pueden unirse a los sitios extracelulares del canal de K<sup>+</sup>, posiblemente en un sitio cercano al sensor de voltaje (Wang *et al.*, 2003). Por otro lado, en el caso de los VGCC, aunque el bloqueo no está completo como en los canales de Na<sup>+</sup>, se sugiere que la STX actúa en el canal de Ca<sup>2+</sup> también en un sitio extracelular (Cusick y Sayler, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Potencial terapéutico de la saxitoxina y sus análogos

Ciertos análogos de la STX han demostrado un éxito considerable en ensayos médicos, por ejemplo, las gonyautoxinas 2 y 3 (GTX 2/3) se han utilizado en el tratamiento de fisuras anales crónicas y agudas, al producir una parálisis flácida del músculo anal de una manera segura y efectiva, y por lo tanto reduciendo el tiempo de curación (Garrido *et al.*, 2005). Igualmente, las GTX 2/3 se han aplicado para tratar la cefalea tensional y como anestésico para la artroplastia total de rodilla (Hinzpeter *et al.*, 2016; Lattes *et al.*, 2009; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2006).

Por su parte, la neosaxitoxina (NEO), se ha utilizado en el tratamiento de la acalasia, un trastorno de la motilidad gastrointestinal que resulta de una falla del esfínter esofágico inferior que causa disfagia o dolor en el pecho. La aplicación local de esta toxina en pequeñas cantidades causa la relajación del esfínter y la parálisis del músculo (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2006). El mismo análogo ha demostrado su eficacia como anestésico local y como bloqueador del dolor de acción prolongada en el tratamiento del síndrome de dolor de vejiga (Manríquez *et al.*, 2015).

La STX ha sido estudiada como agente anestésico ya que puede reducir, o incluso bloquear la sensación de dolor (Kohane *et al.*, 2000). No obstante, no existe evidencia de investigaciones relacionadas a la STX como agente antiepiléptico, pero sí se ha sugerido que la tetrodotoxina (TTX), una neurotoxina con el mismo modo de acción de la STX; reduce actividad epileptiforme (Burack *et al.*, 1995). Por lo que en el presente estudio se propuso estudiar a la STX como potencial antiepiléptico. Ya que no hay estudios previos que relacionen a la STX como posible antiepiléptico, se aborda lo que se sabe de la STX que sea de utilidad para investigarla para posible antiepiléptico, como es el modo de acción relacionado a los canales iónicos dependientes de voltaje, especialmente los VGSC, su afinidad a ellos y los factores que hay que tomar en cuenta como la toxicidad, distribución, metabolismo y excreción de la STX.

## 2.2. Canales de sodio dependientes de voltaje

Los VGSC consisten en una subunidad  $\alpha$  (220–260 kD) que forma el núcleo de conducción de iones y una o más subunidades  $\beta$  auxiliares ( $\beta 1$ – $\beta 4$ ) de 30 a 40 kD. La subunidad  $\alpha$  (Fig. 2A) contiene los sensores de voltaje y el poro conductor de iones. Las subunidades  $\beta$  modifican la cinética y la dependencia del voltaje de la activación y sirven como moléculas de adhesión celular que interactúan con la matriz extracelular, otras moléculas de adhesión celular y el citoesqueleto (Barker *et al.*, 2017; Cusick y Sayler, 2013; de Lera Ruíz y Kraus, 2015).

La subunidad  $\alpha$  (Fig. 2A) consiste en cuatro dominios transmembranales homólogos, pero no idénticos (I-IV), conectados por enlaces intracelulares o extracelulares, cada dominio contiene seis segmentos transmembranales  $\alpha$ -hélice (S1-6) y un segmento corto de penetración de membrana (SS1 y SS2) entre los segmentos S5 y S6. Además, contiene estructuras funcionales del poro central (S5 y S6), filtro de selectividad de iones (SS1 y SS2) y sensores de voltaje (S1-4).

Los segmentos S1-4 de cada dominio forman el dominio de detección de voltaje (VSD, por sus siglas en inglés: Voltage-Sensing Domain), cuya función es la regulación de la apertura del canal tras la despolarización de la membrana. La flexibilidad del VSD está mediada principalmente por el segmento S4 que contiene motivos análogos y repetidos de aminoácidos cargados positivamente (arginina, Arg; o lisina, Lys) en cada tercera posición, seguidos de dos aminoácidos hidrofóbicos; este segmento sirve como un 'sensor de voltaje' que inicia la activación dependiente del voltaje respondiendo a la despolarización de la membrana y haciendo que el canal experimente un cambio conformacional que permita la entrada selectiva de iones  $\text{Na}^+$  a través del poro. La inactivación del canal de  $\text{Na}^+$  está mediada por un bucle intracelular corto que contiene tres residuos de aminoácidos hidrófobos (Isoleucina-fenilalanina-metionina; IFM) y está formado por un conector intracelular entre los dominios III y IV. Después del movimiento de los sensores de voltaje, la compuerta de inactivación tapa el poro y evita que el  $\text{Na}^+$  fluya a través del canal.

El dominio del poro (PD, por sus siglas en inglés: Pore Domain) con segmentos S5, S6 y los conectores extracelulares del poro (P) forman el poro del canal y el filtro de selectividad (SF, por sus siglas en inglés: Selectivity Filter), que es la parte más estrecha del poro, la cual distingue iones con cargas y radios similares y permite selectivamente el flujo de  $\text{Na}^+$  hidratado a través del poro. El SF está invariablemente compuesto de aspartato (D) en el dominio I, glutamato (E) en el dominio II, lisina (K) en el dominio III y alanina (A) en el dominio IV (o DEKA), Cada tres posiciones del motivo DEKA hay un anillo de aminoácidos cargados negativamente (E –E –D –D; en mamíferos) que crea una nube electrostática para atraer los iones  $\text{Na}^+$  al poro (Cusick y Sayler, 2013; Barker *et al.*, 2017; de Lera Ruíz y Kraus, 2015; Durán-Riveroll y Cembella, 2017).

Se han identificado una variedad de isoformas de los canales de  $\text{Na}^+$  mediante el registro electrofisiológico, la purificación bioquímica y la clonación (Goldin, 2001). Hasta la fecha, se han clonado 10 isoformas de la subunidad  $\alpha$  y cuatro subunidades  $\beta$ . La nomenclatura de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de los VGSC se basa en la de los canales de  $\text{K}^+$  controlados por voltaje (VGKC, por sus siglas en inglés: Voltage Gate Potassium, “K”; Channel) (Chandy y Gutman, 1993). La nomenclatura utiliza un sistema numérico para definir subfamilias y subtipos basados en similitudes entre las secuencias de aminoácidos de los canales (Catterall *et al.*, 2005; Ertel *et al.*, 2000). En este sistema de nomenclatura, el nombre de un canal individual consiste en el símbolo químico del ion permeante principal ( $\text{Na}^+$ ) con el regulador fisiológico principal (voltaje) indicado como un subíndice ( $\text{Na}_v$ ). El número que sigue al subíndice indica la subfamilia de genes (actualmente solo  $\text{Na}_v1$ ), y el número que sigue al punto completo identifica la isoforma del canal específico (por ejemplo,  $\text{Na}_v1.1$ ) (Goldin *et al.*, 2000).

En las células de mamíferos, se han reportado 10 isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\text{Na}_v1.1$  –  $1.9$  y  $\text{Na}_vX$ ) (Zhu *et al.*, 2016) que difieren en los patrones de expresión en los tejidos, sin embargo, las propiedades farmacológicas del canal  $\text{Na}_vX$  siguen sin estar claras (Wang *et al.*, 2017). En general, los subtipos de canales  $\text{Na}_v$  tienen una distribución predominante, donde  $\text{Na}_v1.1$ - $1.3$  y  $1.6$  se distribuyen principalmente en el SNC;  $\text{Na}_v1.7$ -

1.9 se expresan en mayor grado en el sistema nervioso periférico (SNP); y  $\text{Na}_v1.4$  y 1.5 son expresado sselectivamente en los músculos esqueléticos y cardíacos adultos, respectivamente (Barker *et al.*, 2017; de Lera Ruíz y Kraus 2015; Zhang *et al.*, 2013), sin embargo, otros subtipos de canales  $\text{Na}_v$  que no tienen distribución predominante, también pueden estar presentes en el SNC, SNP y músculo cardíaco (Wang *et al.*, 2017). Además, la expresión y la distribución de las isoformas  $\text{Na}_v$  no están igualmente distribuidas en los modelos animales (Tabla I) ni en la estructura de las neuronas (Tabla II) (Wang *et al.*, 2017).

Con respecto a los modelos animales,  $\text{Na}_v1.1-1.3$ ,  $\text{Na}_v1.5$  y 1.6 se expresan en el SNC de humanos y roedores (Black *et al.*, 1994; Duflocq *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 1987; Maier *et al.*, 2003; Westenbroek *et al.*, 1989; Whitaker *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002). En el SNP  $\text{Na}_v1.1-1.3$  y  $\text{Na}_v1.5-1.9$  (Bao 2015; Chang *et al.*, 2017; Kerr *et al.*, 2007) se distribuyen en roedores y en humanos, además se tiene registrado la expresión de  $\text{Na}_v1.4$  en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) en humanos (Li y Chen, 2018). Dentro del SNP, en el GRD,  $\text{Na}_v1.7$  y 1.9 tienen la mayor expresión en humanos (Li y Chen, 2018),  $\text{Na}_v1.7$  en ratas y  $\text{Na}_v1.8$  en ratones (Chang *et al.*, 2017), mientras que, en las motoneuronas de ratón, la expresión se tiene registrada en  $\text{Na}_v1.1$ , 1.6 y 1.7 (Alles *et al.*, 2020; Duflocq *et al.*, 2008), y  $\text{Na}_v1.1$  en ratas (Westenbroek *et al.*, 1989). En el músculo cardíaco,  $\text{Na}_v1.5$  tiene la mayor expresión en humanos y roedores, pero también están presentes  $\text{Na}_v1.1-1-4$ , donde estos subtipos de canales están más expresados en ratón que en rata y humano (Blechs Schmidt *et al.*, 2008).

**Tabla I.** Localización y expresión de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Isoforma subunidad $\alpha$	Localización predominante en general	Expresión en músculo cardíaco			Expresión en SNC			Expresión en SNP		
		Humano	Ratón	Rata	Humano	Ratón	Rata	Humano	Ratón	Rata
Na <sub>v</sub> 1.1	SNC, SNP	+	+	+	+++	+++	+++	+	+*	+*
Na <sub>v</sub> 1.2	SNC	+	++	+	+++	+++	+++	+	+	+
Na <sub>v</sub> 1.3	SNC (embrionario)	+	++	+	+++	+++	+++	+	+	+
Na <sub>v</sub> 1.4	Músculo esquelético	+	++	+				+**		
Na <sub>v</sub> 1.5	Músculo cardíaco	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
Na <sub>v</sub> 1.6	SNC, SNP				+++	+++	+++	+	+*	+
Na <sub>v</sub> 1.7	SNP							+++**	+** +*	+++** -*
Na <sub>v</sub> 1.8	SNP							+	+++**	+
Na <sub>v</sub> 1.9	SNP							+++**	+	+

Nota: SNC: Sistema Nervioso Central, SNP: Sistema Nervioso Periférico, +++: mayor expresión, ++: más expresión, +: presencia, -: ausencia, \*\*: en ganglio de la raíz dorsal (GRD), \* en motoneuronas.

En la estructura neuronal,  $Na_v1.1$  se expresa en el soma neuronal y las dendritas.  $Na_v1.2$  se expresa en los axones, específicamente en los nodos de Ranvier cuando se forman inicialmente (Boiko *et al.*, 2001; Westenbroek *et al.*, 1989).  $Na_v1.3$  registra los niveles más altos en el cerebro embrionario y postnatal temprano.  $Na_v1.3$  sólo se ha registrado en el cerebro humano con una localización somatodendrítica, similar a  $Na_v1.1$  (Whitaker *et al.*, 2001).  $Na_v1.6$  se encuentra en el soma y las dendritas proximales (Caldwell *et al.*, 2000; Krsemien *et al.*, 2000). También se encuentra en los segmentos iniciales del axón (SIA) (Boiko *et al.*, 2003), sin embargo, en neuronas adultas con axones mielinizados (Boiko *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2000),  $Na_v1.6$  se co-expresa o no con  $Na_v1.1$  en los nodos de Ranvier del SNC y SNP.  $Na_v1.6$  se distribuye exclusiva y uniformemente a lo largo del SIA en las células de Purkinje (Lorincz y Nusser 2008; Van Wart y Matthews 2006<sub>a</sub>) y se co-expresa con  $Na_v1.1$  en el SIA en interneuronas corticales y cerebelosas (Duflocq *et al.*, 2008, Lorincz y Nusser 2008; Ogiwara *et al.*, 2007, Van Wart *et al.*, 2007). En estas células,  $Na_v1.1$  y 1.6 muestran una localización complementaria, donde  $Na_v1.1$  se distribuye en el SIA proximal, mientras que  $Na_v1.6$  se acumula en el SIA distal (Duflocq *et al.*, 2008; Lorincz y Nusser 2008, Van Wart y Matthews 2006<sub>b</sub>).  $Na_v1.2$  se co-expresa a lo largo del SIA con  $Na_v1.6$  en células piramidales de la neocorteza con el mismo patrón complementario entre  $Na_v1.1$  y  $Na_v1.6$ . (Hu *et al.*, 2009)  $Na_v1.5$  se ha localizado en axones en el cerebro del ratón. Otros  $Na_v$  ( $Na_v1.4$  y  $Na_v1.7$ ) no parecen expresarse apreciablemente en las neuronas centrales de los mamíferos (Wu *et al.*, 2002).

**Tabla II.** Distribución de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje en la estructura neuronal del sistema nervioso central.

Isoforma subunidad $\alpha$	Soma neuronal	Dendritas	SIA proximal	SIA Distal	Nodos de Ranvier
$Na_v1.1$	+	+	+		+
$Na_v1.2$			+		
$Na_v1.3$	+	+			
$Na_v1.5$					
$Na_v1.6$	+	+		+	+

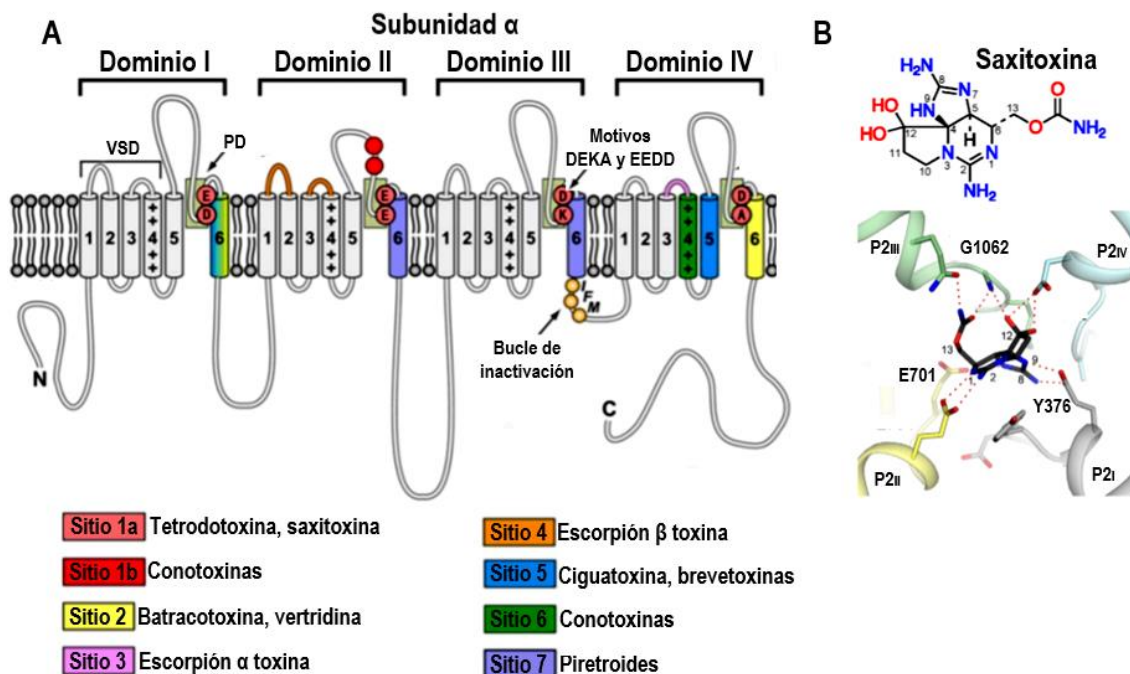
Nota: SIA: segmento inicial del axón, +: presencia.

### 2.3. Interacción de los canales de sodio dependientes de voltaje con la saxitoxina

Los estudios farmacológicos con neurotoxinas identificaron seis sitios receptores clave dentro de los VGSC; por lo tanto, los mecanismos moleculares de las neurotoxinas se pueden clasificar ampliamente en uno de tres grupos según su sitio receptor y efecto funcional. El sitio de unión para las toxinas de guanidinio se encuentra en la subunidad  $\alpha$  (Fig. 2A), específicamente en el vestíbulo externo, una región formada por los cuatro conectores P, que se denomina el sitio de unión 1. La afinidad de estas toxinas en el VGSC es 1:1; esto significa que una molécula se une por canal iónico, bloqueándolo total o parcialmente (Cusick y Sayler, 2013).

El reconocimiento de la STX (Fig. 2B) incluye los grupos funcionales 1,2,3- y 7,8,9-guanidinio, los hidroxilos del carbono 12 (C12-OH) y el grupo 13-carbamoilo. Los residuos polares y cargados de los cuatro dominios que se colocan en la entrada exterior del SF forman interacciones con los grupos funcionales de la STX. Los residuos ácidos en el primer giro helicoidal del conector del poro 2 (P2) en cada dominio, que en conjunto constituyen el anillo electronegativo externo, proporcionan el sitio de acoplamiento primario para STX. Los grupos 1,2,3 y 7,8,9-guanidinio están unidos respectivamente a los residuos del glutamato invariantes en la hélice P2 en los dominios I y II, mientras que los grupos carbamoilo y C12-OH están coordinados por grupos polares en el dominio III y el aspartato invariante en el dominio IV, respectivamente. La tirosina (Tyr376) en el dominio I contribuye a la coordinación de la toxina a través de la interacción  $\pi$ -catión con el grupo 1,2,3-guanidinio de STX. El oxígeno del carbonilo en el grupo carbamoilo y un C12-OH adyacente están unidos por hidrógeno a la amida del esqueleto de la glicina invariante (Gly1062) en el dominio III. El residuo de glutamato (Glu701) en el motivo DEKA en el dominio II forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno en la posición 7 de STX (Shen *et al.*, 2018).





**Figura 2.** A) Diagrama de la estructura molecular de la subunidad  $\alpha$  del VGSC donde se muestran los cuatro dominios, cada uno con sus 6 segmentos  $\alpha$  hélice; el dominio sensor de voltaje (VSD); el dominio del poro (PD), el bucle de inactivación (IFM); los motivos DEKA y EEDD del filtro de selectividad (SF); y los sitios farmacológicos de unión a diferentes toxinas (Tomado y modificado de Zhang *et al.* 2013). B) Estructura química de la STX y su interacción con el VGSC en el área del SF descrito en el documento (Tomado y modificado de Shen *et al.*, 2018).

#### 2.4. Afinidad de la saxitoxina por las isoformas de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje

Está ampliamente aceptado que las toxinas paralizantes son inhibidores nanomolares selectivos de seis de nueve isoformas ( $\text{Na}_v1.1-1.4$ , 1.6 y 1.7) expresadas en células de mamíferos (Caterall *et al.*, 2005; Lee y Ruben, 2008; Walker *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, existe un dato sobre que el  $\text{Na}_v1.7$  no es bloqueado por las PST (Walker *et al.*, 2012), que se debe a un reemplazo de aminoácido de aspartato con una isoleucina. Por la razón anterior, es que la afinidad de la STX en los canales de  $\text{Na}^+$  controlados por voltaje puede ser variable dependiendo de las isoformas presentes en el modelo de estudio.

**Tabla III.** Afinidad de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje por la STX

Isoforma subunidad $\alpha$	Afinidad por la STX
Na <sub>v</sub> 1.1	+
Na <sub>v</sub> 1.2	+
Na <sub>v</sub> 1.3	+
Na <sub>v</sub> 1.4	+
Na <sub>v</sub> 1.5	-
Na <sub>v</sub> 1.6	+
Na <sub>v</sub> 1.7	-*
Na <sub>v</sub> 1.8	-
Na <sub>v</sub> 1.9	-

Nota: +: afinidad, -: no afinidad, \*: en humanos

## 2.5. Toxicidad de la saxitoxina

La STX es el compuesto más potente de un grupo de más de 50 tetrahidropurinas conocidas (Thottumkara *et al.*, 2014; Wiese *et al.*, 2010), ya que tiene la mayor afinidad por el canal de Na<sup>+</sup>. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de STX depende de la especie animal, la edad y la vía de administración. En humanos, la DL<sub>50</sub> varía de 1-4 mg según su edad y el estado físico (Lawrence *et al.*, 2011). La inyección i.p. de STX en ratas causa una DL<sub>50</sub> de 10–12 µg/kg de STX y de 9–10 µg/kg de STX en ratones; por vía oral, la DL<sub>50</sub> es aproximadamente 300 a 900 veces menor que la inyección i.v., dependiendo de la especie experimental utilizada; y la inyección s.c. en ratones es equipotente a la DL<sub>50</sub> de la inyección i.p. (Tabla I) (Suarez-Isla, 2015).

A dosis letales cuando se inyecta i.p. cualquier PST en un ratón, este se vuelve letárgico min después de la inyección, con respiración abdominal rápida y arresto conductual; la respiración se vuelve irregular y la tasa de respiración disminuye, finalmente las tasas de espiración continúan disminuyendo hasta que la respiración cesa por completo. La exoftalmia y la cianosis también se observan poco antes de la muerte, lo que ocurre dentro de los 20 min posteriores a la administración de la dosis. A dosis subletales, los ratones se vuelven letárgicos, con respiración abdominal, y a dosis cercanas a la DL<sub>50</sub>, también se observa una disminución en la frecuencia respiratoria (Selwood *et al.*, 2017).

**Tabla IV.** Valores de toxicidad ( $DL_{50}$ ) en vertebrados para STX administrados por diferentes vías: (i.m.) intramuscular; (i.p.) intraperitoneal; (i.v.) intravenosa; (o.) oral; (s.c.) subcutánea. Los valores de  $DL_{50}$  se muestran en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y  $\text{nmol}/\text{kg}$ .

Animal	Vía de administración	$DL_{50}$	$DL_{50}$ (nmol/kg)
Humano	o.	1-4 mg/kg	3322-13289
Gato	o.	254 $\mu\text{g}/\text{kg}$	844
Perro	o.	181 $\mu\text{g}/\text{kg}$	601
Pollo	i.v.	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1
Paloma	o.	91 $\mu\text{g}/\text{kg}$	302
Conejillo de indias	o.	135 $\mu\text{g}/\text{kg}$	449
	i.p.	8 – 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	26 – 33
	i.v.	3.4 – 8.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	11 – 28
Ratón	s.c.	13 $\mu\text{g}/\text{kg}$	43
	o.	263 $\mu\text{g}/\text{kg}$	874
	i.v.	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1
Conejo	o.	181 $\mu\text{g}/\text{kg}$	601
	i.p.	10.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	35
Rata	i.m.	7 $\mu\text{g}/\text{kg}$	23
	o.	192 $\mu\text{g}/\text{kg}$	638

Nota: Tomado y modificado de Llewellyn (2006) y Suarez-Isla (2015).

## 2.6. Toxicocinética de la saxitoxina

### 2.6.1. Distribución

Los estudios sobre la distribución sistémica de STX se limitan a evaluar animales después de la administración i.v. o i.p. y demostraron una distribución a una variedad de tejidos, incluido el SNC. En gatos machos adultos anestesiados y acoplados permanentemente a ventilación artificial, se inyectaron por vía i.v. dosis baja (2.7 µg/kg de STX) y alta (10 µg/kg de STX) de toxina. Con la dosis más alta de toxina se encontraron niveles de ng/g de STX en el hígado, bazo y SNC después de 4 h (Andrinolo *et al.*, 1999).

La administración i.v. en ratas Wistar macho de una sola dosis de saxitoxinol radiomarcado con tritio [<sup>3</sup>H]-STXOL, un análogo de STX, a ratas Wistar, permitió identificar que se distribuyó rápidamente en la mayoría de los tejidos, incluido el cerebro, con un máximo de radioactividad ocho horas después de la administración. En el hígado y el tracto gastrointestinal, la radioactividad fue baja durante la fase temprana después de la dosis y fue más alta 24 h después, lo que sugiere una vía alternativa de eliminación y excreción a la de la orina (Naseem, 1996).

También se evaluó la administración i.p. de STX en ratas machos (150–200 g). Se inyectó una dosis baja de 5 µg/kg (aproximadamente 0.5 ml de suspensión) y una dosis alta de 10 µg/kg (aproximadamente 1 ml de suspensión de STX). Después de tres intervalos de tiempo de 30, 60 y 120 min (para la dosis de 5 µg/kg de STX), el contenido total de STX en todo el cerebro con la dosis de 5 µg/kg fue de 0.53, 0.76 y 1.33 ng/ml a los 30, 60 y 120 min, respectivamente. Cuando se aplicó la dosis de 10 µg/kg de STX y se evaluó 30 min después, el contenido total de STX fue 3.61 ng/ml (Cianca *et al.*, 2007). Estos estudios mostraron que una parte de STX administrada puede cruzar la barrera hematoencefálica y producir algunas alteraciones en el SNC, independientemente de los efectos producidos en el SNP, y hay una distribución más rápida cuando la dosis de STX es mayor.

### 2.6.2. Metabolismo

En eventos de envenenamiento por mariscos en Alaska, el perfil de PST difirió entre mejillones y muestras biológicas humanas, que se relacionó al metabolismo humano. Un aumento significativo del análogo C1 en comparación con GTX2 sugirió que se había producido sulfatación del grupo carbonilo (Gessner *et al.*, 1997). Sin embargo, el sulfato de la toxina C también puede perderse durante el paso a través de las condiciones ácidas del estómago (Aune, 2001; Negri *et al.*, 1995). En los microsomas hepáticos humanos, se descubrió que la STX, NEO y GTX2/3 estaban oxidados en el nitrógeno de la posición 1 (N1) y/o glucuronidados en el C12-OH (García *et al.*, 2009, 2010).

Los gatos carecen de glucuronil transferasas, lo que ayuda a explicar por qué Andrinolo *et al.* (1999, 2002) no detectaron metabolitos en gatos tratados con PST por vía oral. Si bien la glucuronidación facilitaría la excreción, se esperaría que al menos dos de estas interconversiones (pérdida de sulfato de toxinas C y oxidación de N1 de STX) aumenten la potencia de las PST (Munday *et al.*, 2013; Testai *et al.*, 2016). La falta de biotransformación de PST encontrada en ese estudio es consistente con el hallazgo de Andrinolo *et al.* (1999, 2002), quienes encontraron que STX y GTX 2/3 no se convertían a otros PST.

En ratas (peso corporal aproximado de 195 g) con administración de 3.8 µg/kg i.v. de [<sup>3</sup>H]-STXOL, se encontraron diferentes porcentajes de radiactividad en metabolitos no identificados en diversos tejidos (riñón, pulmones, corazón, cerebro y médula espinal). Después de 48 h, el 75% de la actividad en estos tejidos se asoció con metabolitos no identificados. En el SNC, 10 min después de la exposición, la radioactividad con el 68% en el cerebro y 62% en la médula espinal, misma que se asoció con el STXOL original y el 32% de la actividad se asoció con metabolitos no identificados en el cerebro y el 37% en la médula espinal (Naseem, 1996).

### 2.6.3. Excreción

En los gatos con una dosis oral única de GTX2/3, el 23% de la dosis se excretó en la orina después de 5 h, mientras que no se detectó toxina en la bilis (Andrinolo *et al.*, 2002). La tasa de depuración indicó la filtración glomerular como el principal mecanismo de excreción. Por vía i.v., dosis de 2.7 o 10 µg/kg de STX, se excretaron sólo por orina; dentro de 4 h, el 25% de la dosis de 2.7 µg/kg y el 10% de la dosis de 10 µg/kg. (Andrinolo *et al.*, 1999).

En ratas (peso corporal aproximado de 195 g) una dosis de 3.8 µg/kg vía i.v. de [<sup>3</sup>H]-STXOL se excretó el 40% de la dosis en orina en 2 horas y el 80% después de 48 h. A pesar de la evidencia del metabolismo extenso de STXOL en muchos tejidos, no se detectaron metabolitos en la orina (Naseem, 1996).

Otro estudio mostró después de la administración i.v. de STX marcada radiactivamente a una dosis de aprox., de 2 µg/kg, existe una rápida excreción en la orina en ratas. No se detectó radiactividad en las heces en ningún momento. Cuatro horas después de la inyección, aproximadamente el 19% de la dosis de STX se excretó en la orina. A las 24 horas, aproximadamente el 58% de la dosis administrada fue excretada. La excreción urinaria total promedio de la dosis administrada fue de aprox. el 68% durante todo el período de estudio, con pequeñas cantidades de STX no metabolizada aún detectable en la orina hasta 144 h después de la exposición a ésta (Aune, 2001).

En un último estudio realizado en ratas (peso corporal aproximado de 195 g) y a las que se les inyectó una dosis de 3.8 µg/kg de [<sup>3</sup>H]-STXOL vía i.v., no se detectó radiactividad en las heces en ningún momento. A las 4 h después de la inyección, el 60% de la sustancia radiactividad inyectada se excretó en la orina. Después, la eliminación rápida de la orina se ralentizó por 48 h, y se excretó una radioactividad adicional insignificante durante el resto del experimento, que se terminó a las 144 h. Aproximadamente el 72% de la dosis inyectada se excretó por 144 h, mientras que el 28% permaneció en los tejidos (Hines *et al.*, 1993).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe una gran diversidad de FAE enfocados a limitar la actividad de las crisis epilépticas a través de diferentes blancos moleculares como son los VGSC y VGCC; los receptores GABA<sub>A</sub>; y los receptores NMDA, AMPA y kainato. Los FAE están enfocados en reducir el impulso nervioso y la neurotransmisión excitadora, potenciar la neurotransmisión inhibitoria y así evitar la propagación de las crisis epilépticas. Sin embargo, a pesar de la gran variedad de FAE, estos presentan efectos adversos desde leves hasta graves o crónicos que están relacionados con el mecanismo de acción conocido del fármaco; con la vulnerabilidad individual, como el mecanismo inmunológico, genético u otro; con la dosis acumulativa del fármaco; con la exposición prenatal; o con interacciones farmacológicas. Los efectos debido a la acción del fármaco más representativos de los FAE incluyen somnolencia, fatiga, mareos, inestabilidad, visión borrosa o doble, dificultad para concentrarse, problemas de memoria, irritabilidad y depresión. Por lo tanto, la búsqueda de mejor eficacia y tolerabilidad sigue siendo un objetivo importante. Debido a lo anterior, en este estudio se propuso evaluar a la STX como alternativa a los FAE convencionales para evitar o disminuir la actividad de las crisis epilépticas, disminuyendo la hiperexcitabilidad neuronal y así evitar la activación y propagación del potencial de acción desde el SNC al músculo esquelético, ya que el modo de acción principal es el bloqueo específico del poro del canal de las isoformas Na<sub>v</sub> 1.1–1.4 y 1.6 de la subunidad  $\alpha$  de los VGSC, los cuales juegan un papel importante en la excitabilidad neuronal en el SNC, SNP y el músculo esquelético.

#### **4. HIPOTESIS**

Si la STX llega a cerebro, entonces evita o retrasa la aparición de crisis epilépticas generalizadas inducidas por el PTZ en ratones CD-1.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo General**

Evaluar si la STX tiene un efecto antiepiléptico contra las crisis epilépticas generalizadas, administrando PTZ en ratones CD-1

##### **5.2. Objetivos Particulares**

- Evaluar el efecto antiepiléptico de cinco dosis subletales y una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de STX.
  
- Comparar el efecto antiepiléptico de las dosis efectivas de STX con el efecto antiepiléptico de la FNT (fármaco de referencia).
  
- Identificar y cuantificar la STX en cerebros de ratones CD-1 mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente en línea (HPLC-FLD).



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de ratones CD-1

Ratones albinos suizos macho CD-1 (ICR), libres de patógenos, se obtuvieron de HARLAN de México (actualmente ENVIGO S.A. de C.V. con sede en la UNAM, Ciudad de México), los cuales fueron transportados vía aérea en cajas desechables de transporte (con filtros HEPA) de animales de experimentación (modelo ratón), con suministro de agua en hidrogel, lecho de cama estéril y alimento pelletizado.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., en donde se tiene permitido realizar ensayos agudos con toxinas marinas en modelo murino (ratón albino cepa CD-1, ENVIGO S.A. de C.V.). Todos los animales se mantuvieron en adaptación y crecimiento (de  $13\pm 1$  g a  $20\pm 1$  g) en jaulas convencionales de mantenimiento de ratones de experimentación, las cuales previamente fueron esterilizadas. Los ratones contaron con suministro de lecho de cama ASPEN Shavings de NEPCO y alimentación de 4 g de pellets/por ratón/por día con pellets formulados y estériles (Zeigler), así como agua acidificada con HCl 0.1 N a pH 3, estéril, *ad libitum*.y se mantuvieron con estándares de confort a una temperatura de  $22\pm 1$  °C, con ciclos luz/oscuridad (12:12 y máximo de 60% de humedad), de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### 6.2. Obtención de compuestos químicos

La solución estándar de dihidrocloruro de STX, certificada por la FDA (Cat. No. RM8642, National Institute of Standards and Technology), fue proporcionada por el laboratorio de Análisis de Toxinas Marinas y Aminoácidos, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La solución de trabajo se ajustó con agua acidificada con HCl 0.1 N a pH 3 (a partir de una solución stock de 1 µg/ml). El PTZ se adquirió de Sigma Aldrich Co. (Cat. No. P6500, St Louis, MO, EE. UU.). La FNT se obtuvo del fármaco comercial Epamin® de Pfizer (Fenitoína sódica, Cápsulas 100 mg).

El PTZ y la FNT se disolvieron en solución salina estéril (NaCl 0.9%; ss.) obteniendo las soluciones stock de 10 mg/ml.

### **6.3. Dosis utilizadas de saxitoxina, fenitoína y pentilentetrazol**

Las dosis subletales se determinaron por medio de ensayo en ratón (AOAC 959.08), a partir de la  $DL_{50}$  reportada en la literatura que es de 9-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX (Suarez-Isla, 2015). La dosis subletal más alta fue de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX, a partir de la cual se escogieron las siguientes dosis subletales: 7.5, 6, 3.8 y 1.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX. Después se decidió evaluar una dosis más alta de 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX, a pesar de ser  $DL_{50}$ . La dosis de PTZ se determinó a partir de evaluar tres dosis: 80, 90 y 100 mg/kg (Yonekawa *et al.*, 1980), y así se determinó la dosis óptima de 100 mg/kg para inducir en orden subsecuente las crisis epilépticas generalizadas mioclónicas, clónicas (CCG) y tónico-clónicas (CTCG). La dosis de FNT se eligió de 50 mg/kg, reportada en la literatura (Löscher, 2007; Oliveira *et al.*, 2001).

### **6.4. Desarrollo experimental**

Previo a los experimentos se llevó a cabo la manipulación de los ratones con una inyección i.p. diaria (10 ml/kg) de solución salina estéril (NaCl 0.9%, ss), comenzando 3 días antes de la administración de FNT, STX, PTZ y/o la solución de los vehículos (en ratones de  $17\pm 1$  g de peso). Antes de cada inyección, fue necesario pesar y marcar a cada ratón en la base de la cola. Una vez que se comenzó el experimento se colocaron los ratones de manera individual en cajas con dimensiones de  $30 \times 15 \times 15$  cm, revestidas con color negro para evitar el estrés. Los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y bajo la supervisión y asesoría del TTC. Erick Núñez Vázquez, responsable del laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos.

#### **6.4.1. Efecto antiepiléptico de cinco dosis subletales y una DL<sub>50</sub> de saxitoxina**

Al cuarto día, posterior a la manipulación inicial, se utilizaron ratones de 20±1 g para los distintos tratamientos. El diseño experimental consistió de los siguientes grupos experimentales: 1) Vehículo de STX + PTZ (control STX); 2) STX 1.9 µg/kg + PTZ; 3) STX 3.8 µg/kg + PTZ; 4) STX 6 µg/kg + PTZ; 5) STX 7.5 µg/kg + PTZ; 6) STX 8.5 µg/kg + PTZ, 7) STX dosis DL<sub>50</sub> (9.5 µg/kg) + PTZ. El bioensayo consistió en inyectar i.p. a cada ratón el vehículo de la STX (agua acidificada con HCl 0.1 N a pH 3; H<sub>2</sub>Oa) o las diferentes dosis de STX, inyectando 0.5 ml de suspensión. Después de 30 min, administraron 100 mg/kg de PTZ (10 ml/kg). Se registró cada uno de los tratamientos mediante grabación de videos con una cámara digital para evaluar los tipos de crisis epilépticas que se presentaron, el porcentaje de ratones que las presentaron, así como, también se utilizaron cronómetros para registrar la latencia a la primera crisis (mioclonus, CCG y CTCG), durante los 30 min posteriores a la inyección del PTZ. Los animales se consideraron protegidos de la acción del PTZ si no se producían crisis epilépticas durante el período de observación.

Transcurridos los 30 min de observación, posterior a la inyección del PTZ, se terminó el experimento y a los ratones se les realizó dislocación cervical como método de eutanasia, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C para posteriormente realizar la disección del cerebro, de acuerdo a los protocolos descritos por Feldman y Seely (1988) y Hedrich (2004). Brevemente, la disección del cerebro consistió en cortar la columna vertebral y la médula espinal en la base del cráneo, retraer la piel del cráneo, hacer dos pequeños cortes longitudinales en el hueso occipital, sujetar el borde del hueso occipital y tirar hacia arriba para separarlo, hacer un corte en el cráneo a lo largo de la sutura sagital y retirar el cráneo, cortar los bulbos olfativos y liberar al cerebro de la bóveda craneal. Los cadáveres de los ratones se guardaron en bolsas amarillas de residuos biológicos-infecciosos y las jeringas utilizadas fueron desechadas en botes rojos de objetos punzocortantes y se entregaron al área de Manejo de Residuos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

#### **6.4.2. Comparación del efecto antiepiléptico de la dosis efectiva de saxitoxina con el de fenitoína**

Para comparar el efecto antiepiléptico de la STX con el de la FNT, primero se evaluó el efecto antiepiléptico de la FNT. El diseño experimental consistió de los siguientes grupos experimentales: 1) Vehículo de FNT + PTZ (control FNT); y (2) FNT 50 mg/kg + PTZ. El bioensayo consistió en inyectar i.p. a cada ratón el vehículo de la FNT (ss.) o la dosis de FNT, inyectando 0.5 ml de la suspensión. Después de 30 min, se administraron 100 mg/kg de PTZ (10 ml/kg). Los tratamientos se registraron mediante grabación de videos para evaluar los tipos de crisis epilépticas que se presentaron, el porcentaje de ratones que las presentaron y utilizando cronómetros, la latencia de la primera aparición de cada crisis, durante los 30 min posteriores a la inyección del PTZ. Una vez transcurridos los 30 min de observación, se dio por terminado el experimento y a los ratones se les realizó dislocación cervical como método de eutanasia, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C para posteriormente realizar la disección del cerebro. La disección de los cerebros y el manejo de residuos se llevaron a cabo como se describió en el apartado 6.4.1.

La comparación del efecto antiepiléptico de la STX y de la FNT se pudo llevar a cabo porque no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los vehículos de ambos compuestos (ss. y H<sub>2</sub>Oa, respectivamente). Para la comparación entre los efectos protectores de la FNT (50 mg/kg) con la STX, se utilizaron los resultados obtenidos con la dosis de 8.5 µg/kg de STX, que en el experimento anterior fue la única dosis mostró un aumento en la latencia del mioclonus.

## **6.5. Análisis estadístico**

### **6.5.1. Porcentaje de ratones que presentan cada crisis epiléptica**

Para comparar el porcentaje de ratones que presentaron cada crisis epiléptica en los grupos control (vehículo) y los tratamientos (n=10 para cada caso) se empleó la prueba exacta de Fisher, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22. Se determinó una diferencia significativa para los valores  $p < 0.05$ .

### **6.5.2. Latencia a la aparición de la primera crisis epiléptica**

Los datos se representan con la mediana de la latencia de la primera aparición de cada crisis (n=10), los cuartiles del 25 y 75% y los valores mínimo y máximo. Las comparaciones entre el vehículo y los grupos de tratamiento se realizaron con un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post hoc de Dunn's con corrección de Bonferroni, utilizando el programa GraphPad Prism 8.4.2. Se determinó una diferencia significativa para los valores  $p < 0.05$ .

## **6.6. Identificación y cuantificación de la saxitoxina en los cerebros de los ratones por cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente**

Los cerebros se homogeneizaron con nitrógeno líquido y se les adicionó ácido acético 0.03 N (una relación aproximada de muestra 1:2 de ácido acético), la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm, por 30 min a  $-4^{\circ}\text{C}$ , y el sobrenadante se filtró en acrodiscos para jeringa de 0.45 micras de tamaño de poro y se colocó en viales para HPLC de 2 ml, donde se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Las muestras se analizaron mediante HPLC-FLD con oxidación post-columna (Hummert *et al.*, 1997, modificado por Yu *et al.*, 1998). La técnica consistió en inyectar 20  $\mu\text{l}$  de los extractos en el cromatógrafo para la identificación y cuantificación de STX. La cromatografía se llevó a cabo en el cromatógrafo HP 1260 Infinity II compuesto por un automuestreador, 1 bomba

cuaternaria con desgacificador integrado, 2 bombas isocráticas con desgacificador integrado para las reacciones post-columna, detector de fluorescencia, un reactor post-columna, y una fase estacionaria Luna 5 micras C-18(2) 100Å de 250 por 4.6 mm. Para separar las toxinas el método consta de 3 soluciones, compuesto de una solución de 1.1 mM de ácido octanosulfónico y 40 mM de ácido fosfórico ajustando el pH a 6.9 con fosfato de amonio en 15% de tetrahidrofurano, a una tasa de flujo de 1 ml/min. Después, las fracciones eluidas se mezclaron con ácido peryódico 10 mM (flujo de 0.3 ml/min), y calentadas a 50°C haciéndolas pasar por un tubo de teflón (0.2 mm/día, 10 m de longitud), para después ser mezcladas con ácido nítrico 1 M (flujo de 0.3 ml/min). Los productos resultantes se detectaron con un detector de fluorescencia (HP 1116) a una longitud de onda de 330 nm (excitación) y de 395 nm (emisión). La identificación y cuantificación de la STX se llevó a cabo comparando el área de los picos del cromatograma obtenidos de los diferentes tratamientos con el estándar de la STX (National Research Council, Halifax, NS, Canadá).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Efecto antiepiléptico de cinco dosis subletales y una $DL_{50}$ de saxitoxina

Las crisis epilépticas que se presentaron consecutivamente al inyectar en los ratones 100 mg/kg de PTZ, fueron el mioclonus, la crisis clónico generalizada (CCG) y la crisis tónico clónico generalizada (CTCG). El comportamiento de las crisis epilépticas comenzó con estiramiento abdominal y la cola erguida (cola de Straub), seguido por espasmos mioclónicos fuertes. La CCG se caracterizó por movimientos musculares repetitivos y rítmicos de las extremidades anteriores, donde los ratones permanecían tendidos sobre su vientre y a menudo con las extremidades anteriores alzadas como una posición de un canguro, aunque también había ratones que perdían el equilibrio. La CTCG consistió en una fase clónica, que inició como se describió previamente, y continuó con pérdida de equilibrio, al estar los ratones tendidos sobre un lado. La CTCG continuó con “wild jumping”, donde los ratones daban saltos para terminar con la fase tónica, con extensión o contracción clónica de las extremidades anteriores y con extensión tónica de las extremidades posteriores, siendo esta última crisis, letal.

En algunos casos, los ratones se recuperaron de la fase tónica en la CTCG, sin embargo, los ratones permanecían tendidos de lado presentando “wild running”, es decir que las extremidades las movían sin control simulando como si los ratones corrieran, y más posteriormente presentaban “wild jumping” que podía derivar en una última fase tónica mortal o derivar en status epilepticus (SE, no fue evaluado en el experimento). El SE fue evidente en algunos ratones con las dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

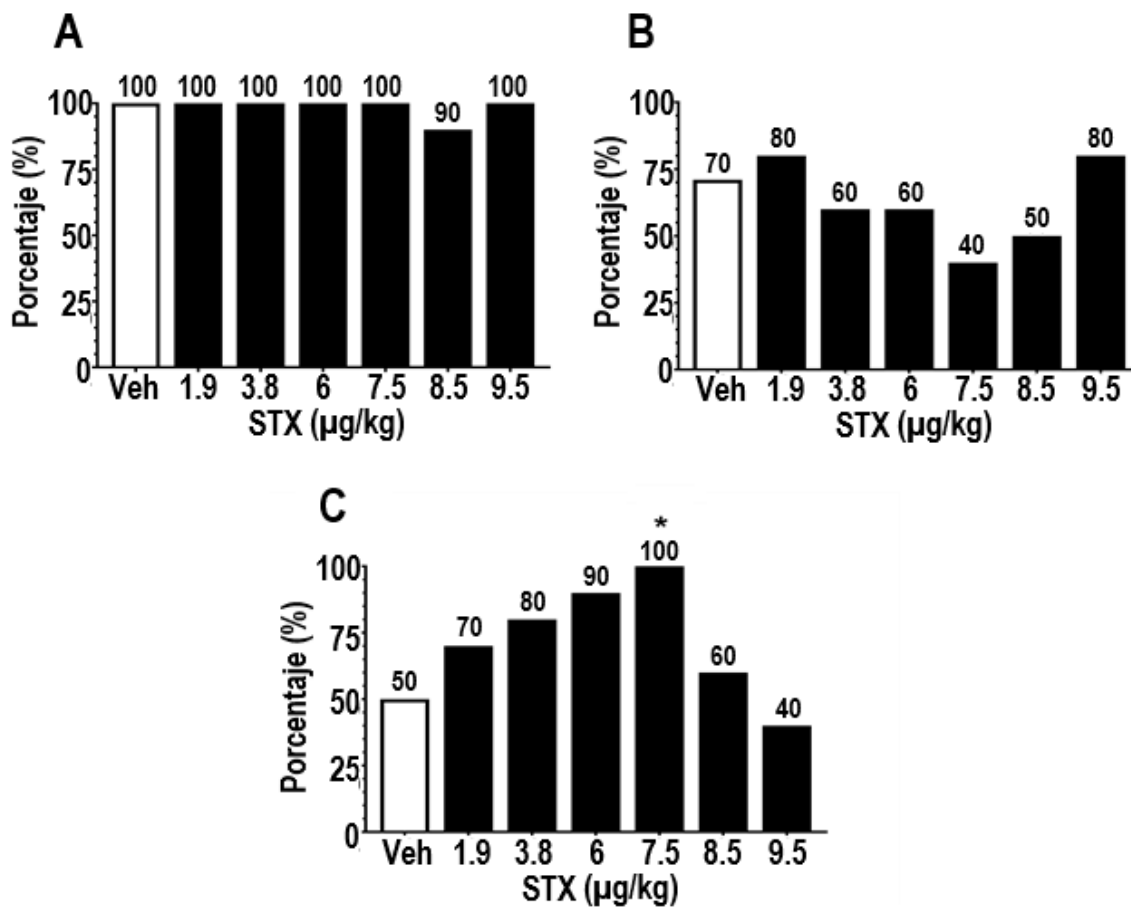
La Figura 3 muestra el porcentaje de ratones que presentaron cada crisis. El mioclonus se presentó del 90–100% en los ratones en todos los tratamientos y no hubo diferencia con respecto al vehículo (Fig. 3A). En la CCG conforme aumenta la dosis, el porcentaje de ratones que la presentan va disminuyendo hasta un 30% con la dosis de 7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y a partir de esta dosis con las dosis mayores de 8.5 y 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX el porcentaje de aparición vuelve aumentar (Fig. 3B). Cabe señalar que el porcentaje de aparición de la

CCG se relaciona inversamente proporcional con el porcentaje de la CTCG (Fig. 3C), en donde las dosis que disminuyen el porcentaje en la CCG, aumentan el porcentaje en la CTCG, llegando a aumentar hasta un 50% en la aparición de la crisis CTCG con la dosis de 7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mostrando una diferencia estadística significativa a esta concentración respecto al vehículo ( $p < 0.05$ ).

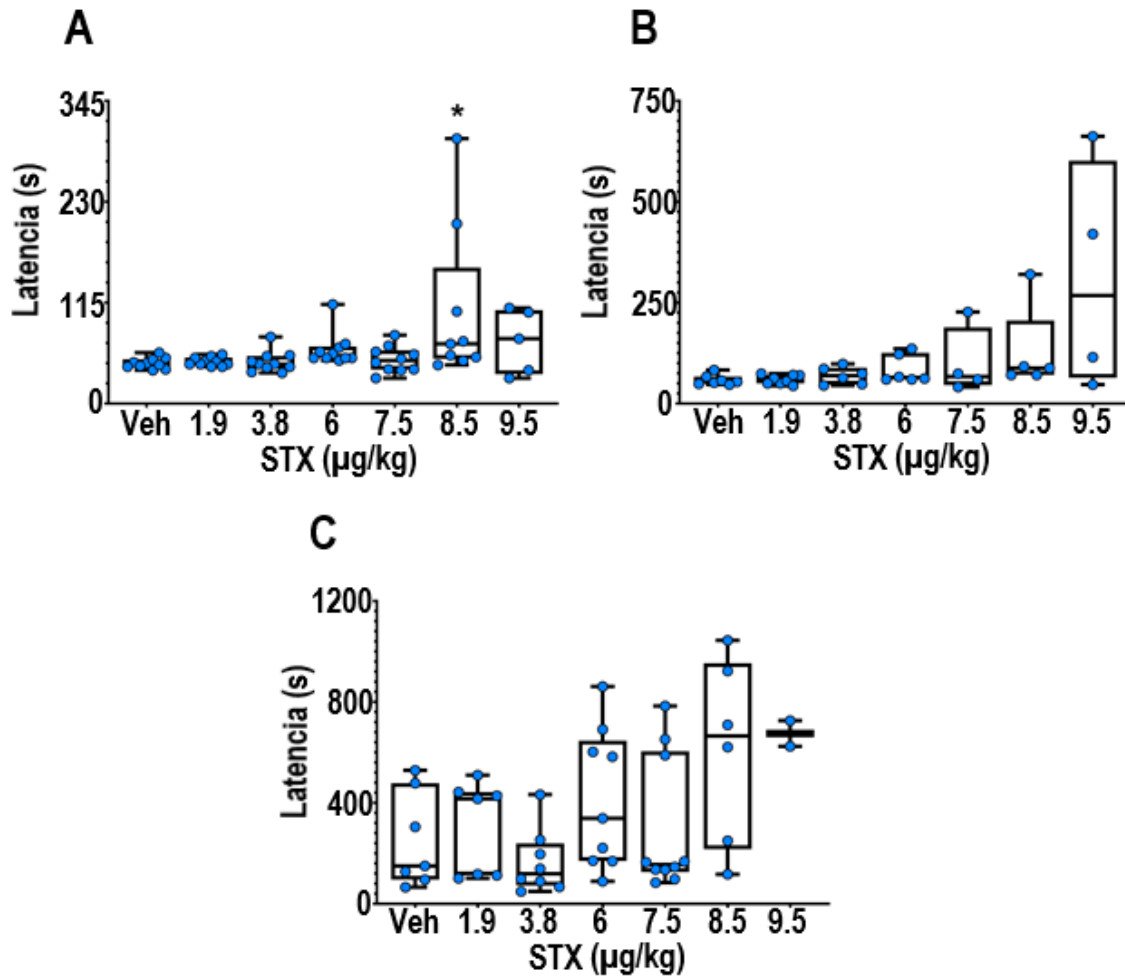
La Figura 4 muestra la latencia a la aparición de la primera crisis. Sólo en el mioclonus se registró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con la dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con respecto al vehículo, aumentando la mediana de la latencia de 45 a 68 s (Fig. 4A), sin embargo, no hubo diferencias en la latencia con la CCG (Fig. 4B) y CTCG (Fig. 4C). De acuerdo a los resultado anteriores, se decidió probar la dosis de 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aunque fuera una dosis  $DL_{50}$  (haciendo énfasis en que se inyectaron 10 ratones con esta dosis, que al ser  $DL_{50}$ , el 50% de los ratones presentaron mortalidad y el 50% restante que sobrevivió fue al que se le inyectó PTZ; es decir, que con esa dosis sólo se evaluaron las crisis en 5 ratones), sin embargo, a pesar de ser mayor la dosis no fue estadísticamente significativa con respecto al vehículo en ninguna de las crisis. En este caso de la latencia, contrario al porcentaje no hubo relación entre la CCG y la CTCG.

De acuerdo a los resultados anteriores, sólo la dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fue efectiva para aumentar la latencia en el mioclonus, por lo que se decidió evaluar las dosis de 3.8 y 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  inyectando el PTZ 15 min después de las dosis correspondientes, en vez de 30 min como se había manejado el experimento anterior con las 6 dosis de STX. Este experimento se realizó con la finalidad de que la STX llegara al cerebro con mínima metabolización, ya que Naseem (1996) reportó metabolismo en el cerebro a los 30 min; y observar si había un cambio en los resultados obtenidos, pero no hubo diferencia significativa en el porcentaje de ratones que presentaron las crisis (datos no mostrados) y la evaluación de la latencia no se pudo llevar a cabo debido al pequeño tamaño de muestra ( $n < 5$ ), ya que el análisis fue poco confiable.  $\mu$





**Figura 3.** Porcentaje (%) de ratones que presentan las crisis epilépticas: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; a diferentes dosis de STX ( $\mu\text{g}$  STX/kg peso ratón), en ratones CD-1 ( $20 \pm 1$  g). El vehículo (veh) o las diferentes dosis de STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). El asterisco denota diferencia estadística significativa de las dosis administradas con respecto al vehículo (control) ( $p < 0.05$ ).



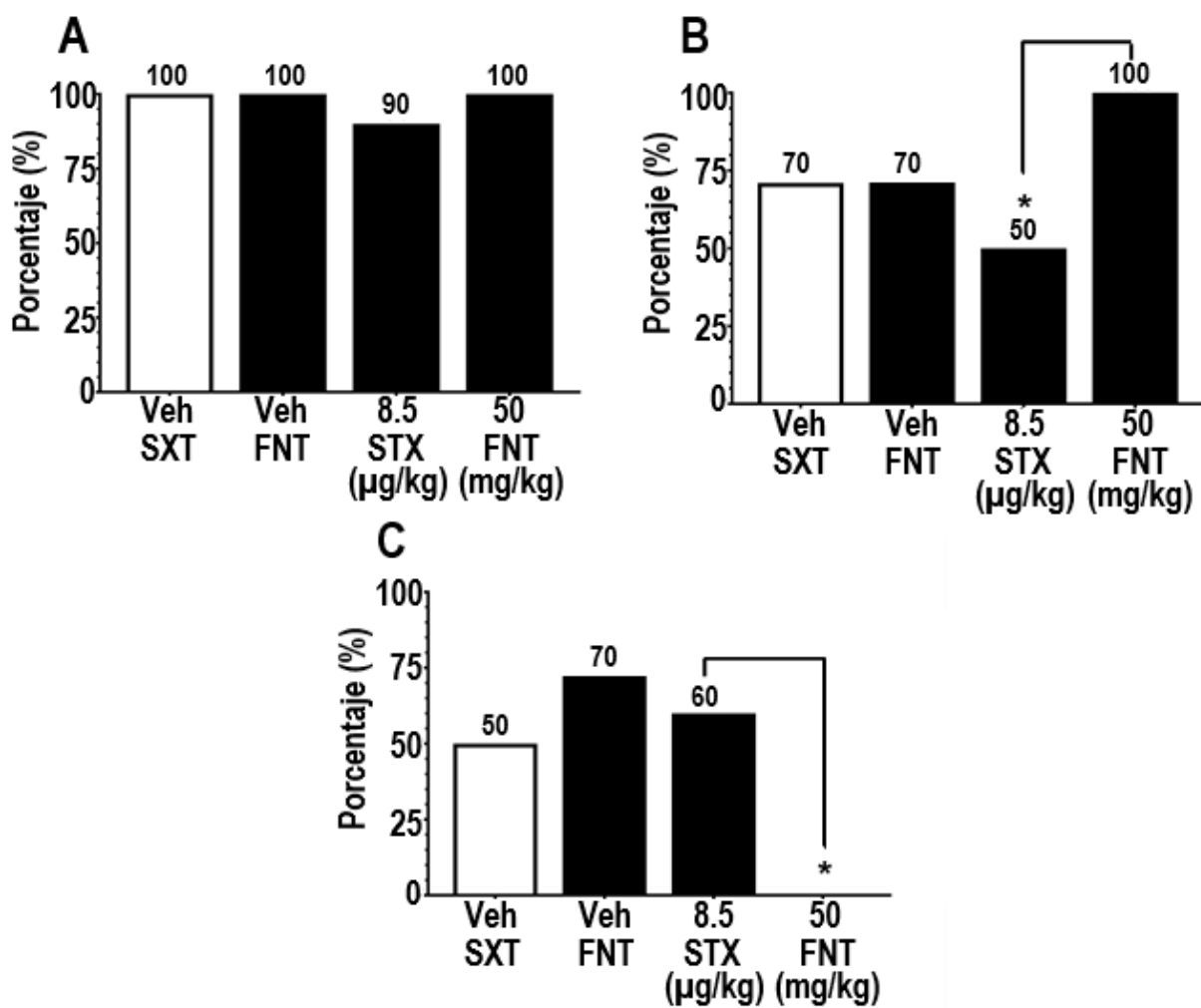
**Figura 4.** Latencia (segundos) a la aparición de la primera crisis epiléptica: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con diferentes dosis de STX ( $\mu\text{g}$  STX/kg peso ratón), en ratones CD-1 ( $20 \pm 1$  g). El vehículo (veh) o las diferentes dosis de STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). Los datos se representan con un círculo y se muestran la mediana, los cuartiles del 25 y 75% y los valores mínimo y máximo. El asterisco denota diferencia estadística significativa de las dosis administradas con respecto al control (vehículo) ( $p < 0.05$ ).

## 7.2. Comparación del efecto antiepiléptico de la dosis efectiva de saxitoxina con el de la fenitoína

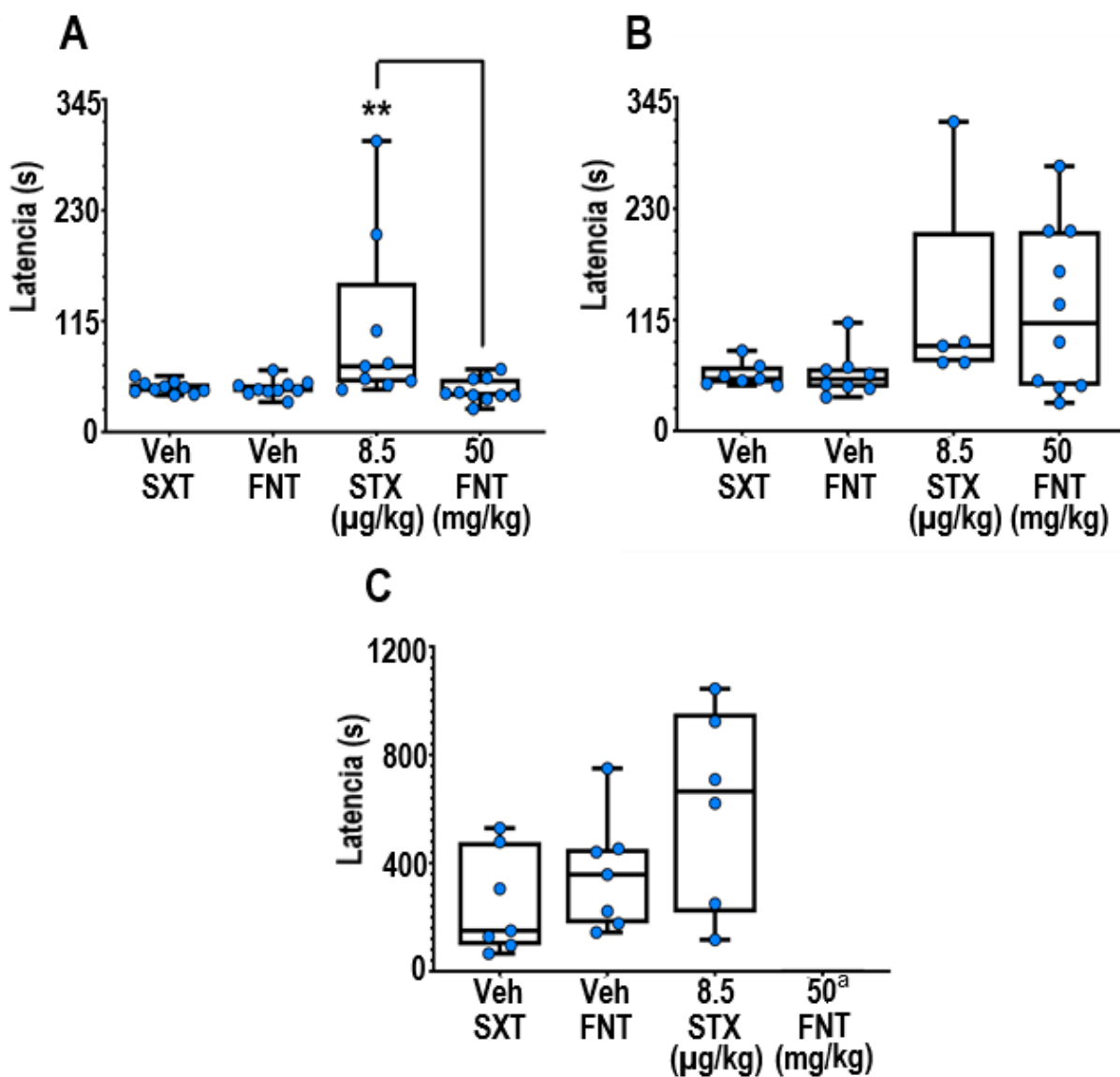
Para comparar el efecto antiepiléptico con la FNT se compararon los resultados obtenidos con la dosis de 8.5 µg/kg de STX mostrados en las Figuras 3 y 4. En el porcentaje de los ratones que presentaron la CCG (Fig. 5B), hubo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del 50% con la dosis de 8.5 µg/kg de STX, respecto a la FNT. Sin embargo, la FNT resultó ser efectiva para evitar la aparición de la CTCG (Fig. 5C), ya que ningún ratón presentó esta crisis. En el mioclonus (Fig. 5A) no hubo incidencia en el porcentaje de los ratones que presentaron la crisis con ningún compuesto.

El comportamiento de las crisis para el mioclonus y la CCG fue similar a lo descrito en el apartado 7.1, sin embargo, después de haberse presentado la CCG, todos los ratones presentaron la fase clónica inicial de la CTCG, pero después de presentar el “wild jumping”, la fase tónica no se observó, en cambio se observaron contracciones clónicas en las extremidades anteriores y posteriores para posteriormente iniciar con “wild running” y “wild jumping”, derivando en SE.

Con respecto a la aparición de la primera crisis epiléptica (Fig. 6A), en el mioclonus, la dosis de 8.5 µg/kg de STX, anteriormente ya había reportado una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a su vehículo (Fig. 4A), en esta comparación, la dosis de STX además presentó diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en aumentar la latencia con respecto a la dosis de FNT. En la CCG (Fig. 6B), no hubo diferencia significativa con respecto a los controles (vehículos de STX y FNT) y entre las dosis de STX y FNT, y en la CTCG (Fig. 6C) no se pudo hacer una comparación entre ambas dosis debido a que con la FNT no se presentó la crisis.



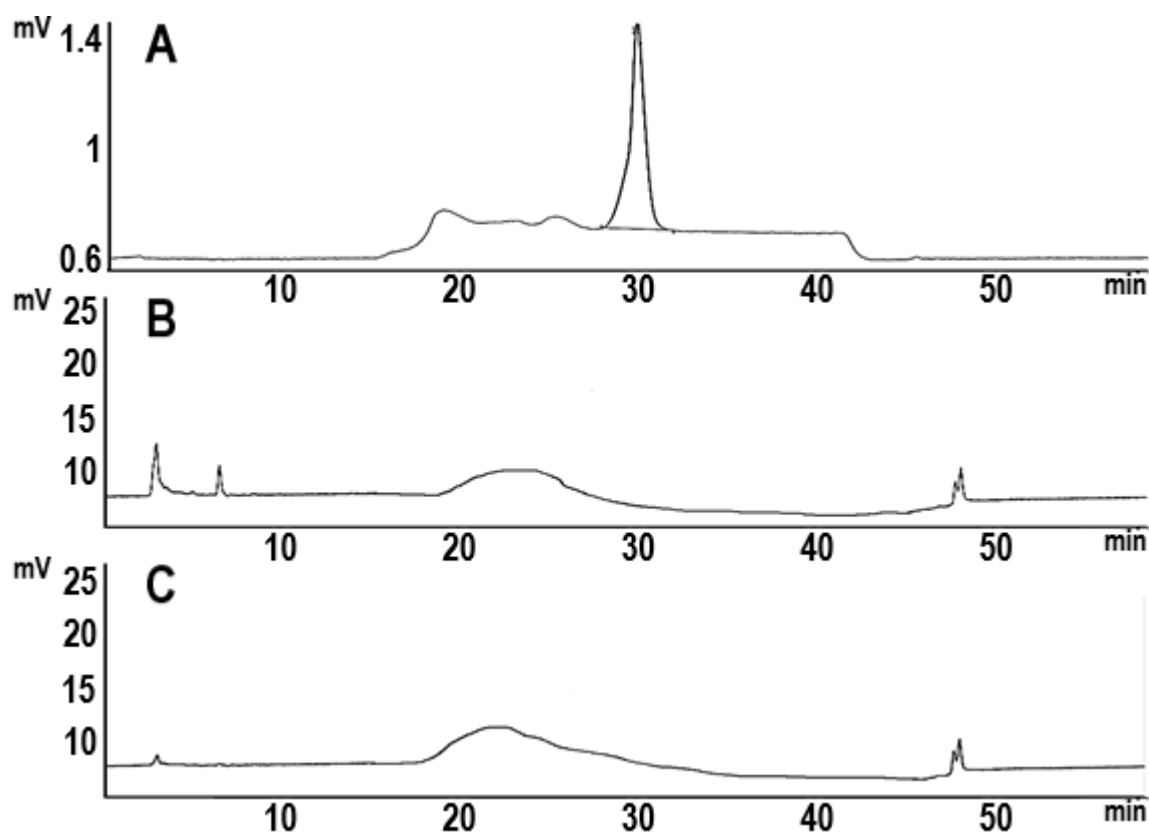
**Figura 5.** Porcentaje (%) de ratones que presentan las crisis epilépticas: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con una dosis de FNT (50 mg/kg) comparada con una dosis de STX (8.5  $\mu\text{g/kg}$ ), en ratones CD-1 ( $20 \pm 1$  g). Los vehículos (veh), la FNT o la STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). El asterisco denota diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Latencia (segundos) a la aparición de la primera crisis epiléptica: A) Mioclonus, B) CCG y C) CTCG; con una dosis de FNT (50mg/kg) comparada con una dosis de STX (8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en ratones CD-1 (20 $\pm$ 1 g). Los vehículos (veh), la FNT o la STX se inyectaron i.p. 30 min previos a la inyección i.p. del PTZ (100 mg/kg). Los datos se representan con un triángulo y se muestran la mediana, los cuartiles del 25 y 75% y los valores mínimo y máximo. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0.01$ ). El superíndice a denota que no hubo comparación con la dosis de FNT (50 mg/kg) por ausencia de datos.

### 7.3. Identificación y cuantificación de la saxitoxina en los cerebros de los ratones

La Figura 7 muestra los cromatogramas HPLC-FLD obtenidos del estándar de STX (Fig. 7A) y los cromatogramas de cerebro de ratón control (sin STX; Fig. 7B) y con la dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX (Fig. 7C), como cromatograma representativo de las demás dosis probadas (1.9–7.5 y 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX). El estándar de referencia de la STX presenta un tiempo de retención de 30 min. No se identificó la presencia de STX en los cerebros de ratón de ninguno de los experimentos realizados.



**Figura 7.** Cromatogramas representativos de STX analizada en el cerebro de ratón con el método de HPLC-FLD. A) Cromatograma de referencia del estándar de STX (FDA, NIST) con un tiempo de retención de 30 min; B) cromatograma de ratones sin exposición a STX; C) cromatograma proveniente del experimento con una dosis de 8.5  $\mu\text{g}$  STX/kg peso ratón y 30 min después administración de PTZ (100 mg/kg).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Efecto antiepiléptico de la saxitoxina

La STX bloquea los VGSC en las células nerviosas y musculares (Cusick y Sayler, 2013; Zhang *et al.*, 2013), específicamente el poro de los canales  $\text{Na}_v1.1-1.4$ , 1.6 y 1.7. Los canales  $\text{Na}_v1.1-1.3$  y 1.6 se expresan en diversas áreas del SNC (Duflocq *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 1987; Westenbroek *et al.*, 1989; Whitaker *et al.*, 2001), como la corteza cerebral y el tallo encefálico, áreas atribuidas a los sitios donde se originan el mioclonus, la CCG y CTCG (Browning, 1985; Browning y Nelson, 1986; Hallet 1987; Velíšková *et al.*, 2005). Los canales  $\text{Na}_v1.1$ , 1.6 y 1.7, se expresan en las motoneuronas (Alles *et al.*, 2020; Duflocq *et al.*, 2008) y  $\text{Na}_v1.4$  en el músculo esquelético (Lera Ruíz y Kraus 2015; Zhang *et al.*, 2013). Por lo tanto, al administrar la STX vía i.p., en los ratones, se esperaba que se distribuyera a SNC y SNP (Cianca *et al.*, 2007; Naseem 1996), así como a músculo esquelético, como se ha reportado en roedores que la STX llega a otros órganos como el corazón, los pulmones, y los riñones (Naseem 1996). Si la STX llegaba al SNC, se esperaba que bloqueara los canales  $\text{Na}_v1.1-1.3$  y 1.6 y evitara la acción del PTZ, debido a que el canal  $\text{Na}_v1.1$  se expresa en el soma neuronal y las dendritas proximales (Westenbroek *et al.*, 1989), donde la excitabilidad neuronal se controla (Leterrier *et al.*, 2010) y el canal  $\text{Na}_v1.6$  se co-expresa con  $\text{Na}_v1.2$  en los nodos de Ranvier del SIA en células nerviosas excitatorias de la neocorteza, (Hu *et al.*, 2009), donde se inicia y propaga el potencial de acción (Leterrier *et al.*, 2010). En caso de que no se evitara la acción del PTZ en el SNC, se esperaba que la STX bloqueara los canales  $\text{Na}_v1.1$ , 1.6 y 1.7 en las motoneuronas y  $\text{Na}_v1.4$  en el músculo esquelético, por lo tanto, la excitación no se propagara del SNC al músculo esquelético y así se evitara la manifestación de las crisis epilépticas.

En nuestro estudio, la STX no evitó las crisis epilépticas inducidas con el PTZ, pero aumentó la latencia del mioclonus con la dosis subletal más alta, lo que indica que la STX bloqueó los VGSC e interrumpió el flujo de  $\text{Na}^+$  al principio del experimento. Sin embargo, la acción excitadora del PTZ fue mayor, lo que sugiere que la acción bloqueadora de la STX se perdió y

sólo retrasó la aparición del mioclonus, que es la primera crisis que se presenta, pero no la evitó. Una vez que se perdió la acción bloqueadora de la STX en los VGSC, no hubo incidencia en la latencia de la CCG y la CTCG. La STX, al no evitar la acción del PTZ, se relaciona con la concentración de los compuestos que llega al cerebro, debido a que el PTZ llega en una concentración de  $\mu\text{g/g}$ , 5 min después de inyectar 85 mg/kg (Yonekawa *et al.*, 1980), mientras que la STX a los 30 min se ha registrado en ng/ml después de inyectar 10  $\mu\text{g/kg}$  (Cianca *et al.*, 2007). Lo anterior indica que la concentración de PTZ se encuentra disponible en el cerebro en mayor cantidad y en menor tiempo que la STX. También se sugiere que la dosis de PTZ utilizada en el estudio es muy alta, puesto que normalmente se utilizan dosis de 60 y 80 mg/kg de PTZ para evaluar crisis mioclónicas y CCG (Bhutada *et al.*, 2010; González-Trujano *et al.*; 2018, Herrera-Calderon *et al.*; 2018, Martínez *et al.*; 2006, Quintans-Júnior *et al.*; 2007, Sayyah *et al.*; 2005), respectivamente. Mientras que el mejor modelo para evaluar la CTCG es el MES, ya que es un modelo de crisis con origen primario en las estructuras del tronco encefálico (Jobe *et al.*, 1991), que es la estructura donde se origina la CTCG. Por lo tanto, una sugerencia sería analizar las crisis mioclónicas y clónicas con una dosis entre 60 y 80 mg/kg de PTZ, aunque eso afecte el porcentaje de crisis en el control y utilizar el modelo MES para evaluar el efecto de la STX sobre la CTCG.

Otra sugerencia al estudio sería cambiar la vía de administración del PTZ de i.p. a i.v., para que el tiempo de actividad epileptiforme sea menor, en lugar de irse excitando el cerebro prolongadamente, ya que por vía i.v. el PTZ llega al cerebro más rápidamente, y lo excita una vez, mientras que por vía i.p., el PTZ va llegando al cerebro poco a poco y la excitación del cerebro es más prolongada (Keogh *et al.*, 2005). Además, se podría cambiar la vía de administración de la STX a vía i.v., para que llegué más rápido al cerebro o esperar mayor tiempo antes de inyectar el PTZ para que la concentración de la STX aumente en el cerebro y contrarreste la acción del PTZ.



La dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX no se puede aumentar debido a que ya estaría dentro del rango de dosis letal y con la  $\text{LD}_{50}$  que se probó en el estudio no se observó incidencia en el mioclonus, ni en la CCG, aunque sí hubo una disminución, aunque no significativa, en el porcentaje de ratones que presentaron la CTCG. Esto corrobora que el margen terapéutico de la STX es muy estrecho (Kohane *et al.*, 2000; Llewellyn, 2006), dejando poco margen de uso de la STX como posible FAE. Por esa razón investigamos si las dosis subletales de 3.8 y 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tendrían actividad antiepiléptica, reduciendo el tiempo de espera de 30 a 15 min antes de administrar el PTZ. Sin embargo, los tamaños de muestra fueron lo suficientemente pequeños ( $n \leq 5$ ) para que los análisis no se pudieran llevar a cabo.

La STX y sus análogos poseen la misma actividad biológica y diferente afinidad por los canales que deriva en su potencia tóxica. Otra opción para la búsqueda de un compuesto antiepiléptico sería utilizar algún análogo de la STX con menor potencia tóxica. (Durán-Riveroll *et al.*, 2017; Wiese *et al.*, 2010). Una toxina menos potente podría darnos un margen terapéutico mayor para estudiar el efecto antiepiléptico de estas toxinas, y así tener una mayor eficacia terapéutica y una mínima probabilidad de toxicidad.

Cabe mencionar que la STX y sus análogos han sido ampliamente estudiados como anestésicos locales de larga duración, por su acción de bloqueo de los VGSC interrumpiendo el inicio y propagación de los potenciales de acción, así como, inhibir varios receptores, y deprimir la actividad de algunas vías de señalización intracelular (Adams *et al.*, 1973; Kohane *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Estos mecanismos de acción son similares a los que estamos buscando que actúen como antiepilépticos.

## **8.2. Comparación de la saxitoxina con la fenitoína**

Al no tener registro de estudios de la STX y sus análogos sobre evaluación de actividad antiepiléptica, los resultados obtenidos con la dosis de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se compararon con el efecto antiepiléptico de la FNT, un FAE comercial que su actividad está asociada a los VGSC (Mantegazza *et al.*, 2010). La STX presentó un efecto evidente en el mioclonus y en la CCG,

mientras que la FNT en la CTCG. Esto indica que a pesar de que ambos compuestos tienen como blanco molecular el VGSC, los mecanismos de acción difieren y por lo tanto la manera de incidir en las crisis es diferente. La STX es un bloqueador del poro del canal que interrumpe el flujo de  $\text{Na}^+$  durante el potencial de acción (Cusick y Sayler, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Cuando la acción bloqueadora de la STX se perdió por la acción del PTZ, el mioclonus, la CCG y la CTCG se presentaron. Sin embargo, la STX aumentó la latencia en el mioclonus y disminuyó la incidencia de la CCG en comparación con la FNT, al retardar y disminuir la acción del PTZ. En cambio, la FNT tiene mayor afinidad cuando el canal está inactivo, por lo tanto, su acción se da cuando los potenciales de acción son sucesivos (Mantegazza *et al.*, 2010; Rogawski y Löscher, 2004). Lo que sugiere, que la FNT no bloquea antes de que ocurra un potencial de acción, por eso no tiene efecto sobre el mioclonus, además, el mioclonus es de duración corta (Everhardt y Topka, 2017). La FNT tampoco evita la aparición de la CCG y la CTCG, pero la CCG, tiene una duración mayor por lo que la afinidad de la FNT por los VGSC pudiera ir aumentando conforme ocurre la crisis y la crisis dure menos, pero no se pudo comprobar debido a que la duración de las crisis no se evaluó en este estudio. En cambio, con la CTCG, que tiene una mayor duración, se sugiere que la FNT haya bloqueado efectivamente los VGSC y sea la razón de que se haya presentado la fase clónica inicial pero no la extensión tónica que aparece posteriormente.

El efecto de la STX y FNT, se puede asociar que al bloquear el flujo de  $\text{Na}^+$ , la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye, y reduce la liberación de neurotransmisores; su eficacia en la reducción de la liberación de neurotransmisores excitadores explicaría en parte los efectos anticonvulsivos. Sin embargo, también pueden bloquear la liberación de neurotransmisores en las sinapsis inhibitorias, lo que implica la reducción de la transmisión inhibitoria GABAérgica. Esto podría explicar la aparición de SE, que se define como una crisis que dura más de 5 min o dos o más crisis discretas entre las cuales hay una recuperación incompleta de la conciencia (Bauer, 1996; Guerrini *et al.*, 1998; Leach *et al.*, 1986; Lowenstein y Alldredge, 1998; Perucca *et al.*, 1998; Ribeiro y Leite, 2003; Sharma *et al.*, 2018; Stone y Javid, 1988). También podría explicar el aumento directamente proporcional a la dosis, la aparición de la CTCG, en las dosis de 1.9-7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . El bloqueo del flujo de  $\text{Na}^+$  que reduciría la transmisión inhibitoria

GABAérgica se puede asociar hipotéticamente con la STX, ya que al menos los  $\text{Na}_v1.1$  y  $1.2$  están presentes en las neuronas inhibitoras (Caterall *et al.*, 2010; Cheah *et al.*, 2012; Yamakawa, 2016). La sugerencia para disminuir el posible sinergismo entre la STX y el PTZ, en la reducción de la transmisión inhibitoria GABAérgica es utilizar el modelo MES que además de ser un modelo de crisis para la CTCG, se basa en un estímulo físico que no interaccionaría con ningún compuesto.

### **8.3. La saxitoxina en el cerebro**

Se ha reportado que la STX llega entre otros órganos a médula espinal y cerebro (Andrinolo *et al.*, 1999; Cianca *et al.*, 2007; David y Nicholson, 2004; Naseem, 1996) por lo que atraviesa la barrera hematoencefálica sin convertirse en otros análogos (Andrinolo *et al.*, 1999, 2002). Sin embargo, en este estudio se evaluó si la STX había llegado a cerebro y si esta permaneció después de la acción del PTZ, pero no se detectó STX en cerebro con HPLC-FLD, aunque no se descarta que se presentaran niveles traza por debajo del límite de detección del HPLC, que es de 7 pg para la STX (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012),

La STX no evitó la aparición de las crisis epilépticas inducidas por la acción del PTZ, lo que concuerda con que no se encontraran niveles detectables de STX en el cerebro y que en un momento dado la STX dejó de ejercer su acción en los VGSC. También se puede argumentar que el método que se llevó a cabo para la extracción de las toxinas no fue el adecuado, puesto que otros autores combinan varias muestras y posteriormente concentran el homogeneizado para poder identificarlas, como en el estudio de Cianca *et al.* (2007), quienes evaluaron la distribución de STX en los cerebros de rata donde combinaron 3 muestras para que las concentraciones de STX fueran identificadas por HPLC-FLD. Así, al trabajar en este estudio con un ratón que es de menor tamaño y que la acción del PTZ es mayor, ya que llega en mayor cantidad y más rápido al cerebro, haya influido en que no se identificaran niveles traza de STX en el cerebro de los ratones.

## 9. CONCLUSIONES

La STX aumentó significativamente la latencia del mioclonus con la dosis subletal más alta de 8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX, disminuyó entre un 10-30% la aparición de la CCG con las dosis subletales de 3.8-8.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y con las dosis de 1.9-7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  la aparición de la CTCG aumentó directamente proporcional a la dosis. La DL50 de 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX no tuvo incidencia en el mioclonus, pero contrario a las dosis subletales, aumentó la incidencia de la CCG y la disminuyó en la CTCG.

La STX aumentó la latencia en el mioclonus con respecto a la FNT y disminuyó la incidencia de la CCG en comparación con la FNT. La FNT fue 100% efectiva en evitar la extensión tónica de las extremidades posteriores en la CTCG, en comparación con la STX. Con la dosis de 8.5 y 9.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de STX y la dosis de 50 mg/kg de FNT hubo presencia de SE.

La STX no evitó la aparición de las crisis, y no se detectó STX en el cerebro, sin embargo, no se puede descartar que hayan quedado niveles traza de STX en el cerebro que no se hayan detectado por medio de HPLC-FLD.

## 10. LITERATURA CITADA

Adams, H. J., J. M. Blair, B. H. Takman. 1976. The local anesthetic activity of saxitoxin alone and with vasoconstrictor and local anesthetic agents. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 224(2): 275-282.

Ali, A., K. K. Pillai, F. J. Ahmad, Y. Dua, D. Vohora. 2006. Anticonvulsant effect of amiloride in pentetrazole-induced status epilepticus in mice. *Pharmacological reports*. 58(2):242.

Alles, S. R., F. Nascimento, R. Luján, A. P. Luiz, Q. Millet, M. A. Bangash, S. Santana-Varela, X. Zhou, J. J. Cox, A. L. Okorokov, M. Beato, J. Zhao, J. N. Wood. 2020. Sensory neuron-derived  $\text{Na}_v1.7$  contributes to dorsal horn neuron excitability. *Science advances*. 6(8):eaax4568.

Anderson, D. M., D. M. Jacobson, I. Bravo, J. H. Wrenn. 1988. The unique, microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology*. 24(2):255-262.

Anderson, D. M., D. M. Kulis, J. J. Sullivan, S. Hall, C. Lee. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine biology*. 104(3):511-524.

Andre, V., N. Pineau, J. E. Motte, C. Marescaux, A. Nehlig. 1998. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci*. 10, 2094–2106.

Andrinolo, D., L. F. Michea, N. Lagos 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon*. 37(3):447-464.

Andrinolo, D., V. Iglesias, C. García, N. Lagos. 2002. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon*. 40(6):699-709.

Aune, T. 2001. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. En Koe, W. J. D, R. A. Samson, H. P. Van Egmond, J. Gilbert, M. Sabino, (eds.). *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (May 2000, Guarujá, Brazil)*. Ponsen & Looyen, Wageningen, Los países bajos. pp. 515-526.

Bao, L. 2015. Trafficking regulates the subcellular distribution of voltage-gated sodium channels in primary sensory neurons. *Molecular pain*. 11:s12990-015.

- Barker, B. S., G. T. Young, C. H. Soubrane, G. J. Stephens, E. B. Stevens, M. K. Patel. 2017. Ion Channels. En: Conn, P. M. (ed.). Conn's Translational Neuroscience. Editorial: Academic Press. Primera Edición. San Diego, California, Estados Unidos. pp 11 – 43.
- Barnet, C. S., Y. T. Julie, D. S. Kohane. 2004. Site 1 sodium channel blockers prolong the duration of sciatic nerve blockade from tricyclic antidepressants. *Pain* 110(1-2):432-438.
- Bauer, J. 1996. Seizure- inducing effects of antiepileptic drugs: a review. *Acta neurologica scandinavica*. 94(6):367-377.
- Bethmann, K., C. Brandt, W. Löscher. 2007. Resistance to phenobarbital extends to phenytoin in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 48(4):816-826.
- Bhutada, P., Y. Mundhada, K. Bansod, P. Dixit, S. Umathe, D. Mundhada. 2010. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. *Epilepsy & Behavior*. 18(3):207-210.
- Black, J. A., S. Yokoyama, H. Higashida, B. R. Ransom, S. G. Waxman. 1994. Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression. *Molecular brain research*. 22(1-4):275-289.
- Blechsmidt, S., V. Haufe, K. Benndorf, T. Zimmer. 2008. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel transcript patterns in the mammalian heart are species-dependent. *Progress in biophysics and molecular biology*. 98(2-3):309-318.
- Boiko, T., M. N. Rasband, S. R. Levinson, J. H. Caldwell, G. Mandel, J. S. Trimmer, G. Matthews. 2001. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron*. 30(1):91-104.
- Boiko, T., A. Van Wart, J. H. Caldwell, S. R. Levinson, J. S. Trimmer, G. Matthews. 2003. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2306-2313.
- Borowicz, K. K., J. J. A. M. LuszczkiDuda, S. J. Czuczwar. 2003. Effect of topiramate on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in two models of experimental epilepsy. *Epilepsia*. 44(5):640-646.
- Botana, L. M. 2000. Seafood and Freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. Marcel Dekker, Inc. Primera Edición. Nueva York, Estados Unidos. 804p.
- Bowman, J., F. E. Dudek, M. Spitz. 2001. Epilepsy. En: *Encyclopedia of life sciences* (Wiley Interscience) [Internet]. Nature Publishing Group. Consultado el 20 de diciembre de 2017, en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/npg.els.0000100>

Brandt, C., W. Löscher. 2014. Antiepileptic efficacy of lamotrigine in phenobarbital-resistant and-responsive epileptic rats: A pilot study. *Epilepsy research*. 108(7):1145-1157.

Bromfield, E. B., J. E. Cavazos, J. I. Sirven. 2006. Basic mechanisms underlying seizures and epilepsy. En: *An Introduction to Epilepsy* [Internet]. American Epilepsy Society. Consultado el 2 de enero de 2018, en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20821849/>

Browning, R. A. 1985. Role of the brain-stem reticular formation in tonic-clonic seizures: lesion and pharmacological studies. *Federation proceedings*. 44(8):2425.

Browning, R. A., D. K. Nelson. 1986. Modification of electroshock and pentylentetrazol seizure patterns in rats after precollicular transections. *Experimental neurology*. 93(3):546-556.

Burack, M. A., S. F. Stasheff, W. A. Wilson. 1995. Selective suppression of in vitro electrographic seizures by low-dose tetrodotoxin: A novel anticonvulsant effect. *Epilepsy research*. 22(2):115-126.

Bustillos-Guzmán, J. J., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E. J. Núñez-Vázquez, F. E. Hernández-Sandoval. 2012. Variations in growth and toxicity in *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California under different ratios of nitrogen and phosphorus. *Ciencias Marinas*. 38(1A):101-117.

Caldwell, J. H., K. L. Schaller, R. S. Lasher, E. Peles, S. R. Levinson. 2000. Sodium channel Na<sub>v</sub>1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(10):5616-5620.

Castel-Branco, M. M., G. L. Alves, I. V. Figueiredo, A. Falcão, M. M. Caramona. 2009. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Pharmacology & therapeutics*. 35(7):392-415.

Catterall, W. A., A. L. Goldin, S. G. Waxman. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*. 57(4):397-409.

Chandy, K. G., G. A. Gutman. 1993. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends in pharmacological sciences*. 14(12):434.

Chang, W., T. Berta, Y. H. Kim, S. Lee, S. Y. Lee, R. R. Ji. 2018. Expression and role of voltage-gated sodium channels in human dorsal root ganglion neurons with special focus on Na<sub>v</sub>1.7, species differences, and regulation by paclitaxel. *Neuroscience bulletin*. 34(1):4-12.

Cheah, C. S., F. H. Yu, R. E. Westenbroek, F. K. Kalume, J. C. Oakley, G. B. Potter, J. L. Rubenstein, W. A. Catterall. 2012. Specific deletion of Na<sub>v</sub>1.1 sodium channels in inhibitory

interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(36):14646-14651.

Cramer, J. A., S. Mintzer, J. Wheless, R. H. Mattson. 2010. Adverse effects of antiepileptic drugs: a brief overview of important issues. *Expert review of neurotherapeutics*. 10(6):885-891.

Cianca, R. C. C., M. A. Pallares, R. D. Barbosa, L. V. Adan, J. M. L. Martins, A. Gago-Martínez. 2007. Application of precolumn oxidation HPLC method with fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats. *Toxicon*. 49(1):89-99.

Cusick, K. D., G. S. Sayler. 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*. 11(4):991-1018.

Czapinski, P., B. Blaszczyk, S. J. Czuczwar. 2005. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Current topics in medicinal chemistry*. 5(1):3-14.

de Lera Ruiz, M., R. L. Kraus. 2015. Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of medicinal chemistry*. 58(18):7093-7118.

Duflocq, A., B. Le Bras, E. Bullier, F. Couraud, M. Davenne. 2008. Na<sub>v</sub>1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 39(2):180-192.

Durán-Riveroll, L. M., A. D. Cembella. 2017. Guanidinium toxins and their interactions with voltage-gated sodium ion channels. *Marine drugs*. 15(10):303.

Durán-Riveroll L. M., B. Krock, A. Cembella, J. Peralta-Cruz, J. J. Bustillos-Guzmán, C. J. Band-Schmidt. 2017. Characterization of Benzoyl Saxitoxin Analogs from the Toxicogenic Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by Hydrophilic Interaction Liquid Ion-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Nat Prod Chem Res*. 5: 275.

Eberhardt, O., H. Topka. 2017. Myoclonic disorders. *Brain Sciences*. 7(8):103.

EFSA. .2009. Marine biotoxins in shellfish–Saxitoxin group scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J*. 1019:1-3.

Epstein-Barash, H. I., Shichor, A. H. Kwon, S. Hall, M. W. Lawlor, R. Langer, D. S. Kohane. 2009. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(17):7125-7130.

Errington, A. C., T. Stohr, G. Lees. 2005. Voltage gated ion channels: targets for anticonvulsant drugs. *Current topics in medicinal chemistry*. 5(1):15-30.



Ertel E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, W. A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25(3):533-535.

Feldman, D.B., J.C. Seely. 1988. *Necropsy Guide: rodents and the rabbit*. CRC Press. Primera Edición. Boca Ratón, Estado Unidos. 176p.

Figueroa, R. I., I. Bravo. 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology*. 41(2):370-379.

Figueroa, R. I., I. Bravo, E. Garcés. 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia*, 44(6):658-670.

García, C., A. Rodríguez-Navarro, J. C. Díaz, R. Torres, N. Lagos. 2009. Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon*. 53(2):206-213.

García, C., A. Barriga, J. C. Díaz, M. Lagos, N. Lagos. 2010. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon*. 55(1):135-144.

Garrido, R., N. Lagos, K. Lattes, M. Abedrapo, G. Bocic, A. Cuneo, H. Chiong, C. Jensen, R. Azolas, A. Henriquez, C. Garcia. 2005. Gonyautoxin: new treatment for healing acute and chronic anal fissures. *Diseases of the colon & rectum*. 48(2):335-343.

Garrido, R., N. Lagos, M. Lagos, A. J. Rodríguez-Navarro, C. García, D. Truan, A. Henriquez. 2007. Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *Colorectal Disease*. 9(7):619-624.

Gessner, B. D., P. Bell, G. J. Doucette, E. Moczydlowski, M. A. Poli, F. Van Dolah, S. Hall. 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon*. 35(5):711-722.

Goldenberg, M. M. 2010. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment. *Pharmacy and Therapeutics* 35(7):392.

Goldin, A. L., R. L. Barchi, J. H. Caldwell, F. Hofmann, J. R. Howe, J. C. Hunter, R. G. Kallen, G. Mandel, M. H. Meisler, Y. B. Netter, M. Noda, M. M. Tamkun, S. G. Waxman, J. N. Wood, W. A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28(2):365-368.

Goldin, A. L. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology*. 63(1):871-894.

González-Trujano, M. E., F. Domínguez, G. Pérez-Ortega, M. Aguillón, D. Martínez-Vargas, S. Almazán-Alvarado, A. Martínez. 2017. *Justicia spicigera* Schldl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 92:240-248.

González-Trujano, M. E., C. L. Martínez-González, M. Flores-Carrillo, S. I. Luna-Nophal, G. Contreras-Murillo, V. M. Magdaleno-Madrigal. 2018. Behavioral and electroencephalographic evaluation of the anticonvulsive activity of *Moringa oleifera* leaf non-polar extracts and one metabolite in PTZ-induced seizures. *Phytomedicine*. 39:1-9.

Gordon, D., D. Merrick, V. Auld, R. Dunn, A. L. Goldin, N. Davidson, W. A. Catterall. 1987. Tissue-specific expression of the RI and RII sodium channel subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84(23):8682-8686.

Guerrini, R., A. Belmonte, P. Genton. 1998. Antiepileptic drug- induced worsening of seizures in children. *Epilepsia*. 39:S2-S10.

Hallegraeff, G. M., D. A. Steffensen, R. Wetherbee. 1988. Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *Journal of plankton research*. 10(3):533-541.

Hallett, M. (1987). The pathophysiology of myoclonus. *Trends in Neurosciences*. 10(2):69-73.

Hansen, S. L., B. B. Sperling, C. Sánchez. 2004. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA<sub>A</sub> receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 28(1):105-113.

Haywood, A. J., K. A. Steidinger, E. W. Truby, P. R. Bergquist, P. L. Bergquist, J. Adamson, L. Mackenzie. 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. *Journal of Phycology*. 40(1):165-179.

Hedrich, H. 2004. *The laboratory mouse*. Academic Press. Primera edición. Oxford. Estados Unidos. 656p.

Heller, A. H., M. A. Dichter, R. L. Sidman. 1983. Anticonvulsant sensitivity of absence seizures in the tottering mutant mouse. *Epilepsia*. 24(1):25-34.

Herrera-Calderon, O., R. Santiváñez-Acosta, B. Pari-Olarte, E. Enciso-Roca, V. M. C. Montes, J. L. A. Acevedo. 2018. Anticonvulsant effect of ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. leaves on pentylenetetrazol induced seizure in mice. *Journal of traditional and complementary medicine*. 8(1): 95-99.

Hines, H. B., S. M. Naseem, R. W. Wannemacher Jr. 1993. [<sup>3</sup>H]-saxitoxinol metabolism and elimination in the rat. *Toxicol*. 31(7):905-908.

- Hinzpeter, J., C. Barrientos, Á. Zamorano, Á. Martínez, M. Palet, R. Wulf, M. Barahona, J. M. Sepúlveda, M. Guerra, T. Bustamante, M. Del Campo, E. Tapia, N. Lagos. 2016. Gonyautoxins: First evidence in pain management in total knee arthroplasty. *Toxicon*. 119:180-185.
- Hu, W., C. Tian, T. Li, M. Yang, H. Hou, Y. Shu. 2009. Distinct contributions of Na<sub>v</sub>1.6 and Na<sub>v</sub>1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nature neuroscience*. 12(8):996.
- Huang, R. Q., C. L. Bell-Horner, M. I. Dibas, D. F. Covey, J. A. Drewe, G. H. Dillon. 2001. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors: mechanism and site of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 298(3):986-995.
- Hummert, C., M. Ritscher, R. Reinhardt, B. Luckas. 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*. 45(1):312.
- Ingale, S. P., F. P. Gandhi. 2015. Effect of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on pharmacological models of epilepsy and anxiety in mice. *International Journal of Epilepsy*. 3(01):012-019.
- Jewett, B. E., S. Sharma. 2018. Physiology, GABA. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. Consultado el 04 de abril de 2019, en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513311/>
- Jobe, P. C., P. K. Mishra, N. Ludvig, J. W. Dailey. 1991. Scope and contribution of genetic models to an understanding of the epilepsies. *Critical reviews in neurobiology*. 6(3):183.
- Keogh B. P., D. Cordes, L. Stanberry, B. D. Figler, C. A. Robbins, B. L. Tempel, C. G. Greena, A. Emmid, K. M. Maravillaa, P. A. Schwartzkroine. 2005. BOLD-fMRI of PTZ-induced seizures in rats. *Epilepsy Research*. 66(1-3):75-90.
- Kerr, N. C., Z. Gao, F. E. Holmes, S. A. Hobson, J. C. Hancox, D. Wynick, A. F. James. 2007. The sodium channel Na<sub>v</sub>1.5 is the predominant isoform expressed in adult mouse dorsal root ganglia and exhibits distinct inactivation properties from the full-length Na<sub>v</sub>1.5 channel. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 35(2):283-291.
- Kitano, Y., C. Komiyama, M. Makino, K. Takasuna, A. Takazawa, S. Sakurada. 2005. Anticonvulsant properties of the novel nootropic agent nefiracetam in seizure models of mice and rats. *Epilepsia*. 46(6):811-818.
- Klitgaard, H. 2001. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia*. 42:13-18.

Khoshnood-Mansoorkhani, M. J., M. R. Moein, N. Oveisi. 2010. Anticonvulsant activity of Teucrium polium against seizure induced by PTZ and MES in mice. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 9(4):395.

Klioueva, I. A., E. L. J. M. van Luijtelaar, N. E. Chepurnova, S. A. Chepurnov. 2001. PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. Physiology & behavior. 72(3):421-426.

Kohane, D. S., Y. Kuang, N. T. Lu, R. Langer, G. R. Strichartz, C. B. Berde. 1999. Vanilloid receptor agonists potentiate the in vivo local anesthetic activity of percutaneously injected site 1 sodium channel blockers. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 90(2):524-534.

Kohane, D. S., N. T. Lu, A. C. Gökgöl-Kline, M. Shubina, Y. Kuang, S. Hall, G. R. Strichartz, C. B. Berde. 2000. The local anesthetic properties and toxicity of saxitoxin homologues for rat sciatic nerve block in vivo. 52-59.

Krzemien, D. M., K. L. Schaller, S. R. Levinson, J. H. Caldwell. 2000. Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system. Journal of Comparative Neurology, 420(1), 70-83.

Laedermann, C. J., M. Pertin, M. R. Suter, I. Decosterd. 2014. Voltage-gated sodium channel expression in mouse DRG after SNI leads to re-evaluation of projections of injured fibers. Molecular pain. 10(1):19.

Lagos, N., H. Onodera, P. A. Zagatto, D. Andrinolo, S. M. Azevedo, Y. Oshima, 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon. 37(10):1359-1373.

Lattes, K., P. Venegas, N. Lagos, M. Lagos, L. Pedraza, A.J. Rodriguez-Navarro, C. Garcia. 2009. Local infiltration of gonyautoxin is safe and effective in treatment of chronic tension-type headache. Neurological research. 31(3):228-233.

Lawrence, J., H. Loreal, H. Toyofuku, P. Hess, K. Iddya, L. Ababouch. 2011. FAO Fisheries and aquaculture technical paper 551, assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

Leach, M. J., C. M. Marden, A. A. Miller. 1986. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. Epilepsia. 27(5):490-497.

Leppik, I. E., K. M. Kelly, L. de Toledo-Morrell, P. R. Patrylo, R. J. DeLorenzo, G. W. Mathern, H. S. White. 2006. Basic research in epilepsy and aging. Epilepsy research. 68:21-37.

Leterrier, C., A. Brachet, M. P. Fache, B. Dargent. 2010. Voltage-gated sodium channel organization in neurons: protein interactions and trafficking pathways. *Neuroscience letters*, 486(2), 92-100.

Li, T., J. Chen. 2018. Voltage-Gated Sodium Channels in Drug Discovery. En: Shad, K. A. (ed.). *Ion Channels in Health and Sickness*. IntechOpen. Croacia. pp 13-44

Lorincz, A., Z. Nusser. 2008. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *Journal of Neuroscience*. 28(53):14329-14340.

Löscher, W. 2007. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy. *Epilepsia*. 48(7):1245-1258.

Löscher, W., C. Brandt. 2010. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacological reviews*. 62(4):668-700.

Lowenstein, D. H., B. K. Alldredge. 1998. Status epilepticus. *New England Journal of Medicine*. 338(14):970-976.

Llewellyn, L. E. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural product reports*. 23(2):200-222.

Maier, S. K., R. E. Westenbroek, T. T. Yamanushi, H. Dobrzynski, M. R. Boyett, W. A. Catterall, T. Scheuer. 2003. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(6):3507-3512.

Mandhane, S. N., K. Aavula, T. Rajamannar. 2007. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with sc PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*. 16(7):636-644.

Manríquez, V., D. C. Caperan, R. Guzmán, M. Naser, V. Iglesia, N. Lagos. 2015. First evidence of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *International urogynecology journal*. 26(6):853-858.

Mantegazza, M., G. Curia, G. Biagini, D. S. Ragsdale, M. Avoli. 2010. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*. 9(4):413-424.

Martínez, A. L., F. Dominguez, S. Orozco, M. Chavez, H. Salgado, M. Gonzalez, M. E. González-Trujano. 2006. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 106(2):250-255.

- Matsuoka, K., M. Iwataki, H. Kawami. 2008. Morphology and taxonomy of chain-forming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae). *Harmful Algae*. 7(3):261-270.
- McAlvin, J. B., C. Zhan, J. C. Dohlman, P. E. Kolovou, B. Salvador-Culla, D. S. Kohane. 2015. Corneal anesthesia with site 1 sodium channel blockers and dexmedetomidine. *Investigative ophthalmology & visual science*. 56(6):3820-3826.
- Munday, R., K. Thomas, R. Gibbs, C. Murphy, M. A. Quilliam. 2013. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon*. 76:77-83.
- Muñana, K. R., J. A. Nettifee- Osborne, M. G. Papich. 2015. Effect of chronic administration of phenobarbital, or bromide, on pharmacokinetics of levetiracetam in dogs with epilepsy. *Journal of veterinary internal medicine*. 29(2):614-619.
- Naseem, S. M. 1996. Toxicokinetics of [<sup>3</sup>H] saxitoxinol in peripheral and central nervous system of rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 141(1):49-58.
- Negri, A. P., G. J. Jones. 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon*. 33(5):667-678.
- Nisar, M., I. Khan, S. U. Simjee, A. H. Gilani, H. Perveen. 2008. Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* Zucc. *Journal of Ethnopharmacology*. 116(3):490-494.
- Ogiwara, I., H. Miyamoto, N. Morita, N. Atapour, E. Mazaki, I. Inoue, T. Takeuchi, S. Itohara, Y. Yanagawa, K. Obata, T. Furuichi, T. K. Hensch, K. Yamakawa. 2007. Na<sub>v</sub>1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *Journal of Neuroscience*, 27(22), 5903-5914.
- Okolodkov, Y., F. Merino-Virgilio, A. Aguilar-Trujillo, J. Herrera-Silveira. 2013. Phytoplankton of the northern coastal and shelf waters of the Yucatan Peninsula, southeastern Gulf of Mexico, Mexico. *Check List*. 9:771.
- Oliveira, F. A., R. N. de Almeida, V. S. Maria de Fátima, J. M. Barbosa-Filho, S. A. Diniz, I. A. de Medeiros. 2001. Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 68(2):199-202.
- Perucca, E., L. Gram, G. Avanzini, O. Dulac. 1998. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*. 39(1):5-17.
- Perucca, P., F. G. Gilliam. 2012. Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet Neurology*. 11(9):792-802.

Quintans-Júnior, L. J., D. A. Silva, J. S. Siqueira, M. D. F. V. D. Souza, R. N. Almeida, R. G. Silva-Júnior. 2007. Anticonvulsant properties of the total alkaloid fraction of *Rauvolfia ligustrina* Roem. et Schult. in male mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(2):176-180.

Ramos-Morales, F. R., J. Correa-Basurto, M. Saavedra-Vélez, M. E. Acosta-Hernández, E. Gasca-Pérez, A. Pérez-Palacios, J. Trujillo-Ferrara. 2012. Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante. *Archivos de Neurociencias*. 17(1):45-48.

Raines, A., T. R. Henderson, E. A. Swinyard, K. L. Dretchen. 1990. Comparison of midazolam and diazepam by the intramuscular route for the control of seizures in a mouse model of status epilepticus. *Epilepsia*. 31(3):313-317.

Rasouli, Y., A. Davood, A. Alaei, G. Dehqani, H. Shafaroudi, M. Lotfinia, M. Amini, A. Shafiee. 2017. Anticonvulsant Effects of New 1,4 Dihydropyridine Derivatives Containing Imidazolyl Moiety Against Seizures Induced by Pentylentetrazole and Maximal Electroshock in Mice. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 16(3):893.

Ribeiro, R. A., J. R. Leite. 2003. Nantenine alkaloid presents anticonvulsant effect on two classical animal models. *Phytomedicine*. 10(6-7):563-568.

Rocha, L. 2008. Subchronic treatment with antiepileptic drugs modifies pentylentetrazol-induced seizures in mice: its correlation with benzodiazepine receptor binding. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 4(3):619.

Rodriguez-Navarro, A. J., N. Lagos, M. Lagos, I. Braghetto, A. Csendes, J. Hamilton, Z. Berger, G. Wiedmaier, A. Henriquez. 2006. Intrasphincteric neosaxitoxin injection: Evidence of lower esophageal sphincter relaxation in achalasia. *The American journal of gastroenterology*. 101(11):2667.

Rogawski, M. A., W. Löscher. 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553-564.

Saravanan, G., V. Alagarsamy, P. Dineshkumar. 2014. Anticonvulsant activity of novel 1-(morpholinomethyl)-3-substituted isatin derivatives. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 52(1):115-124.

Sayyah, M., S. Moaied, M. Kamalinejad. 2005. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. *Journal of ethnopharmacology*. 98(1-2):209-211.

Selwood, A. I., C. Waugh, D. T. Harwood, L. L. Rhodes, J. Reeve, J. Sim, R. Munday. 2017. Acute toxicities of the saxitoxin congeners gonyautoxin 5, gonyautoxin 6, decarbamoyl gonyautoxin 2&3, decarbamoyl neosaxitoxin, C-1&2 and C-3&4 to mice by various routes of administration. *Toxins*. 9(2):73.

Schantz, E. J., J. D. Mold, D.W. Stanger, J. Shavel, F. J. Riel, J. P. Bowden, J. M. Lynch, R. S. Wyler, B. Riegel, H. Sommer. 1957. Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues. *Journal of the American Chemical Society*. 79(19):5230-5235.

Scharfman, H. E. 2007. The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*. 7(4):348-354.

Sharma, S., S. Puttachary, A. Thippeswamy, A. G. Kanthasamy, T. Thippeswamy. 2018. Status epilepticus: behavioral and electroencephalography seizure correlates in kainate experimental models. *Frontiers in neurology*. 9:7.

Shen, H., Z. Li, Y. Jiang, X. Pan, J. Wu, B. Cristofori-Armstrong, J. J. Smith, Y. K. Y. Chin, J. Lei, Q. Zhou, G. F. King, N. Yan. 2018. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science*. 362(6412):eaau2596.

Shibley, H., B. N. Smith. 2002. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy research*. 49(2):109-120.

Shimizu, Y., C. P. Hsu, A. Genenah. 1981. Structure of saxitoxin in solutions and stereochemistry of dihydrosaxitoxins. *Journal of the American Chemical Society*. 103(3):605-609.

Sills, G. J. 2011. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Epilepsy 2011: From Science to Society. A Practical Guide to Epilepsy*.

Simeone, T. Rho, J. M. 2009. Antiepileptic Drugs: Antiepileptic Drug Mechanisms. En: *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Elsevier Inc. pp. 59-66.

Southcott, R.V. 1975. The neurologic effects of noxious marine creatures. *Contemporary neurology series*. 12:165-258.

Staley, K. 2015. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature neuroscience*. 18(3):367.

Stone, W. E., M. J. Javid. 1988. Anticonvulsive and convulsive effects of lidocaine: comparison with those of phenytoin, and implications for mechanism of action concepts. *Neurological research*. 10(3):161-168.

Su, Z., M. Sheets, H. Ishida, F. Li, W. H. Barry. 2004. Saxitoxin blocks L-type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308(1):324-329.

Suarez-Isla, B. A. 2015. Saxitoxin and Other Paralytic Toxins: Toxicological Profile. *Marine and Freshwater Toxins*, Springer Netherlands, Dordrecht. 1-16.



- Tambe, R., P. Jain, S. Patil, P. Ghumatkar, S. Sathaye, 2015. Protective effects of diosgenin in pentylenetetrazole induced kindling model of epilepsy in mice. *Neurochem. Neuropharm. Open Access*. 1:106.
- Testai, E., S. Scardala, S. Vichi, F. M. Buratti, E. Funari. 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Critical reviews in toxicology*. 46(5):385-419.
- Thottumkara, A. P., W. H. Parsons, J. Du Bois. 2014. Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition*. 53(23):5760-5784.
- Tourov, A., R. Ferri, S. G. Del, M. Elia, S. A. Musumeci, M. C. Stefanini. 1996. Spike morphology in PTZ-induced generalized and cobalt-induced partial experimental epilepsy. *Functional neurology*. 11(5):237-245.
- Treiman, D. M. 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*. 42:8-12.
- Underhill, S. 2014. Excitatory Amino Acid Transporters in Neurons and Glia. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.
- Usup, G., A. Ahmad, K. Matsuoka, P. T. Lim, C. P. Leaw. 2012. Biology, ecology and bloom dynamics of the toxic marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. *Harmful Algae*. 14:301-312.
- Van Erum, J., D. Van Dam, P. P. De Deyn. 2019. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior*. 95:51-55.
- Van Wart, A., G. Matthews. 2006a. Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking nav1. 6 sodium channels. *Journal of Neuroscience*. 26(27):7172-7180.
- Van Wart, A., G. Matthews. 2006b. Expression of sodium channels Na<sub>v</sub>1. 2 and Na<sub>v</sub>1. 6 during postnatal development of the retina. *Neuroscience letters*. 403(3):315-317.
- Van Wart, A., J. S. Trimmer, G. Matthews. 2007. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *Journal of Comparative Neurology*. 500(2): 339-352.
- Villegas, R., C. Castillo, M. E. Póo, S. Schnell, C. Piernavieja, D. Balbi, G. M. Villegas. 1994. Expression of sodium channels with different saxitoxin affinity during rat forebrain development. *Developmental brain research*. 81(1):26-40.
- Velíšek, L. 2006. Models of chemically-induced acute seizures. En: Pitkänen A., P.A. Schwartzkroin and S.L. Moshé (ed.). *Models of seizures and epilepsy*. Academic Press. Primera Edición. San Diego, California, Estados Unidos. pp. 127-152.

Velíšková, J., A. M. Miller, M. L. Nunes, L. L. Brown. 2005. Regional neural activity within the substantia nigra during peri-ictal flurothyl generalized seizure stages. *Neurobiology of disease*. 20(3):752-759.

Velíšková, J., L. Velíšek. 2017. Behavioral characterization and scoring of seizures in rodents. En: Pitkänen, A., P. Buckmaster, A.S. Galanopoulou, S.L. Moshé (ed.). *Models of seizures and epilepsy*. Academic Press. Segunda Edición. San Diego, California, Estados Unidos. pp. 111-123.

Walker, J. R., P. A. Novick, W. H. Parsons, M. McGregor, J. Zablocki, V. S. Pande, J. Du Bois. 2012. Marked difference in saxitoxin and tetrodotoxin affinity for the human nociceptive voltage-gated sodium channel (Na<sub>v</sub>1.7). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(44):18102-18107.

Wang, J., J. J. Salata, P. B. Bennett. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* 121(6):583-598.

Westenbroek, R. E., D. K. Merrick, W. A. Catterall. 1989. Differential subcellular localization of the RI and RII Na<sup>+</sup> channel subtypes in central neurons. *Neuron*. 3(6):695-704.

Whitaker, W. R., R. L. Faull, H. J. Waldvogel, C. J. Plumpton, P. C. Emson, J. J. Clare. 2001. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Molecular Brain Research*. 88(1-2):37-53.

White, H.S., M. D. Smith, K. S. Wilcox. 2007. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *International review of neurobiology*. 81:85-110.

Wiese, M., P. M. D'agostino, T. K. Mihali, M. C. Moffitt, B. A. Neilan. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine drugs*. 8(7):2185-2211.

Wu, L., K. Nishiyama, J. G. Hollyfield, Q. Wang. 2002. Localization of Na<sub>v</sub>1.5 sodium channel protein in the mouse brain. *Neuroreport*. 13(18):2547.

Yamaguchi, A., T. Horiguchi. 2008. Culture of the heterotrophic dinoflagellate *Protoperidinium crassipes* (Dinophyceae) with noncellular food items. *Journal of phycology*. 44(4):1090-1092.

Yamakawa, K. 2016. Mutations of voltage-gated sodium channel genes SCN1A and SCN2A in epilepsy, intellectual disability, and autism. En: Sala C., C. Verpelli (ed.). *Neuronal and synaptic dysfunction in autism Spectrum disorder and intellectual disability*. Academic Press. Primera Edición. Londres, Inglaterra. pp. 233-251.

Yonekawa, W.D., H.J. Kupferberg, D.M. Woodbury. 1980. Relationship between pentylenetetrazol-induced seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 214(3):589-593.

Yu, R. C., C. Hummert, B. Luckas, P. Y. Qian, J. Li, M. J. Zhou. 1998. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia*. 48(9-10):671-676.

Zavala-Tecuapetla, C., M. L. López-Meraz. 2011. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *eNeurobiología*. 2(4):1-16.

Zhang, F., X. Xu, T. Li, Z. Liu. 2013. Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Marine drugs*. 11(12):4698-4723.

Zhu, H., Y. Zhao, H. Wu, N. Jiang, Z. Wang, W. Lin, J. Jin, Y. Ji. 2016. Remarkable alterations of Na<sub>v</sub>1.6 in reactive astrogliosis during epileptogenesis. *Scientific reports*. 6:38108.